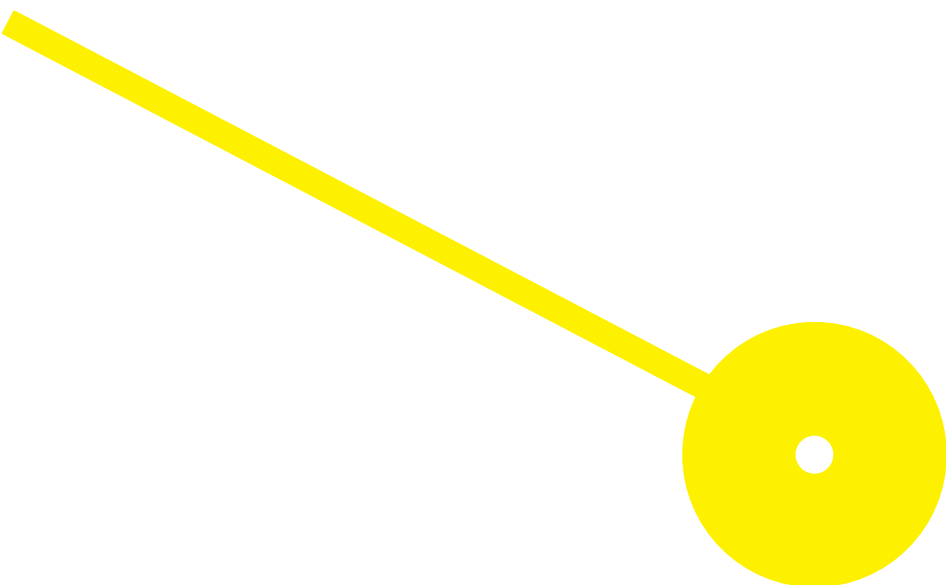




# Anticorpos Anti HLA não Específicos ao Dador: Contributo no Desempenho do Rim Transplantado com Dador Vivo

Sara Carina Ferreira Oliveira

10/2022





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



**Anticorpos HLA não Específicos ao Dador: Contributo no Desempenho do Rim  
Transplantado com Dador Vivo**

**Autor**

Sara Carina Ferreira Oliveira

**Orientador**

Professora Coordenadora/Especialista Maria Manuela Amorim, Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Análises Clínicas e Saúde Pública – Área de Especialização em Imunohemoterapia e Transplantação** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## **Agradecimentos**

À Dra. Cecília Mendes e à Dra. Paula Espírito Santo por todo o conhecimento que me transmitiram com bastante dedicação e por toda a ajuda, paciência, incentivo, orientação, compreensão e disponibilidade que demonstraram na realização deste trabalho.

À professora Manuela Amorim pela ajuda, paciência, orientação deste trabalho e disponibilidade.

Aos meus pais e ao meu namorado, pelo apoio e paciência nos momentos mais difíceis deste trabalho, com amor e carinho.

## **Resumo**

O estágio realizou-se na área de Transplantação do IPST-Porto, onde foram efetuadas metodologias automatizadas e avançadas de genotipagem HLA e de pesquisa e identificação de anticorpos HLA, enquadradas no âmbito do transplante renal. Teve como objetivo adquirir conhecimentos e competências nestas metodologias. Este estágio teve ainda como objetivo desenvolver competências de investigação tendo sido realizado um estudo de caso sobre o tema da influência dos anticorpos anti-HLA não específicos ao dador no transplante renal com dador vivo. Como evidenciado na literatura, a presença de anticorpos específicos contra o dador tem impacto prejudicial na sobrevida do enxerto renal.

Realizou-se um estudo analítico retrospectivo, numa amostra subdividida em duas subpopulações de recetores renais sem anticorpos HLA, verificando-se que a idade média dos recetores foi  $48 \pm 11,7$  e 73,4% dos recetores foram predominantemente do sexo masculino; e com anticorpos anti-HLA verificando-se que a idade média dos recetores foi  $50 \pm 13,6$  e 38,2% de recetores do sexo feminino foram transplantados com 65,5% de gestações.

O número reduzido de casuística relativamente à população estudada, não permitiu obter uma análise de resultados com significância estatística. No entanto, parece indicar não haver relação significativa entre a presença de anticorpos anti-HLA não específicos ao dador e a evolução do transplante.

**Palavras-chave:** Anticorpos anti-HLA; Anticorpos HLA não Específicos do Dador (Não DSA); Imunoensaio de Fase Sólida; Transplante de Rim.

## **Abstract**

The internship took place in the Transplantation area of IPST-Porto, where automated and advanced methodologies of HLA genotyping and research, and identification of HLA antibodies were carried out in the context of kidney transplantation. This internship aimed to acquire knowledge and skills in these methodologies. This internship also aimed to develop research skills by conducting a case study on the topic of the influence of non-donor-specific anti-HLA antibodies in living donor kidney transplantation. As evidenced in the literature, the presence of donor-specific anti-HLA antibodies has a detrimental impact on renal graft survival.

A retrospective analytical study was carried out, in a sample subdivided into two subpopulations of renal recipients without HLA, verifying that the age of the recipients was  $48 \pm 11.7$  and 73.4% of the recipients were predominantly male; and with anti-HLA antibodies, verifying that the mean age of recipients was  $50 \pm 13.6$  and 38.2% of female recipients were transplanted with 65.5% of pregnancies. The small number of cases related to the population studied did not allow for an analysis of results with statistical significance. However, there seems to be no significant relationship between the presence of non-donor-specific anti-HLA antibodies and the outcome of the transplant.

**Keywords:** Anti-HLA Antibodies; Non-Donor-Specific HLA Antibodies; Solid Phase Assays; Kidney Transplant.

## **Organização do Relatório de Estágio**

Este relatório descreve o estágio realizado no Instituto Português do Sangue e Transplantação (IPST)– do Porto na área da Transplantação, bem como o projeto desenvolvido e proposto pela instituição que se intitula “Anticorpos Anti-HLA não Específicos ao Dador: Contributo no Desempenho do Rim Transplantado com Dador Vivo”. De modo a organizar estas duas componentes de estágio este relatório está organizado em dois capítulos:

- Capítulo I – contextualiza o estágio, objetivos, metodologias e competências adquiridas e desenvolvidas.
- Capítulo II – desenvolve-se o projeto, com subdivisões da revisão bibliográfica, objetivos, metodologia, resultados, discussão e conclusão.

## **Índice**

Resumo .....	III
Abstract .....	IV
Organização do Relatório de Estágio.....	V
Lista de Abreviaturas .....	VIII
Índice de Tabelas.....	X
Índice de Figuras.....	X
<b>Capítulo I – Estágio.....</b>	<b>1</b>
1. Introdução .....	1
1.1. Caracterização do local de estágio.....	1
1.2. Contextualização do estágio.....	2
2. Objetivos de estágio .....	2
3. Metodologias.....	3
3.1. Soros do recetor e células do dador .....	3
3.2. Genotipagem HLA por NGS utilizando o kit AllType™ FASTplex™ .....	4
3.3. Isolamento de linfócitos com esferas imunomagnéticas de seleção negativa.....	4
3.4. Pesquisa de anticorpos anti-HLA por citotoxicidade mediada por complemento .....	5
3.5. Pesquisa de aloanticorpos HLA usando um painel reativo de anticorpos .....	6
3.6. Pesquisa e identificação de anticorpos anti-HLA classe I e II por citometria de esferas.....	6
4. Controlo de qualidade.....	7
<b>Capítulo II – Estudo de caso .....</b>	<b>1</b>
1. Introdução .....	1
1.1. Insuficiência renal crónica.....	1
1.2. Transplante renal .....	2
1.3. Tipos de transplante.....	3
1.4. Tipos de dador .....	3
1.5. Complexo major da histocompatibilidade e HLA.....	5

1.6. Sensibilização no transplante renal .....	<b>6</b>
1.7. Rejeição: hiperaguda, aguda e crónica.....	<b>7</b>
1.7.1. Rejeição mediada por células T.....	<b>8</b>
1.7.2. Rejeição mediada por anticorpos.....	<b>9</b>
1.8. Terapia imunossupressora .....	<b>10</b>
1.8.1. Indução .....	<b>10</b>
1.8.2. Manutenção.....	<b>11</b>
2. Objetivos.....	<b>11</b>
3. Material e Métodos.....	<b>12</b>
3.1. Tipo de estudo, população e amostra .....	<b>12</b>
3.2. Procedimento.....	<b>13</b>
3.3. Ética.....	<b>14</b>
3.4. Análise estatística .....	<b>14</b>
4. Resultados.....	<b>15</b>
4.1. Análise descritiva da população em estudo.....	<b>15</b>
4.2. Comparação das características dos recetores renais e respetivos doadores vivos sem anticorpos HLA e com anticorpos anti-HLA NDSA.....	<b>17</b>
5. Discussão .....	<b>19</b>
6. Conclusão .....	<b>20</b>
Referências Bibliográficas .....	<b>22</b>
Anexos.....	<b>31</b>

## **Lista de Abreviaturas**

**ABO:** Sistema Sanguíneo ABO

**AC:** Anticorpo

**ACD:** Ácido Citrato Dextrose

**AEQ:** Avaliação Externa da Qualidade

**APC:** Células Apresentadoras de Antígeno

**APCER:** Portuguese Association of Certification

**ATG:** Globulina Anti-timócito Policlonal

**CDC:** Citotoxicidade mediada por Complemento

**CEDACE:** Centro Nacional de Dadores de Células de Medula Óssea, Estaminais ou de Sangue do Cordão

**CH:** Centro de Histocompatibilidade

**CHUP:** Centro Hospitalar Universitário do Porto

**CHUSJ:** Centro Hospitalar Universitário do Hospital de São João

**CQI:** Controlo de Qualidade Interno

**DC:** Dador Cadáver

**DCE:** Critérios de Doação Expandidos

**DMC:** Dador após Morte Cerebral

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**DPC:** Dador após Paragem Cardiocirculatória

**DSA:** Anticorpo Específico Contra o Dador

**DTT:** Ditiotreitól

**DV:** Dador Vivo

**EFI:** Federação Europeia para a Imunogenética

**ESS|PPorto:** Escola Superior de Saúde do Politécnico do Porto

**FDA:** Administração de Alimentos e Medicamentos

**FTN:** Fator de Necrose Tumoral

**Ig:** Imunoglobulina

**HLA:** Antígeno Leucocitário Humano

**IL-2:** Interleucina-2

**IPS:** Instituto Português do Sangue

**IPST:** Instituto Português do Sangue e da Transplantação

**IRC:** Insuficiência Renal Crónica

**IRCT:** Insuficiência Renal Crónica Terminal

**IVIg:** Imunoglobulina Intravenosa

## **Lista de Abreviaturas (cont.)**

**MFI:** Intensidade Média de Fluorescência

**MHC:** Complexo Major da Histocompatibilidade

**MMF:** Micofenolato de Mofetil

**NDSA:** Anticorpos anti-HLA não Específicos ao Dador

**NEQAS:** National External Quality Assessment Service

**NGS:** Next Generation Sequencing

**NK:** Células Natural Killer

**PCR:** Reação em Cadeia de Polimerase

**PE:** Ficoeritrina

**PNA:** Pielonefrite Aguda

**PRA:** Painel Reativo de Anticorpos

**PRED:** Prednisolona

**RENDA:** Registo Nacional de Não Dadores

**RMA:** Rejeição Mediada por Anticorpos

**RMCT:** Rejeição Mediada por Células T

**SNS:** Serviço Nacional de Saúde

**SSOP:** Sondas Oligonucleotídicas Específicas para a Sequência

**SSP:** Primer Específico para a Sequência

**TA:** Temperatura Ambiente

**TAC:** Tacrolimus

**TCR:** Recetor de Células T

**TFG:** Taxa de Filtração Glomerular

**TSFR:** Tratamento Substitutivo da Função Renal

**UCLA:** University of California Los Angeles

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classificação dos estádios de DRC e respetiva TFG, segundo National Kidney Foundation.....	1
Tabela 2 – Características do recetor, parâmetros imunológicos e parâmetros clínicos.....	16
Tabela 3 – Características do dador.....	17
Tabela 4 – Comparação das características dos recetores renais e respetivos dadores, entre os grupos sem anticorpos HLA e com anticorpos anti-HLA NDSA.....	18

## Índice de Figuras

Figura 1 – Tubo BD Vacutainer para a colheita do soro do recetor (A) e tubo Vacuette® com anticoagulante ACD, para a colheita das células do dador (B).....	3
Figura 2 – Sistemas de sequenciamento Ion S5 TM e Ion Chef TM.....	4
Figura 3 – Interpretação da leitura do teste de CDC num microscópio invertido de fluorescência.....	6
Figura 4 – Teste de single-antigen beads para anticorpos anti-HLA.....	7
Figura 5 – Localização e organização do complexo HLA no cromossoma 6.....	5
Figura 6 – Estrutura das moléculas HLA de classe I e classe II.....	6
Figura 8 – População e amostra em estudo.....	12
Figura 9 – Principais causas de insuficiência renal crónica terminal.....	17

## Capítulo I – Estágio

### 1. Introdução

#### 1.1. Caracterização do local de estágio

Este Relatório é referente à unidade curricular de Estágio do curso de Mestrado de Análises Clínicas e Saúde Pública, na área de Especialização em Imunohemoterapia e Transplantação da Escola Superior de Saúde do Politécnico do Porto (ESS|PPorto). O estágio realizado decorreu nos Laboratórios de alossensibilização HLA e no de Genética, na área da Transplantação, do Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST) do Porto, no período compreendido entre fevereiro e setembro de 2022.

O IPST, é parte do Serviço Nacional de Saúde (SNS), proveniente da fusão dos Centros de Histocompatibilidade (CH) do Norte, Centro e Sul com o Instituto Português do Sangue (IPS) em 2012. Os CH foram fundados em 1980 e tem por missão garantir e regular a nível nacional a atividade da Medicina Transfusional e da Transplantação e garantir a dádiva, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento e distribuição do sangue humano, de componentes sanguíneos, de órgãos, tecidos e células de origem humana. Atualmente são designados como Centros do Sangue e da Transplantação do Norte, Centro e Sul e estão sediados no Porto, Coimbra e Lisboa, respetivamente. Estes Centros possuem áreas laboratoriais fundamentais para os estudos de Transplantação – área funcional da transplantação – que se divide em quatro secções: o laboratório de Separação de Células e de Citometria de fluxo; o laboratório de Imunogenética e o laboratório de Serologia HLA que são as duas secções onde realizei o meu estágio sendo a primeira responsável por determinar os polimorfismos do complexo major da histocompatibilidade (MHC) do sistema HLA, e a segunda é o laboratório responsável por avaliar o perfil imunológico da alossensibilização anti-HLA; e por fim a secção de atividade da Urgência que é transversal aos três laboratórios de histocompatibilidade do IPST.

Em 1995, foi fundado no CHSul, o Centro Nacional de Dadores de Células de Medula Óssea, Estaminais ou de Sangue do Cordão (CEDACE), que se tornou num dos maiores registos de dadores voluntários de células internacional e em Julho de 2009, foi criado o banco público de células estaminais – Lusocord – no CHNorte.

O IPST visa promover a dádiva com o objetivo de contribuir para uma melhoria do tempo e qualidade da vida humana.

## **1.2. Contextualização do estágio**

O estágio realizado decorreu no Laboratório de alossensibilização HLA e no Laboratório de Genética, na área da transplantação do IPST-Porto, no período compreendido entre fevereiro e setembro de 2022, o que permitiu desenvolver conhecimentos e competências técnico-científicas ao nível das metodologias realizadas para os pares dadores-recetores renais.

O laboratório de alossensibilização HLA é o responsável pela avaliação do perfil imunológico da alossensibilização anti-HLA, através da realização de várias técnicas. Os imunoensaios de *Crossmatch* por citotoxicidade mediada por complemento (CDC), por citometria de esferas e/ou pelo uso do painel reativo de anticorpos (PRA), empregues em diferentes equipamentos foram as metodologias que pude observar e executar neste laboratório.

No laboratório de genética realiza-se a caracterização de polimorfismos do complexo major da histocompatibilidade (MHC) do sistema antigénio leucocitário humano (HLA). Entre as metodologias que podem ser executadas para a genotipagem HLA, atualmente existe a do *Next Generation Sequencing* (NGS), cujo procedimento na rotina pode acompanhar de forma observacional.

Ao longo do período de estágio, a passagem por estas duas secções na área funcional da Transplantação iniciou-se por contactar com as suas rotinas diárias, permitindo compreender o funcionamento e organização dos laboratórios, adquirir aptidões sobre os princípios dos métodos e a aplicação das técnicas, utilizadas nos diferentes equipamentos, assim como proceder à análise e interpretação integrada e crítica dos resultados obtidos.

Todos os propósitos específicos que cada um destes laboratórios na sua prática individualmente, culminam num objetivo principal que é a seleção do melhor par dador-recetor de forma a evitar possíveis efeitos adversos determinantes para a viabilidade do transplante.

## **2. Objetivos de estágio**

- Aprender metodologias e técnicas utilizadas no laboratório de alossensibilização HLA e no laboratório de imunogenética.
- Adquirir competências técnico científicas sobre o funcionamento e organização dos laboratórios, dos princípios das metodologias e da aplicação das técnicas observando a organização e o funcionamento nos diferentes equipamentos.
- Proceder à análise e interpretação integrada e crítica dos resultados obtidos, nos referidos laboratórios.

### 3. Metodologias

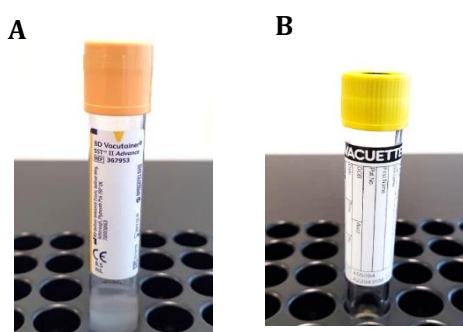
#### 3.1. Soros do recetor e células do dador

Segundo a Federação Europeia para a Imunogenética (EFI), secção E5.1 – Transplante Renal e/ou Pâncreas, para que se consiga alcançar a seleção do melhor par dador-recetor é crucial que todos os doentes que se encontram em lista de espera ativa para receber transplante renal, sejam submetidos a colheitas de sangue a cada 3 meses, ou conforme o que está estipulado pelas organizações nacionais e/ou internacionais de intercâmbio de órgãos (1). Esta regra é fundamental para a pesquisa de anticorpos anti-HLA bem como para a determinação das compatibilidades HLA no par dador-recetor. Com esse objetivo, aquando da avaliação para o transplante são colhidos os soros do recetor e as células do dador.

A amostra do recetor é obtida através da colheita de 8,5 mL de sangue periférico num tubo BD Vacutainer® (Becton Dickson, Mountainview, CA, EUA) sem anticoagulante que se destina à pesquisa de anticorpos anti-HLA no laboratório de alossensibilização HLA (Figura 1A). Até à realização dos ensaios, o tubo pode ser armazenado no frigorífico do laboratório a uma temperatura de -20°C.

A amostra do dador é obtida através da colheita de 9 mL de sangue periférico num tubo Vacuette® que contém o anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD) para a realização de genotipagem HLA no laboratório de genética (Figura 1B). Até à realização dos ensaios, o tubo pode ser armazenado no frigorífico do laboratório a uma temperatura de 4°C.

Após o transplante, a pesquisa de anticorpos anti-HLA, realizada pelo laboratório de alossensibilização HLA, torna-se um fator primordial na identificação precoce de doentes que se possam encontrar sob risco de rejeição. De forma a agilizar a prevenção deste acontecimento, a monitorização do recetor é realizada no 1º mês, 3º mês e 6º mês após o transplante e a cada ano ou perante uma suspeita de um episódio de rejeição (2).



**Figura 1** – Tubo BD Vacutainer para a colheita do soro do recetor (A) e tubo Vacuette® com anticoagulante ACD, para a colheita das células do dador (B).

### 3.2. Genotipagem HLA por NGS utilizando o kit AllType™ FASTplex™

A genotipagem HLA dos loci A, B, C, DRB1, DQB1, DQA1, DPB1 e DPA1 é realizada por *Next Generation Sequencing* (NGS), uma tipagem de alta resolução, que permite avaliar a histocompatibilidade entre o dador e o recetor, seguindo o protocolo AllType™ FASTplex™ NGS (One Lambda). Os reagentes necessários para esta técnica, são fornecidos pelo kit AllType FASTplex NGS 11 loci. Após a extração e quantificação do DNA, os 11 loci HLA são amplificados por reação em cadeia de polimerase (PCR), purificados e normalizados à concentração recomendada pela casa comercial. Seguem-se etapas de fragmentação aleatória e de identificação das amostras com um barcoding único para cada indivíduo, permitindo após esta etapa manusear as amostras em pool. Após a adição de uma nova identificação às amostras (Barcoding Universal), procede-se ao enriquecimento das livrarias, seleção dos tamanhos dos fragmentos e quantificação final. A seguir a esta etapa, as amostras estão prontas a ser carregadas no equipamento Ion Chef™, permitindo o carregamento de um chip com os fragmentos HLA, que posteriormente são sequenciados no equipamento Ion GeneStudio S5™ (Figura 2) (3,4).

O programa HLA TypeStream Visual NGS Analysis Software analisa os dados das sequências obtidas, permitindo determinar os genótipos HLA.



**Figura 2** - Sistemas de sequenciamento Ion S5™ e Ion Chef™. Imagem proveniente de Thermo Fisher Scientific, Sistemas de sequenciamento Ion S5™ & Ion Chef™. [Internet]. 2015 (4).

### 3.3. Isolamento de linfócitos com esferas imunomagnéticas de seleção negativa

O isolamento de linfócitos T e B do dador é realizado por esferas imunomagnéticas de seleção negativa e cumpre com as instruções dos kits para as células B e T (EasySep™ Direct HLA *crossmatch* T isolation kit; EasySep™ Direct HLA *crossmatch* B isolation kit; STEMCELL Technologies Inc) (5,6).

Para o isolamento de linfócitos T, foram adicionados 6 mL de amostra de sangue total e de seguida, 100 µL de Isolation Cocktail num tubo, a incubar durante 2 minutos à temperatura ambiente (TA). Posteriormente, colocou-se 100 µL de esferas imunomagnéticas à amostra que reconhecem

marcadores de superfície celulares específicos tendo como alvo células não T. As células não desejadas foram atraídas para a parede do tubo quando este é colocado numa coluna magnética a incubar durante 5 minutos à TA, possibilitando a remoção do sobrenadante para um novo tubo (6). De forma a concluir o isolamento das células T, procedeu-se à repetição dos dois últimos passos desta técnica, descartando-se as restantes células. O procedimento laboratorial ocorre de forma idêntica para o isolamento das células B.

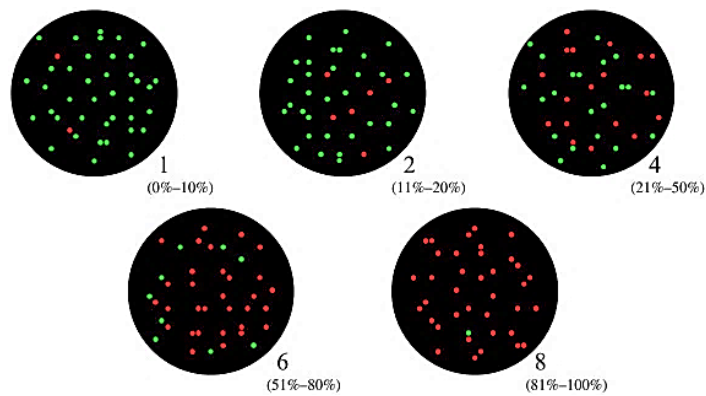
Como a suspensão de linfócitos T e B se destinou a ensaios de citotoxicidade, foram centrifugadas a 300 g durante 8 minutos à TA. O sobrenadante foi removido por inversão e a suspensão das células T e B foi ressuspensa em 200–500  $\mu$ L e 100–300  $\mu$ L de meio DPBS, respetivamente.

### **3.4. Pesquisa de anticorpos anti-HLA por citotoxicidade mediada por complemento**

O *crossmatch* por citotoxicidade mediada por complemento (CDC), introduzido em 1960 pelo Dr. Paul Terasaki e seus colegas, consiste em detetar anticorpos anti-HLA específicos contra o dador (DSA) (6,7).

Neste teste de CDC foi utilizada uma placa de Terasaki parafinada onde foi dispensado 1  $\mu$ L de controlo negativo IgG nos poços referentes a este. De seguida, foi colocado o soro do recetor nas quantidades de 2  $\mu$ L, 1  $\mu$ L e  $1/4$  diluído com tratamento de ditiotretol (DTT) nos respetivos poços da placa. Após a adição dos soros, foi distribuído por todos os poços 1  $\mu$ L da suspensão de células do dador e só no fim desta pipetagem é que foi colocado o controlo positivo de imunoglobulina G (IgG). Procedeu-se a uma incubação da placa durante 35 minutos à TA, permitindo ocorrer a ligação do complexo antígeno-anticorpo (6) Terminado o tempo de incubação, foi adicionado 5  $\mu$ L de soro de coelho como fonte de complemento com uma incubação de 75 minutos. O soro de coelho perante a presença de anticorpos anti-HLA DSA e dependentes do complemento provocará a lise dos linfócitos (6,7) A lise das células é detetada num microscópio invertido de fluorescência após a adição de 1  $\mu$ L de um corante vital de brometo de etídio-laranja de acridina (FluoroQuench™ One Lambda) em todos os poços da placa de *crossmatch* (6).

A análise dos resultados é efetuada através da atribuição de um sistema de pontuação (0,1,2,4,6,8) que corresponde à percentagem de lise celular. A interpretação é realizada da seguinte forma: score 0 representa sem leitura; score 1 (0%–10% de células lisadas) representa um *crossmatch* negativo; score 2 (11%–20% de células lisadas) representa um *crossmatch* negativo duvidoso; score 4 (21%–50% de células lisadas) representa um *crossmatch* positivo fraco; score 6 (51%–80% de células lisadas) representa um *crossmatch* positivo e score 8 (81%–100% de células lisadas) representa um *crossmatch* positivo forte (Figura 3) (6,8).



**Figura 3** – Interpretação da leitura do teste de CDC num microscópio invertido de fluorescência. Imagem proveniente de Gautreaux MD.2017 (8).

### 3.5. Pesquisa de aloanticorpos HLA usando um painel reativo de anticorpos

A pesquisa de aloanticorpos HLA usando o painel reativo de anticorpos (PRA) consiste na deteção, identificação e determinação da percentagem de anticorpos anti-HLA específicos contra o dador (9,10). Este teste é efetuado usando a técnica de microlinfocitotoxicidade mediada por complemento com a diferença apenas de que este utiliza um painel de células mononucleares (45-50 células), que deve ser representativo da população (7).

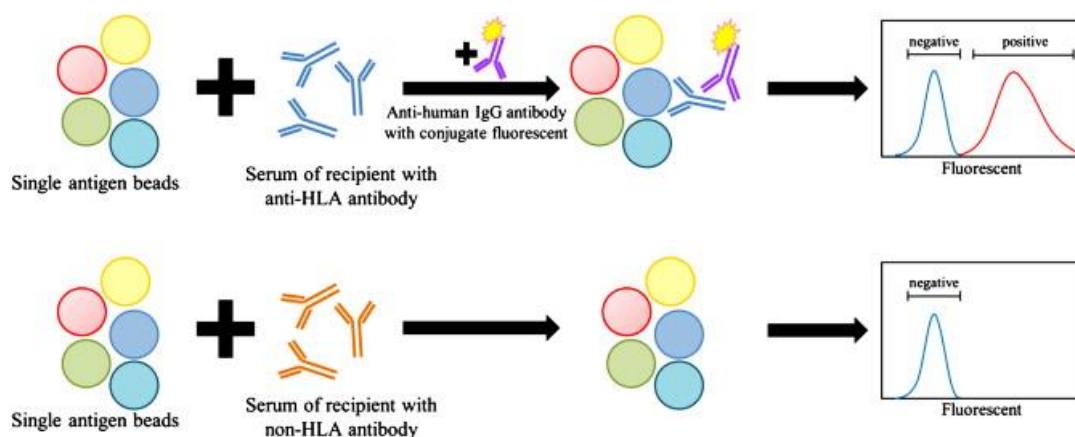
A interpretação dos resultados é realizada num microscópio invertido de fluorescência, sendo atribuída uma pontuação pela proporção de lise. O software Lambda Scan Analysis procede à análise dos dados, de forma a determinar a percentagem de PRA. Se o valor de percentagem de PRA for  $\geq 80\%$ , trata-se de um soro hipersensibilizado (11).

### 3.6. Pesquisa e identificação de anticorpos anti-HLA classe I e II por citometria de esferas

O imunoensaio que realiza a pesquisa e identificação de anticorpos anti-HLA classe I e II por citometria de esferas baseia-se na incubação do soro de um doente com microesferas revestidas com múltiplos antígenos HLA purificados para a classe I e classe II para pesquisa (LABScreen™ Mixed, One Lambda, Inc), ou com um único antígeno HLA para a classe I ou classe II para identificação (LABScreen® Single Antigen, One Lambda Inc) (7,12). Após as lavagens com tampão Xmap, as microesferas foram incubadas com um anticorpo secundário, nomeadamente, o soro de cabra anti-IgG humana conjugado com um fluorocromo ficoeritrina (PE) que permite detetar no soro testado a ligação dos anticorpos IgG aos antígenos, expressando-se assim a molécula HLA específica (Figura 4) (7,12) Posteriormente, são realizadas novamente lavagens com tampão Xmap.

A leitura é realizada no analisador FLEXMAP 3D® (Luminex, Inc, USA) que utiliza dois lasers, um para excitar o fluorocromo interno e o outro para excitar a ficoeritrina que permite a deteção do anticorpo. O grau de fluorescência é expresso como intensidade média de fluorescência (MFI). Um grau de MFI >1000 é considerado positivo.

O software HLA Fusion™ faz a análise dos resultados e determina a reatividade da amostra.



**Figura 4** – Teste de single-antigen beads para anticorpos anti-HLA. Imagem proveniente de Townamchai N, Safa K, Chandraker A.2013 (12).

#### 4. Controlo de qualidade

Os laboratórios de alossensibilização HLA e genética do IPST-Porto estão acreditados pelo EFI e certificados pela empresa *Portuguese Association of Certification (APCER)* segundo a norma ISO9001:2015, tendo implementados um sistema de controlo de qualidade que envolve o controlo de qualidade interno (CQI) e o controlo de qualidade externo (13).

O controlo de qualidade num laboratório é um processo que permite confirmar e garantir a qualidade da precisão e exatidão dos resultados dos métodos analíticos, detetando e corrigindo possíveis causas de erro na execução destes que, posteriormente, possam vir a comprometer a saúde dos doentes (14).

O controlo de qualidade interno trata-se de um registo intralaboratorial aplicado diariamente para avaliar a precisão dos resultados dos métodos utilizados através de amostras que possuem valores analíticos definidos (14,15). Para tal, são utilizados o controlo positivo e o controlo negativo para o estudo de pesquisa e identificação de anticorpos anti-HLA. Para a validação do método referente ao estudo da genotipagem HLA no laboratório de genética foi utilizado como CQI os primers de controlo interno.

O controlo de qualidade externo trata-se de um registo interlaboratorial que consiste na avaliação da exatidão dos resultados de testes laboratoriais por um organismo externo e independente da

qualidade. Com esse objetivo, a avaliação externa da qualidade (AEQ) faz uma comparação do desempenho destes laboratórios com outros laboratórios a nível nacional e/ou internacional, que utilizem as mesmas metodologias de forma a garantir a exatidão dos resultados analíticos (14,15). O controlo de qualidade externo do laboratório de alossensibilização HLA é assegurado pelo programa *International Quality Expertise UK (NEQAS – National External Quality Assessment Service)* e o controlo de qualidade externo do laboratório de genética é assegurado pelo programa internacional *University of California Los Angeles (UCLA)*.

## Capítulo II – Estudo de caso

### 1. Introdução

#### 1.1. Insuficiência renal crónica

A insuficiência renal crónica (IRC) é atualmente considerada um problema de Saúde Pública associada a uma elevada morbidade e mortalidade, que afeta cada vez mais a população mundial (16). Definida por alterações na estrutura e função renal, esta doença é caracterizada por ser de evolução lenta, progressiva e irreversível. Os rins perdem a capacidade de filtrar o sangue levando à acumulação de substâncias tóxicas (ureia, creatinina, sódio, potássio) no organismo (17).

A causa principal associada à IRC ainda não se encontra bem definida, no entanto na maioria dos casos é secundária a outras doenças tais como a diabetes, hipertensão arterial, glomerulonefrite, rins poliquísticos, doenças hereditárias, infeções recorrentes do trato urinário, obesidade e doenças autoimunes (17,18). A diabetes e a hipertensão arterial como principais fatores de risco de IRC, são também a principal causa de doenças cardiovasculares, o que significa que os doentes com insuficiência renal crónica estão em risco considerável de desenvolver estas doenças (18,19).

Um doente diagnosticado com IRC apresenta uma taxa de filtração glomerular (TFG)  $<60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ , albuminúria elevada ou presença de marcadores de lesão renal, ou ambos, mantidos por um período igual ou superior a três meses, com evidência de anormalidades na estrutura ou função renal (20,21). Os marcadores de lesão renal são identificados através da análise ao sangue, urina, exames de imagem e biópsia renal, se necessário (22). Quanto ao quadro de sintomas, estes doentes são na maioria assintomáticos à exceção de quando atingem uma fase mais avançada da doença (17).

A insuficiência renal crónica é categorizada em cinco estádios baseados na TFG, segundo a *National Kidney Foundation* (Tabela 1) (23)

**Tabela 1** – Classificação dos estádios de DRC e respetiva TFG, segundo *National Kidney Foundation* (23).

Estádios	TFG (mL/min/1,73 m <sup>2</sup> )	Classificação
1	>90	Normal
2	60-89	Diminuição ligeira
3a	45-59	Diminuição ligeira-moderada
3b	30-44	Diminuição moderada-grave
4	15-29	Diminuição severa
5	<15	Insuficiência renal

O agravamento progressivo da função renal leva à insuficiência renal crónica terminal (IRCT). A IRCT é definida pela perda total ou praticamente total da função renal com uma TFG  $<15 \text{ mL}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$  (estádio 5) e é caracterizada pela presença de sintomas como fadiga, edema periférico, prurido, poliúria e falta de apetite nos doentes (21,24).

Atingindo as fases mais avançadas de IRC, estádios 4 e 5, os doentes devem ser imediatamente encaminhados para um médico nefrologista com o objetivo de receberem orientações sobre a doença e preparar o melhor tratamento substitutivo da função renal (TSFR) ou realizar o tratamento conservador (18,19,21). O TSFR inclui a hemodiálise, diálise peritoneal e transplante renal (25). Para a realização de hemodiálise ou diálise peritoneal devem ser facilitadas a criação prévia de um acesso vascular como a fístula arteriovenosa, enxerto arteriovenoso ou cateter venoso central (26–28).

## **1.2. Transplante renal**

O transplante, ou transplantação, é a transferência de células, tecidos ou órgãos de uma pessoa (dador), para outra (recetor), ou de uma parte do corpo para outra que tem como finalidade, repor uma função perdida ou reconstruir uma parte do corpo. Neste processo ocorre uma intensa reação inflamatória onde o órgão transplantado é reconhecido como estranho, ou não próprio, pelo sistema imunológico do recetor, sendo por isso essencial o controlo da resposta imunológica para o sucesso do transplante (29).

O transplante renal é a melhor e mais eficaz alternativa terapêutica à diálise para os doentes que apresentam uma taxa de filtração glomerular  $<15 \text{ mL}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$  com evidência de insuficiência renal crónica terminal, permitindo-lhes uma melhor qualidade de vida (30,31). O primeiro transplante renal foi realizado em 1954 na cidade de Boston entre gémeos idênticos e foi bem sucedido, sendo logo considerado um procedimento que poderia salvar vidas (32).

Contudo, nem todos os doentes estão indicados para receber este TSFR por apresentarem incapacidade de tolerar a cirurgia devido a doenças pulmonares ou cardíacas, terem infeções ativas, doenças psiquiátricas não controladas, obesidade mórbida, histórico de incumprimento de diálise ou de medicação e expectativa de vida limitada, definida como menor do que o tempo na lista de espera para transplante (33).

Além de ser uma terapêutica com elevado êxito, o transplante também não deixa de estar livre de complicações sendo a rejeição – no âmbito do transplante renal pode ser uma rejeição humoral ou celular, hiperaguda, aguda ou crónica – a principal causa de perda de função do enxerto (32). A rejeição do rim deve-se a vários fatores imunológicos como o grau de compatibilidade no sistema HLA e no

grupo ABO e a sensibilização dos doentes para os antigénios HLA (32). Atualmente, é possível remover algumas destas barreiras imunológicas no transplante através da utilização do processo de dessensibilização no doente, promovendo posteriormente uma melhor sobrevida deste e do enxerto a longo prazo (34). Além disso, o uso adequado da terapia imunossupressora pelos doentes após o transplante é crucial e obrigatório para evitar a rejeição do órgão transplantado (29,32). É de se destacar a necessidade de acompanhamento crítico e individualizado do doente transplantado pelos profissionais de saúde, garantindo a sobrevida do enxerto a longo prazo, o retorno dos doentes às suas atividades de vida habituais, com o conhecimento suficiente para manter o enxerto e com habilidades de autocuidado possibilitando um estilo de vida mais adequado (29,32).

### **1.3. Tipos de transplante**

Existem dois grandes grupos de transplante: o transplante de órgãos sólidos tais como, o rim, o fígado, o coração, o pulmão e o transplante de tecidos tais como, a medula óssea, células endócrinas e pele.

Os diversos tipos de transplante que envolvem tecidos e órgãos são: o autotransplante, que é um transplante praticado no mesmo indivíduo; o alotransplante é o tipo mais frequente de transplante, que ocorre entre indivíduos da mesma espécie, mas geneticamente diferentes; o isotransplante, que ocorre entre indivíduos geneticamente idênticos; e o xenotransplante que envolve tecidos ou órgãos transplantados entre espécies diferentes (35–37).

A compatibilidade do grupo sanguíneo ABO entre dador e recetor, é um passo essencial para a redução do risco de rejeição. Durante muito tempo, a incompatibilidade ABO foi considerada uma contraindicação para a transplantação devido à presença de isohemaglutininas pré formadas, que são anticorpos naturais que reagem contra os antigénios ABO não específicos. Contudo, atualmente integra um dos vários tipos de transplante que é realizado devido à aplicação de estratégias como a dessensibilização, que providencia a redução dos níveis de isohemaglutininas permitindo o alcance da tolerância humoral (38,39). Contudo, ainda existe uma percentagem considerável de casos onde a presença de incompatibilidades ABO ou HLA entre o dador e o recetor, não permite que o par dador vivo seja transplantado (40). De forma a ultrapassar este problema, recorre-se ao uso do transplante renal cruzado que permite a troca do órgão a ser transplantado entre um par dador/recetor incompatível com um ou mais pares de dador/recetor, para os quais apresentam compatibilidade, permitindo assim a realização e sucesso do transplante (40,41)

### **1.4. Tipos de dador**

Na transplantação renal são considerados dois grandes grupos de dador – o dador cadáver (DC) e o dador vivo (DV). O dador cadáver, é um indivíduo que se encontra em paragem cardiocirculatória ou em morte cerebral candidato à doação do órgão para transplante. Segundo a legislação portuguesa, um

potencial DC não pode estar inscrito no Registo Nacional de Não Dadores (RENNDA) e deve existir um consentimento presumido ou informado do mesmo em vida ou dos seus familiares (42,43).

Os dadores após paragem cardiocirculatória (DPC), também designados de “dadores de coração parado” são aqueles cuja função cardíaca cessou antes da colheita do órgão. Por outro lado, os dadores após morte cerebral (DMC) são os que englobam os indivíduos que sofreram logo morte cerebral, permanecendo as funções cardíaca e respiratória intactas (42). Na maioria dos países, os órgãos são colhidos principalmente de dadores após morte cerebral devido a apresentarem uma maior viabilidade do enxerto (44).

O dador vivo é um indivíduo que voluntariamente doa um órgão ou um segmento de órgão para transplante (42). Inicialmente, esta doação só era permitida entre um par dador/recetor geneticamente relacionados (pai, irmão ou filho). No entanto, de forma a aumentar o pool de DV a doação viva é aceite também nos pares dador/recetor não relacionados (cônjuge, amigo ou conhecido) e na doação altruísta direcionada (o dador escolhe o recetor a quem quer doar o órgão) ou não direcionada (indivíduo anónimo) (45,46).

Antes da realização de um transplante renal, o dador vivo deve ser informado detalhadamente sobre as vantagens e possíveis consequências que envolve todo o processo da doação e estar apto para tomar uma decisão sobre a mesma. Deve também ser avaliado para excluir qualquer tipo de risco que o possam afetar a ele e ao recetor aquando do transplante.

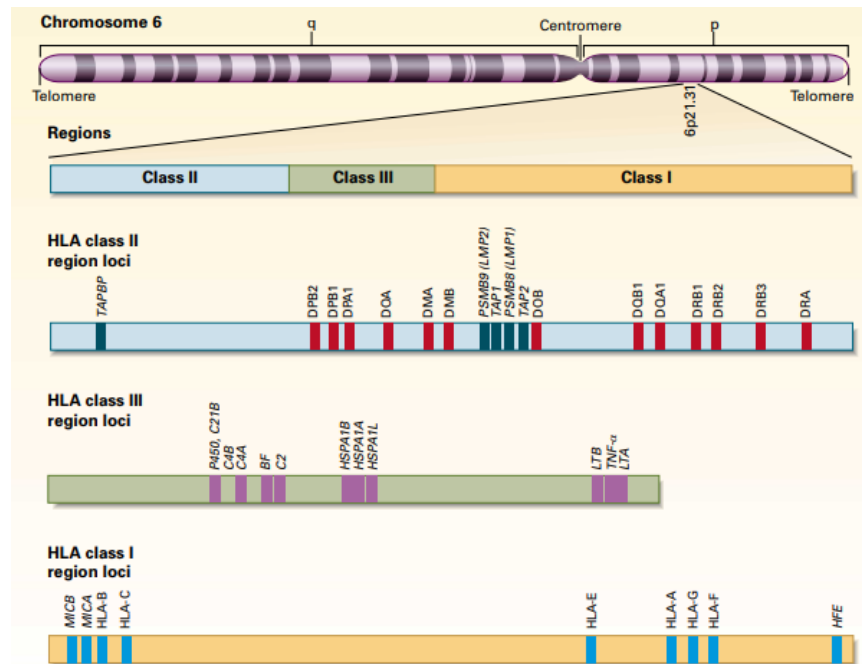
O transplante renal com dador vivo quando comparado com dador cadáver apresenta uma melhor sobrevida do enxerto e do doente o que, conseqüentemente, reduz o número de rejeições, reduz o tempo de isquemia fria e o tempo de espera em diálise, facilita o transplante preemptivo (transplante realizado antes do início de diálise) e permite uma maior expansão do pool total de dadores. Além disso, o tempo de semivida do aloenxerto renal com dador vivo é de 21,6 anos comparado com o de dador cadáver que é de 13,8 anos (45–47).

Sendo o dador vivo e o dador cadáver duas entidades fulcrais no combate à escassez de órgãos, tem sido implementado critérios de doação expandidos (DCE) para aumentar o pool de dadores e conseqüentemente reduzir a lista de espera para transplante.

Os DCE no dador cadáver são estabelecidos segundo o risco relativo de falha de enxerto  $>1,7$  e incorporam fatores como a idade do dador, história de hipertensão arterial, nível de creatinina  $>1,5$  mg/dL e a causa de morte (48). Em contrapartida, os DCE no dador vivo incluem dadores não relacionados geneticamente, dadores com idade avançada, hipertensão leve, obesidade ou transplantes cruzados ultrapassando barreiras imunológicas como a incompatibilidade ABO e HLA (45). A aplicabilidade destes critérios não deixa de comportar riscos para os dadores.

## 1.5. Complexo major da histocompatibilidade e HLA

O Complexo Major da Histocompatibilidade (MHC), é um locus genético altamente poligênico e polimórfico que se localiza no braço curto do cromossoma 6 na posição 6p21.3 (Figura 5) (49,50). Inicialmente descrito por Jean Dausset em 1958, esta região do genoma que constitui a versão humana do MHC é designada de antígeno leucocitário humano (HLA) que tem como função a apresentação de peptídeos antigénicos na superfície celular para o reconhecimento pelas células T (51–53).

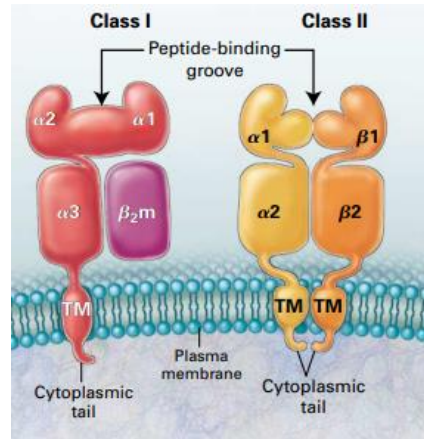


**Figura 5** – Localização e organização do complexo HLA no cromossoma 6. Imagem proveniente de Klein J, Sato A. 2000 (50).

O MHC está subdividido em três regiões: classe I, classe II e a classe III de acordo com a estrutura e função dos seus genes, que desempenham um papel importante no nosso complexo e adaptativo sistema imunológico (54). O MHC de classe I é composto pelos loci HLA-A, -B e -C expressos na superfície de todas as células nucleadas e nas plaquetas apresentando antígenos peptídicos aos receptores de células T (TCR) em linfócitos T CD8+. Estes desempenham um papel importante nas defesas antivíricas e anti-tumorais, pois destroem as células infetadas por vírus ou células de tumor (49,54). A estrutura destas moléculas HLA tem por base uma cadeia alfa pesada ligada a uma molécula  $\beta$ 2 microglobulina e consiste em dois domínios de ligação de peptídeo, um do tipo imunoglobulina (Ig) e uma região que atravessa a membrana com um prolongamento no citoplasma (Figura 7) (50,54).

O MHC de classe II é composto pelos loci HLA-DR, -DP e -DQ expressos predominantemente nos linfócitos B e na superfície de células apresentadoras de antígenos, tais como os macrófagos e as células dendríticas apresentando assim antígenos exógenos às células T CD4+ que têm um papel vital

nas respostas eficazes dos anticorpos (49,54). A estrutura destas moléculas HLA é formada por duas cadeias polipeptídicas, a alfa e a beta, em que cada uma delas possui um domínio de ligação do peptídeo, tal como acontece na estrutura das moléculas de MHC de classe I (Figura 6) (50,54).



**Figura 6** – Estrutura das moléculas HLA de classe I e classe II. Imagem proveniente de Klein J, Sato A. 2000 (50).

O MHC de classe III inclui genes que codificam algumas moléculas do sistema inflamatório, como componentes do sistema de complemento C2, C4 e fator B, fatores de necrose tumoral (FTN)-alfa, entre outros (54).

As moléculas de MHC de classe I e II são os antígenos mais imunogénicos encontrados na transplantação. O determinante antigénico mais forte é o HLA-DR, seguido pelo HLA-B e HLA-A que são os mais importantes a serem correlacionados entre dador e recetor. Por outro lado, as moléculas MHC de classe III que não atuam na apresentação de antígenos às células T e por isso não codificam proteínas de interesse para a transplantação (6,55).

## 1.6. Sensibilização no transplante renal

A sensibilização prévia de um recetor de transplante renal contra os antígenos HLA desenvolve-se devido à exposição durante as gestações, as transfusões sanguíneas, os transplantes prévios, as infeções por vírus ou bactérias, que podem levar a uma rejeição mediada por anticorpos (RMA) (56,57). Uma das principais causas deste tipo de rejeição deve-se à presença de anticorpos dirigidos para o órgão, sendo de especial relevância os que são específicos contra o dador (DSA), cujo significado clínico encontra-se bem definido (30,58). Por outro lado, o mesmo não acontece com os anticorpos não específicos ao dador (NDSA) cujo significado clínico ainda permanece controverso. É fundamental haver um conhecimento do risco imunológico associado a estes anticorpos pré formados pois este pode impactar decisões clínicas no transplante (59,60). Além disso, a sua interpretação deve ser cuidadosa pois em determinados casos estes podem ter as mesmas especificidades que os anticorpos DSA (59).

A identificação de anticorpos anti-HLA e a determinação da sua relevância clínica no pré transplante definida por imunoenaios de fase sólida aplicados em regime laboratorial, tornam-se num fator fundamental para a segurança e sucesso do transplante renal. Os doentes hipersensibilizados com a presença de anticorpos DSA são contraindicados para o transplante e por consequência, apresentam uma maior dificuldade em encontrar um dador compatível permanecendo mais tempo em lista de espera ativa para receber transplante. Além disso, existem vários estudos na literatura que demonstram o efeito deletério destes anticorpos na sobrevida do enxerto renal (30,57).

No período pós transplante, a pesquisa de anticorpos anti-HLA torna-se um fator primordial na identificação precoce dos doentes que se possam encontrar sob risco de rejeição de forma a agilizar a prevenção deste acontecimento. A monitorização do recetor para a pesquisa de anticorpos anti-HLA, é realizada no 1º mês, 3º mês e 6º mês após o transplante e a cada ano ou perante uma suspeita de um episódio de rejeição (2).

A determinação e prevenção dos fatores de risco imunológicos no pré e pós transplante com recurso a métodos laboratoriais, são importantes na estratificação do risco associado ao transplante.

### **1.7. Rejeição: hiperaguda, aguda e crónica**

Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas, na imunologia e na introdução de novos agentes imunossuppressores no transplante renal, a rejeição continua a ser o principal obstáculo na sobrevida do aloenxerto a longo prazo.

A rejeição do enxerto renal é definida por uma reação imunológica contra os antígenos do dador que são reconhecidos como não próprios pelo sistema imunológico do recetor (61,62). Caracterizada por manifestações clínicas e/ou histopatológicas que se desenvolvem em surtos denominados episódios de rejeição, pode se dar na fase imediata ao transplante, em dias, meses ou tardiamente. O seu diagnóstico realiza-se através da medição do nível de creatinina sérica, pois quando existe um aumento súbito de creatinina acima de 25% do valor basal o clínico deve suspeitar a ocorrência de uma possível rejeição do enxerto renal, ou através de uma biópsia renal que avalia a condição do enxerto (61,63).

A rejeição pode ser mediada por células – rejeição mediada por células T (RMCT), ou por anticorpos – rejeição mediada por anticorpos (RMA). Conforme o tempo pós transplante e a participação dos elementos agressores e agredidos, a rejeição do transplante renal classifica-se em:

- Rejeição hiperaguda, é o tipo de rejeição mais grave e atualmente menos frequente de ocorrer. Caracteriza-se pela disfunção súbita e irreversível do enxerto, minutos a horas após revascularização devido à presença de anticorpos citotóxicos pré formados no recetor causados por sensibilização prévia, contra os antígenos do dador (61).

- Rejeição aguda, é o principal determinante da ocorrência de disfunção e perda de enxerto, caracterizada por apresentar evidências histológicas como a tubulite, inflamação intersticial, glomerulite e arterite. É a rejeição mais comum, que ocorre frequentemente no terceiro mês após o transplante, sendo definida por uma reação de hipersensibilidade tardia geralmente predominante nos linfócitos T. A maioria dos doentes que sofrem este tipo de rejeição são assintomáticos não estando por isso acompanhados de sintomas característicos como a febre, diminuição da produção da urina, dor e aumento do volume do enxerto, devido à intensificação do tratamento com agentes imunossupressores a que estão submetidos. O diagnóstico desta rejeição baseia-se em grande parte na análise histológica obtida pela avaliação da biópsia renal (61).

- Rejeição crónica, que ocorre meses a anos após o transplante apresentando uma deterioração progressiva e irreversível da função do enxerto renal com evidências histológicas de fibrose intersticial, atrofia tubular, glomerulopatia do transplante e arteriopatia do transplante. Associada a fatores imunes e não imunes, os fatores de risco que levam à sua ocorrência incluem modificações patológicas do órgão e infeções. Contudo, o principal fator de risco deve-se à não adesão à terapia de imunossupressão (62,64).

A rejeição crónica é considerada uma importante complicação sendo o principal fator limitante da sobrevida na fase tardia do enxerto, não existindo um tratamento imunossupressor estabelecido.

### **1.7.1. Rejeição mediada por células T**

A rejeição mediada por células T (RMCT), é caracterizada pela infiltração das células T efetoras, CD4 e CD8, das células B, macrófagos ativados e por células do plasma no enxerto, demonstrando efeitos de interferão- $\gamma$ , aumento da expressão de quimiocinas, alterações na permeabilidade capilar e matriz extracelular e deterioração da função parenquimatosa (65). Além disso, quando não tratada leva à perda irreversível do enxerto renal.

O processo de RMCT inicia-se pelo reconhecimento dos antígenos do dador pelos linfócitos do recetor que ocorre nos órgãos linfóides secundários onde as células apresentadoras de antígeno (APC) ativam as células T, que sofrem expansão clonal e diferenciação para exercer as suas funções efetoras. O antígeno ativa os recetores de células T (TCR) – sinal 1 e promove a formação de sinapses. A presença do C80 e CD86 nas APC compromete o CD28 na célula T de forma a fornecer o sinal 2. Estes sinais ativam as três vias de transdução de sinal que envolvem: (1) via cálcio-calcineurina; (2) via da proteína quinase ativada por mitogénio e (3) via da proteína quinase C-fator nuclear kB (NF-kB). Os linfócitos T CD8+ ou citotóxicos são responsáveis pelo reconhecimento e destruição das células alvo (65).

O diagnóstico de RCMT aguda e crónica depende das alterações morfológicas na região tubulointersticial. Segundo a classificação de Banff de 1991, os critérios de diagnóstico para a RCMT

aguda envolve inflamação ativa do interstício, vasos e túbulos não atróficos. Por outro lado, após a atualização dos critérios de classificação de Banff em 2017, a RMCT crónica tem de apresentar no seu diagnóstico uma pontuação >2 de inflamação do túbulo intersticial (62).

### **1.7.2. Rejeição mediada por anticorpos**

A rejeição mediada por anticorpos (RMA) é causada pela presença de anticorpos DSA que uma vez ligados aos antigénios no aloenxerto renal provocam danos no órgão através de mecanismos que incluem a ativação do complemento, a ligação do recetor Fc, a ativação das células natural killer (NK) e a reticulação dos antigénios. Os anticorpos DSA pré formados podem resultar de eventos sensibilizantes como gestações, transfusões sanguíneas ou transplantes prévios sendo fundamental a sua pesquisa e identificação através de imunoensaios de fase sólida. Quando presentes em títulos elevados nos doentes é contraindicado realizar o transplante. Além disso, o desenvolvimento de anticorpos DSA de novo após o transplante pode ocorrer e encontra-se igualmente associado a um mau prognóstico na sobrevivência do aloenxerto a longo prazo, como acontece nos anticorpos pré formados. Torna-se fundamental prevenir a imunidade humoral contra o transplante, reduzir o desenvolvimento de anticorpos DSA ou bloquear diretamente os efeitos patogénicos destes com a implementação de novas estratégias (66).

A rejeição mediada por anticorpos é caracterizada por evidências histológicas que diferem perante uma RMA aguda e uma RMA crónica. Nos aloenxertos renais, a RMA aguda é caracterizada por inflamação microvascular tal como uma glomerulite ou capilarite peritubular, por uma trombose capilar e possivelmente por uma arterite, ao contrário do que observa na RMA crónica que é caracterizada por uma glomerulopatia do transplante (61).

O diagnóstico de RMA, de acordo com a classificação de Banff 2017, exige a deteção de inflamação microvascular na biópsia, a presença de lesão tubular aguda e microangiopatia trombótica, evidência de ativação do complemento por deposição de C4d em capilares peritubulares e presença de DSA no soro do recetor. Além disso, um novo critério surgiu na classificação de Banff que se refere à ausência de depósitos C4d na presença de DSA, sendo a rejeição designada por rejeição mediada por anticorpos não fixadores do complemento. Os doentes que apresentem estes diagnósticos têm associados a si uma menor sobrevivência do enxerto (66,67).

O tratamento da RMA tem como objetivo a remoção de anticorpos DSA ou bloquear a ativação do complemento. Na RMA aguda, o protocolo do tratamento inclui o uso de corticosteróides em elevadas doses, plasmaférese e imunoglobulina intravenosa (IVIg). Por outro lado, o mesmo não acontece na RMA crónica pois os tratamentos aplicados nesta não demonstram ainda benefícios (61).

## **1.8. Terapia imunossupressora**

O uso da terapêutica imunossupressora no transplante renal é obrigatório, como forma de prevenir a rejeição do órgão transplantado. Contudo, pode provocar efeitos adversos como a toxicidade não imune a outros tecidos e as infeções e determinadas neoplasias associadas à intensidade da imunossupressão aplicada e não ao uso do agente imunossupressor em específico (68). Estes efeitos são consequência do facto de as respostas do sistema imunológico se encontrarem suprimidas para evitar a rejeição do órgão.

Na era inicial dos transplantes, a terapia imunossupressora consistia apenas na irradiação corporal total. Posteriormente, de forma a induzir a tolerância imunológica, os primeiros imunossupressores utilizados foram a 6-Mercapturina e o Metotrexato, ambas drogas tóxicas e ineficazes. No ano de 1960, foi introduzida a Azatioprina, um composto derivado da 6-Mercapturina, menos tóxico, e os glicocorticoides (Prednisolona), que transformaram o campo da transplantação renal numa realidade promissora. Os usos combinados destes agentes imunossupressores constituíram um regime imunossupressivo utilizado durante 2 décadas (69,70).

Na década de 80 ocorreu um grande avanço na imunossupressão com o uso de novos agentes imunossupressores que permitiram resultados significativos a longo prazo do enxerto. Alguns dos novos agentes imunossupressores introduzidos foram: a Ciclosporina uma potente droga imunossupressiva; o OKT3; o Tacrolimus; o Micofenolato de Mofetil; Daclizumab; Basiliximab; Sirolimus; Everolimus e Belatacept (69,71). O Micofenolato de Mofetil após ter sido aprovado pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA), substituiu a Azatioprina em grande parte dos regimes imunossupressivos devido a apresentar uma reduzida incidência da rejeição aguda no transplante renal e reduzida toxicidade (72). Grande parte destes novos agentes imunossupressores continuam em uso até a atualidade, proporcionando uma imunossupressão mais diversificada e complexa.

A imunossupressão clínica pode ser dividida em: terapia de indução e a terapia de manutenção.

### **1.8.1. Indução**

A terapia de indução consiste em eliminar ou modificar a função das células T antes da apresentação aos antígenos do dador. É responsável pela administração de doses elevadas de imunossupressores no período pré e/ou pós transplante até 10 dias, de forma a prevenir uma rejeição precoce (56,69). Atualmente, o tratamento de indução inclui agentes imunossupressores biológicos que são representados pelos anticorpos monoclonais ou policlonais. Os anticorpos monoclonais incluem OKT3, alemtuzumab, basiliximab e antagonistas do recetor da interleucina-2 (IL-2) que se ligam à cadeia do antígeno CD25 inibindo a ligação do IL-2 ao seu recetor, impedindo assim a ativação dos linfócitos T.

Por outro lado, o principal anticorpo policlonal utilizado para a indução no transplante, é a globulina anti-timócito policlonal (ATG) que se liga às células da superfície dos antígenos nos linfócitos T provocando lise celular que pode ser mediada por complemento ou por apoptose (69,73).

A escolha de um regime de indução baseia-se no perfil de risco imunológico dos receptores renais para a rejeição, tendo em consideração os seguintes fatores de risco imunológico: idade do recetor jovem, idade do dador, elevada incompatibilidade HLA, raça negra, PRA >0, DSA, tempo de isquemia fria >24 h, incompatibilidade ABO e função renal tardia (69).

No transplante renal, não se encontra definido o melhor regime de indução. Contudo, tem sido demonstrado que a terapia de indução associada à terapia de manutenção demonstra melhores resultados do que o uso isolado de regimes de imunossupressão de manutenção nos receptores renais que apresentam elevado risco imunológico.

### **1.8.2. Manutenção**

A terapia de manutenção inclui o uso de dois ou mais agentes imunossupressores usados em combinação dupla ou tripla, sendo administrada durante um período indefinido de forma a manter a sobrevida do enxerto a longo prazo. Atualmente, a combinação de imunossupressores mais comumente utilizada consiste num regime triplo de tacrolimus, micofenolato de mofetil e prednisolona (56,69).

Após o transplante, a toma rigorosa destes medicamentos imunossupressores de manutenção acompanha o paciente para o resto da vida de forma a manter uma sobrevida do enxerto a longo prazo (69). No entanto, poderá mesmo assim ocorrer uma rejeição do enxerto que pode ser provocada por diversos fatores.

## **2. Objetivos**

Este estudo tem como objetivo avaliar a presença de anticorpos anti-HLA não específicos ao dador no transplante renal com dador vivo e a sua influência na evolução do enxerto.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Tipo de estudo, população e amostra

Realizou-se estudo analítico retrospectivo em que foram analisados 259 recetores e respetivos dadores vivos, submetidos a transplante renal do Centro Hospitalar Universitário do Porto (CHUP) e do Centro Hospitalar Universitário do Hospital de São João (CHUSJ), no período de março de 2014 a abril de 2022.

Na amostra foram incluídos os registos de todos os dadores vivos e respetivos recetores de transplante renal que apresentaram anticorpos anti-HLA DSA e os registos de todos os recetores que não apresentaram anticorpos anti-HLA contra os locus determinados na tipagem do dador vivo. Para o mesmo período de análise, foram também incluídos os registos de recetores sem anticorpos anti-HLA para a população controlo. Foram excluídos da amostra os recetores renais que apresentaram tipagem incompleta para os locus Cw, DQ, e DP (n=32), que possuíam anticorpos anti-HLA DSA (n=56) e que apresentaram ausência de análise serológica após o transplante (n=16), definindo-se assim os restantes 155 recetores de transplante renal com dador vivo, como a coorte a ser estudada (Figura 7). Todos os recetores foram transplantados com um resultado de CDC *crossmatch* negativos para células T e B.

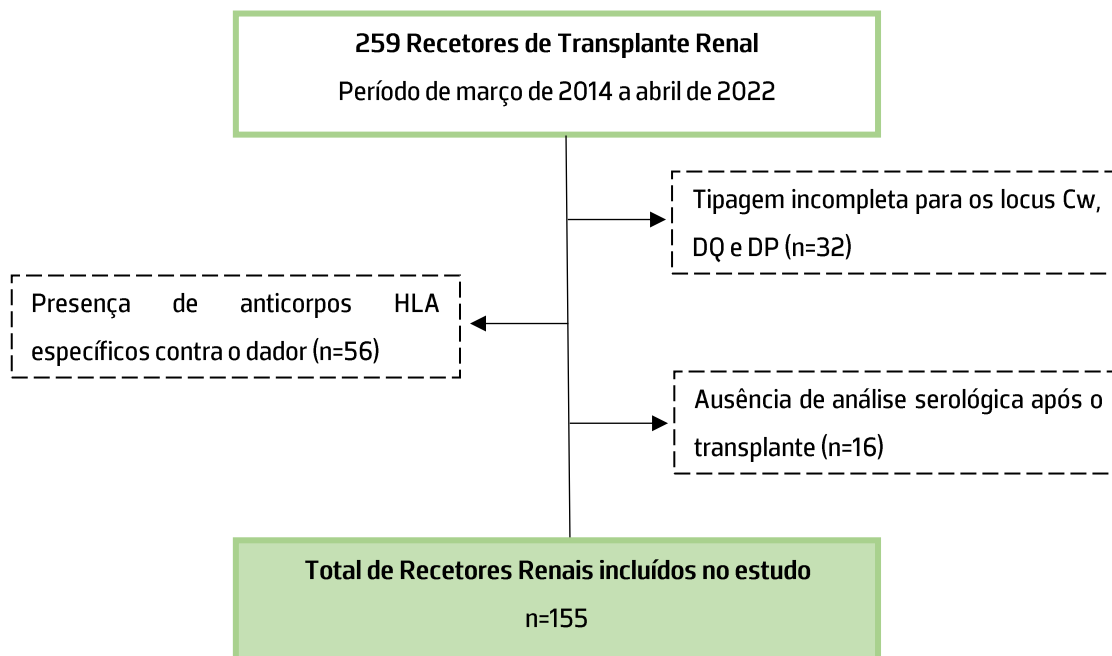


Figura 7 – População e amostra em estudo.

### 3.2. Procedimento

Os pares dador/recetor submetidos a transplante renal foram avaliados para as seguintes variáveis: dados demográficos (sexo, idade, número de gestações, número de transfusões sanguíneas, número de transplantes prévios e grau de parentesco), parâmetros clínicos (insuficiência renal crónica, tratamento substitutivo de função renal, função renal tardia, terapia de imunossupressão, sobrevida do enxerto e episódios de rejeição do órgão), parâmetros imunológicos (presença de anticorpos anti-HLA NDSA, PRA, compatibilidade HLA e compatibilidade ABO). A variável idade para os pares dador/recetor foi agrupada em 6 grupos etários (20 a 29 anos, 30 a 39 anos, 40 a 49 anos, 50 a 59 anos, 60 a 69 anos e 70 a 79 anos). Todos estes dados referentes aos recetores de transplante renal, aos respetivos dadores vivos e os resultados obtidos relativamente ao transplante foram inicialmente recolhidos no sistema informático do IPST e na base de dados do serviço existente nos Serviços de Nefrologia do CHUP e do CHUSJ e posteriormente, compilados numa base de dados construída de raiz, no programa Microsoft® Excel 2010.

Os resultados analíticos relativos à genotipagem HLA entre dador/recetor foram analisados pelo método de genotipagem HLA de baixa resolução com o sistema LIFECODES HLA-SSO e pelo método de tipagem de alta resolução, NGS (descrito no ponto 3.2 do capítulo I). A primeira metodologia não foi constante ao longo do tempo, devido à introdução do método NGS recentemente no laboratório de genética do IPST-Porto e que atualmente é o que providencia a análise dos dados. Este método utiliza um kit AllType FASTplex NGS 11 loci, que providencia a amplificação de todos os 11 loci de classe I e classe II num único tubo. O equipamento Ion Chef™ realiza a preparação de bibliotecas de DNA que depois seguem para o sistema Ion GeneStudio™ S5 que permite uma sequenciação de elevado rendimento que é analisada automaticamente pelo software TypeStream™ Visual NGS, obtendo-se assim os genótipos HLA (3).

A análise dos dados relativos à pesquisa e identificação dos anticorpos anti-HLA no soro do recetor seguiram metodologias, descritas nos pontos 3.3, 3.4 e 3.5, do capítulo I, que foram constantes ao longo do tempo e que as tornaram numa amostra só.

O teste *crossmatch* por CDC (ponto 3.3, capítulo I) foi a primeira técnica utilizada para identificar anticorpos anti-HLA específicos contra o dador. Numa placa de Terasaki, o soro do recetor é misturado com os linfócitos do dador. De seguida, é adicionado uma fonte de complemento (derivado de soro de coelho) que perante a presença de anticorpos anti-HLA DSA que se ligam às células do dador, ativa a cascata do complemento por via clássica resultando na lise dos linfócitos.

A leitura e interpretação deste teste é a percentagem das células mortas relativamente às células vivas, conforme determinado por microscopia (6).

O teste de PRA (ponto 3.4, capítulo I), permite avaliar o grau de sensibilização de um recetor perante a exposição prévia deste a antígenos HLA externos devido a possíveis eventos sensibilizantes que possa ter sofrido. Este teste é efetuado pela técnica de CDC, com a diferença de que este utiliza um painel de células mononucleares (7). Os doentes que apresentam um resultado de PRA <20% são considerados doentes com baixo risco imunológico (11).

O imunoensaio de citometria de esferas – sistema Luminex (ponto 3.5, capítulo I) é um dos ensaios de fase sólida mais frequentemente utilizado para a deteção de anticorpos HLA e DSA. Esta técnica pode utilizar dois kits de microesferas, o kit LABScreen™ Mixed (One Lambda, Inc) que fornece informação qualitativa ou o kit LABScreen® Single Antigen (One Lambda, Inc) que fornece informação quantitativa. Estes kits são incubados com um anticorpo IgG conjugado com um fluorocromo. Esta metodologia utiliza o equipamento FLEXMAP 3D® (Luminex), um analisador automático, que tem incorporado lasers que permitem determinar os sinais de fluorescência emitidos pelas microesferas, determinando assim a especificidade HLA e o respetivo grau de MFI. Um grau de MFI >1000 é considerado positivo para a presença de anticorpos anti-HLA DSA (7).

### **3.3. Ética**

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética do Centro Hospitalar Universitário do Porto e à Comissão de Ética do Centro Hospitalar Universitário do Hospital de São João tendo sido aprovado, o que possibilitou a recolha de dados clínicos das suas bases de dados no serviço (anexo I). Todas as devidas precauções foram tomadas para proteger a confidencialidade e dados pessoais anonimizados de cada doente bem como dos respetivos dadores.

### **3.4. Análise estatística**

Para a análise descritiva dos dados foram calculadas medidas de tendência central e dispersão para variáveis contínuas, e de frequência para as variáveis categóricas. Foram utilizadas tabelas de contingência e testes estatísticos como o teste z que foi aplicado para avaliar as diferenças de médias e proporções entre duas amostras independentes. Os resultados estatísticos são significativos para um valor de *p-value* <0.05 e um intervalo de confiança de 95%.

## 4. Resultados

### 4.1. Análise descritiva da população em estudo

No período de março de 2014 a abril de 2022 foram analisados 155 transplantados renais e seus respectivos doadores vivos. Relativamente aos transplantados renais, 50 (32,3%) eram do sexo feminino, e 105 (67,7%) do sexo masculino. 79 (51,0%) não tinham anticorpos HLA e 76 tinham anticorpos não específicos ao dador (49,0%) no transplante. A idade dos recetores renais variou entre os 22 e os 76 anos e a média foi de  $49,2 \pm 12,6$  anos, tendo sido o grupo etário mais frequente o grupo dos 40 aos 49 anos (n=44). Relativamente aos eventos sensibilizantes, 64,0% (n=32) de um total de 50 recetores do sexo feminino, tiveram pelo menos 1 gestação; cerca de 15,5% (n=24) dos transplantados renais levaram transfusões sanguíneas e 5,2% (n=8) já tinham sofrido um transplante prévio. A causa de insuficiência renal crónica mais frequente foi a nefropatia IgA n=33 (21,3%) seguida de indeterminada n=32 (20,6%) (Figura 8). O tempo médio em lista de espera para transplante foi de 12,0 meses, e o tempo médio em diálise foi de 15,1 meses. O tratamento substitutivo da função renal mais utilizado foi a hemodiálise n=74 (47,7%), seguido do transplante preemptivo n=42 (27,1%). Considerando o número total de resultados do teste PRA, verificou-se que 97,2% (n=149) dos doentes apresentaram uma sensibilização  $\leq 20\%$ . Em relação às incompatibilidades ABO cerca de 8,4% dos recetores é que as possuíam; 22,6% dos recetores foram transplantados com 4 incompatibilidades do sistema HLA, no loci A, B, C e DR. Após o transplante, o protocolo de imunossupressão mais utilizado foi prednisolona (PRED), tacrolimus (TAC) e micofenolato de mofetil (MMF) (65,8%, n=102), tendo também sido aplicado em 11,6% (n=18) dos doentes a terapêutica de indução. Relativamente ao órgão transplantado, o *follow up* mínimo foi de 6 meses e o máximo foi de 7 anos. Cerca de 6,5% dos transplantados tiveram função renal tardia e 1,9% sofreram pelo menos um episódio de rejeição celular aguda, mantendo o enxerto funcionante. Verificou-se que 4,5% dos recetores renais perderam o enxerto devido a causas como indeterminada (1,3%, n=2), trombose vascular (0,6%, n=1), trombose venosa (0,6%; n=1) e enxertectomia por pielonefrite aguda (PNA) (1,3%; n=2). De um total de 155 recetores de transplante renal, 2,6% (n=4) morreram devido a causas desconhecidas.

Na Tabela 2, estão representados os resultados respetivos às características do recetor e aos parâmetros imunológicos e clínicos.

Relativamente aos doadores, 105 (67,7%) eram do sexo feminino e 50 (32,3%) eram do sexo masculino; 82 (52,9%) eram aparentados e 73 (47,1%) eram não relacionados. A idade dos doadores variou entre os 20 e os 79 anos e a média foi de  $52,5 \pm 10,0$  anos, com maior frequência entre os 50-59 anos (n=53).

Na Tabela 3, estão representados os resultados respetivos às características do dador.

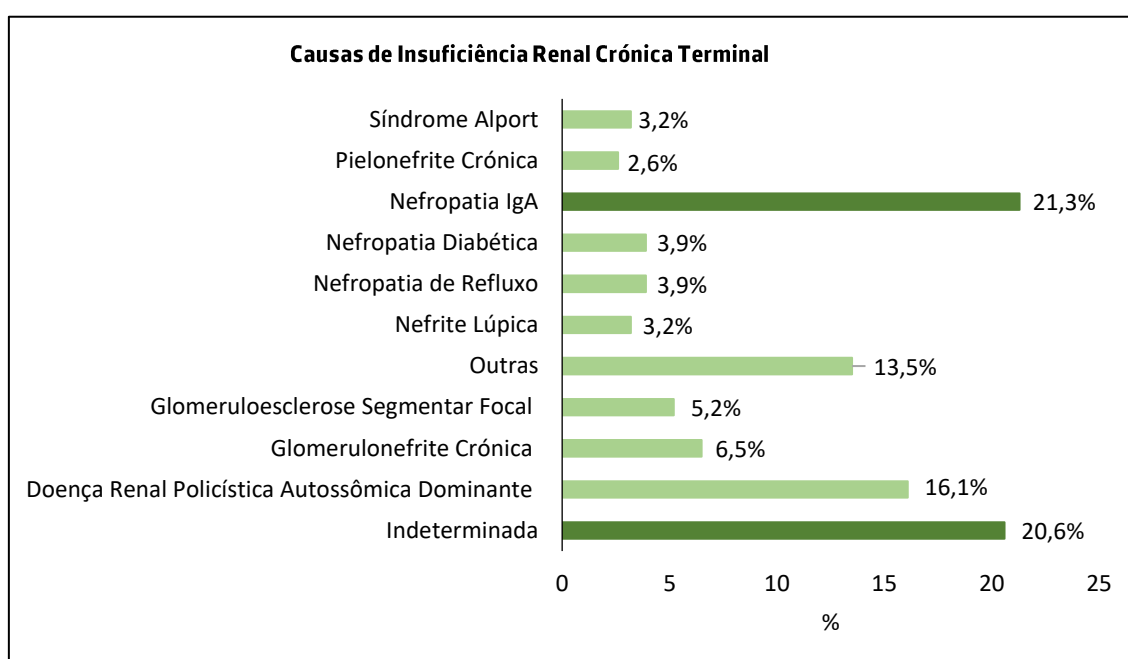
**Tabela 2** – Características do recetor, parâmetros imunológicos e parâmetros clínicos.

<b>Características do Recetor</b>	
Idade (anos, média ± desvio padrão)	49,2 ± 12,6
Sexo (n (%))	
Masculino	105 (67,7%)
Feminino	50 (32,3%)
Gestações (n (%))	32 (64,0%)
Transfusões Sanguíneas (n (%))	24 (15,5%)
Transplantes Prévios (n (%))	8 (5,2%)
<b>Parâmetros Imunológicos</b>	
Anticorpos Anti-HLA NDSA (n (%))	
Sem anticorpos HLA	79 (51,0%)
Com anticorpos anti-HLA NDSA	76 (49,0%)
PRA ≤20% (n (%))	149 (97,2%)
Nº incompatibilidades HLA-A, -B, -C, -DRB1 (n (%))	
4 incompatibilidades	35 (22,6%)
Incompatibilidade ABO (n (%))	13 (8,4%)
<b>Parâmetros Clínicos</b>	
Insuficiência renal crónica terminal (n (%))	
Nefropatia IgA	33 (21,3%)
Indeterminada	32 (20,6%)
Tratamento substitutivo da função renal (n (%))	
Hemodiálise	74 (47,7%)
Preemptive	42 (27,1%)
Diálise (meses, média)	15,1
Função renal tardia (n (%))	10 (6,5%)
Episódios de rejeição celular aguda (n (%))	3 (1,9)
Perda de enxerto (n (%))	7 (4,5%)
Morte com enxerto funcionante (n (%))	4 (2,6%)
<b>Terapia de Imunossupressão</b>	
PRED+TAC+MMF (n (%))	102 (65,8%)
Indução (n (%))	18 (11,6%)

Legenda: Ac: anticorpos; NDSA: anticorpos anti-HLA não específicos ao dador; PRED: Prednisolona; TAC: Tacrolimus; n<sup>o</sup>: número; MMF: Micofenolato de Mofetil; Tx: Transplante.

**Tabela 3** – Características do dador.

<b>Características do Dador</b>	
Idade (média ± desvio padrão)	52,5 ± 10,0
Sexo, n (%)	
Masculino	50 (32,3%)
Feminino	105 (67,7%)
Grau de Parentesco, n (%)	
Relacionado	82 (52,9%)
Não relacionado	73 (47,1%)



**Figura 8** – Principais causas de insuficiência renal crônica terminal.

#### **4.2. Comparação das características dos receptores renais e respectivos dadores vivos sem anticorpos HLA e com anticorpos anti-HLA NDSA**

De um total de 155 receptores de transplante renal com dador vivo, foram analisadas duas subpopulações de 79 transplantados renais sem anticorpos HLA e 76 transplantados renais com anticorpos anti-HLA NDSA, no mesmo período em estudo. A Tabela 4 demonstra os resultados da comparação das características dos receptores renais e respectivos dadores entre o grupo sem anticorpos HLA e o grupo com anticorpos anti-HLA NDSA.

**Tabela 4** – Comparação das características dos recetores renais e respetivos dadores, entre os grupos sem anticorpos HLA e com anticorpos anti-HLA NDSA.

	Sem Anticorpos HLA N= 79	Com Anticorpos NDSA N= 76	p
Idade Recetor (anos), média ± desvio padrão	48 ± 11,7	50 ± 13,6	0,209
Idade Dador (anos), mediana ± desvio padrão	52,0 ± 10,3	53,0 ± 9,8	0,268
Sexo Recetor, n (%)			
masculino	58 (73,4 %)	47 (65,5 %)	0,062
feminino	21 (26,6 %)	29 (38,2 %)	0,062
Sexo Dador, n (%)			
masculino	25 (31,6%)	25 (32,9%)	0,432
feminino	54 (68,4%)	51 (67,1%)	
Gestações, n (%)	13 (61,9 %)	19 (65,5 %)	0,095
Transfusões, n (%)	10 (12,7 %)	14 (18,4 %)	0,161
Transplantes Prévios, n (%)	4 (5,1%)	4 (5,3 %)	0,251
Diálise (meses), média ± desvio padrão	15,1 ± 24,5	16,5 ± 40,5	0,460
Incompatibilidades HLA-A, -B, - C, -DR, n(%)			
1	3 (3,8%)	3 (3,9%)	0,488
2	15 (19,0%)	13 (17,1%)	0,382
3	17 (21,5%)	21 (27,6%)	0,189
4	19 (24,1%)	16 (21,1%)	0,330
5	14 (17,7%)	9 (11,8%)	0,151
6	6 (7,6%)	6 (7,9%)	0,472

Verificou-se que no grupo com anticorpos anti-HLA NDSA os receptores renais eram mais velhos e os do sexo feminino foram transplantados com maior número de gestações, predominantemente com dadores do sexo feminino. Por outro lado, no grupo sem anticorpos HLA verificou-se que os receptores eram mais novos, predominantemente do sexo masculino, transplantados com menor número de transfusões e os recetores femininos com o menor número de gestações.

Não houve diferenças entre os dois grupos para as variáveis de transplantes prévios, tempo de diálise e compatibilidades para os loci A, B e DR.

Relativamente às variáveis função renal tardia, episódios de rejeição e perda do enxerto já previamente descrita não se procedeu à sua comparação uma vez que as causas que as originaram não estavam relacionadas com a presença de anticorpos, pelo que era desajustado incluir a sua análise.

## 5. Discussão

Na literatura vários estudos comprovam a importância da presença de anticorpos anti-HLA no transplante renal (2,30,59). No entanto, a maioria desses estudos abordam a influência negativa dos anticorpos anti-HLA DSA considerando a sua presença um fator de risco para o transplante renal (30,58). Por outro lado, são escassos e não consensuais os estudos que analisam a importância dos anticorpos anti-HLA não específicos ao dador no transplante renal questionando o seu verdadeiro significado clínico.

Alguns estudos evidenciam não haver impacto desses anticorpos pré formados na sobrevida do enxerto (74–77). Contudo, Richter et al. 2016 demonstrou numa coorte (N=197) que os receptores renais pré-sensibilizados com anticorpos não específicos ao dador tinham um risco aumentado para a perda de enxerto (78). Recentemente, um estudo usando a tecnologia de ensaios em fase sólida evidenciou numa coorte (N=744) que a presença de anticorpos pré formados não específicos ao dador, estava associada a uma redução no tempo de sobrevida do enxerto, particularmente em casos de receptores sem indução (59).

Na coorte estudada verificamos uma predominância de receptores do sexo masculino, o que está de acordo com a literatura (74,79,80). Uma possível justificação prende-se com o facto de os homens não terem o efeito sensibilizante provocado pela gestação. A predominância de dadores do sexo feminino deve-se ao facto de se tratar de uma população de dadores vivo sendo as mulheres mais solidárias por terem uma relação mais próxima (aparentada) com o recetor.

A igualdade verificada nos dois grupos em relação a transplantes prévios valida o facto da predominância no retransplante serem os anticorpos anti-HLA específicos contra o dador e não a ausência ou mesmo a presença dos anticorpos anti-HLA não específicos ao dador. Como esperado os eventos sensibilizantes, gestações e transfusões, foram superiores no grupo com anticorpos anti-HLA NDSA o que está de acordo com a literatura, embora se esperasse uma diferença mais significativa (59,81). No caso dos transplantes prévios a casuística não é suficiente para ter o significado esperado que era a influência do evento sensibilizante no aparecimento de anticorpos. O menor tempo de diálise encontrado no grupo dos receptores sem anticorpos HLA é justificável pela menor sensibilização dos receptores. A incompatibilidade ABO e PRA foram variáveis encontradas na população em estudo, contudo parecem não ser relacionáveis com o objetivo em estudo. A incompatibilidade HLA encontrada nos diferentes loci para os dois grupos não se revelou significativa.

Este projeto é inovador porque além de ser multicêntrico utiliza uma população apenas de dadores vivos e apenas uma metodologia para a pesquisa e identificação de anticorpos HLA (tecnologia de fase

sólida). Mas, tal facto torna difícil uma análise comparativa com outros estudos que abordam a mesma temática pelos seguintes motivos:

- A maior parte dos estudos sobre este tema utiliza outro tipo de população nomeadamente com dador cadáver ou dador cadáver e dador vivo (59,74,79,80,82).
- Muitos dos estudos recorrem a metodologias diferentes para a identificação dos anticorpos HLA nomeadamente a técnica de Elisa, CDC e citometria de fluxo enquanto este estudo apenas utilizou a tecnologia de ensaios em fase sólida (80,83).

Para além destes dois fatores que dificultaram a comparação de resultados com outros estudos, também o número reduzido de casuística não permite obter uma análise estatística mais robusta e com significância estatística que nos permita concluir sobre a relevância ou não dos anticorpos anti-HLA NDSA no transplante.

Finalmente outra limitação deste estudo prende-se com o critério de positividade atribuído à especificidade dos anticorpos anti-HLA com MFI  $\geq 1000$ . Apesar de correntemente usado não foi ainda estabelecido como um *cut-off* com significado clínico (7). Torna-se necessário a realização de estudos que investiguem o *cut-off* clínico adequado bem como a confirmação dos dados obtidos para a especificidade dos anticorpos através da realização de mais estudos que utilizam kits de outros fabricantes.

## 6. Conclusão

Podemos concluir que apesar das limitações já mencionadas, os objetivos propostos inicialmente foram cumpridos.

O balanço final relativamente ao estágio realizado na área da Transplantação do IPST Porto foi positivo dado que permitiu a consolidação de conhecimentos adquiridos durante o 1º ano do MACSP e aprofundar os conhecimentos teóricos na área da transplantação renal. Foi também importante pela evolução prática que foi possível ter com a aquisição de competências técnico-científicas nas metodologias e técnicas implementadas na rotina dos laboratórios de alo sensibilização HLA e de genética.

Este estágio permitiu ainda integrar-me em serviços com equipas multidisciplinares tendo sido por isso uma experiência importante para o futuro profissional, mas também pessoal.

Neste estudo de caso multicêntrico tentamos estabelecer uma relação entre a presença de anticorpos HLA não específicos ao dador detetados por tecnologia de fase sólida numa coorte de dadores vivos representativos dos transplantes efetuados no Norte do país no período de março 2014 a abril de 2022.

Dados os resultados encontrados para as diferentes variáveis, estes parecem indicar não haver relação significativa entre a presença de anticorpos anti-HLA não específicos ao dador e a evolução do transplante. Seria necessário novo estudo com uma população e num espaço temporal mais alargados.

## Referências Bibliográficas

1. Standards for Histocompatibility & Immunogenetics Testing. [Internet]. Available from: [https://efi-web.org/fileadmin/Efi\\_web/Standardv8\\_280819.pdf](https://efi-web.org/fileadmin/Efi_web/Standardv8_280819.pdf). 2020. p. 27.
2. Malheiro J, Tafulo S. Clinical implications of anti-HLA antibodies testing in kidney transplantation. *Human Immunology*. 2018 Jan;32:42–51.
3. Liu C, Duffy BF, Weimer ET, Montgomery MC, Jennemann JE, Hill R, et al. Performance of a multiplexed amplicon-based next-generation sequencing assay for HLA typing. *PLoS One* [Internet]. 2020 Apr 23;15(4):e0232050-. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232050>
4. Thermo Fisher Scientific, Sistemas de sequenciamento Ion S5™ & Ion Chef™. [Internet]. <https://www.biometrix.com.br/one-lambda-equipamentos/sequenciamento-ion-s5-chef/>. 2015.
5. STEMCELL™ Technologies, EasySep™ Cell Separation. [Internet]. Available from: <https://www.stemcell.com/products/brands/easysep-cell-separation.html>.
6. Mulley WR, Kanellis J. Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist. *Nephrology* [Internet]. 2011 Feb 1;16(2):125–33. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2010.01414.x>
7. Tait BD. Detection of HLA Antibodies in Organ Transplant Recipients – Triumphs and Challenges of the Solid Phase Bead Assay. *Front Immunol* [Internet]. 2016;7. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00570>
8. Gautreaux MD. Chapter 17 – Histocompatibility Testing in the Transplant Setting. In: Orlando G, Remuzzi G, Williams DF, editors. *Kidney Transplantation, Bioengineering and Regeneration* [Internet]. Academic Press; 2017. p. 223–34. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128017340000175>
9. Kolonko A, Bzoma B, Giza P, Styrz B, Sobolewski M, Chudek J, et al. The Pre-Transplant Drop in Panel-Reactive Antibodies Titer Evaluated Using Complement-Dependent Cytotoxicity (PRA-CDC) and the Risk of Early Acute Rejection in Sensitized Kidney Transplant Recipients. *Medicina (Kaunas)* [Internet]. 2018 Sep 20;54(5):66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30344297>
10. Hajeer Ali H. Panel Reactive Antibody test (PRA) in renal transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 2006. 2006;17(1):1–4.

11. Colombo MB, Haworth SE, Poli F, Nocco A, Puglisi G, Innocente A, et al. Luminex technology for anti-HLA antibody screening: Evaluation of performance and of impact on laboratory routine. *Cytometry B Clin Cytom* [Internet]. 2007 Nov 15;72B(6):465–71. Available from: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20353>
12. Townamchai N, Safa K, Chandraker A. Immunologic monitoring in kidney transplant recipients. *Kidney Res Clin Pract*. 2013 Jun 1;32:52–61.
13. IPST, Introdução ao Sistema de gestão de Qualidade [Internet]. Available from: <https://ipst.pt/index.php/pt/areas-de-atuacao/sgq>. 2021.
14. Rahman M. Quality Assurance (QA) in Laboratory Testing. *Anwer Khan Modern Medical College Journal*. 2011 Oct;2.
15. World Health Organization. Laboratory quality standards and their implementation. [Internet]. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/206927/9789290223979\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/206927/9789290223979_eng.pdf). 2011.
16. Murton M, Goff-Leggett D, Bobrowska A, Garcia Sanchez JJ, James G, Wittbrodt E, et al. Burden of Chronic Kidney Disease by KDIGO Categories of Glomerular Filtration Rate and Albuminuria: A Systematic Review. *Adv Ther* [Internet]. 2020/11/24. 2021 Jan;38(1):180–200. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33231861>
17. Kalantar-Zadeh K, Jafar TH, Nitsch D, Neuen BL, Perkovic V. Chronic kidney disease. *The Lancet* [Internet]. 2021;398(10302):786–802. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673621005195>
18. Ammirati A. Chronic Kidney Disease. *Rev Assoc Med Bras*. 2020 Jan 13;66:s03–9.
19. Kanda H, Hirasaki Y, Iida T, Kanao-Kanda M, Toyama Y, Chiba T, et al. Perioperative Management of Patients With End-Stage Renal Disease. *J Cardiothorac Vasc Anesth* [Internet]. 2017;31(6):2251–67. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1053077017304081>
20. Wang YN, Ma SX, Chen YY, Chen L, Liu BL, Liu QQ, et al. Chronic kidney disease: Biomarker diagnosis to therapeutic targets. *Clínica Chimica Acta* [Internet]. 2019;499:54–63. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000989811932025X>
21. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA* [Internet]. 2019 Oct 1;322(13):1294–304. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31573641>

22. Staples A, Wong C. Risk factors for progression of chronic kidney disease. *Curr Opin Pediatr* [Internet]. 2010 Apr;22(2):161–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20090523>
23. National Kidney Foundation. How to Classify CKD. [Internet]. Available from: <https://www.kidney.org/professionals/explore-your-knowledge/how-to-classify-ckd>.
24. Mallappallil M, Friedman EA, Delano BG, McFarlane SI, Salifu MO. Chronic kidney disease in the elderly: evaluation and management. *Clin Pract (Lond)* [Internet]. 2014;11(5):525–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25589951>
25. Esagian SM, Spinos D, Vasilopoulou A, Syrigos N, Bishawi M, Lehrich RW, et al. Influence of peritoneal dialysis catheter type on complications and long-term outcomes: an updated systematic review and meta-analysis. *J Nephrol* [Internet]. 2021;34(6):1973–87. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40620-021-01016-y>
26. Murea M, Grey CR, Lok CE. Shared decision-making in hemodialysis vascular access practice. *Kidney Int* [Internet]. 2021;100(4):799–808. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085253821006682>
27. Vachharajani TJ, Taliercio JJ, Anvari E. New Devices and Technologies for Hemodialysis Vascular Access: A Review. *American Journal of Kidney Diseases* [Internet]. 2021;78(1):116–24. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272638621000536>
28. Takahashi EA, Kilari S, Misra S. Novel Clinical Therapies and Technologies in Dialysis Vascular Access. *Kidney360* [Internet]. 2021 Aug 26;2(8):1373. Available from: <http://kidney360.asnjournals.org/content/2/8/1373.abstract>
29. Studart RNAQRBLBICK. Avaliação Clínica e Imunológica dos Receptores de Transplante Renal. *Revista online de pesquisa: Cuidado é fundamental*. 2019 Oct;1202–7.
30. da Silva CK, Meinerz G, Bruno RM, Abud J, Montagner J, Dorsdt DMB, et al. Late impact of preformed anti-HLA antibodies on kidney graft outcome. *Transpl Immunol* [Internet]. 2019;55:101212. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966327418301369>
31. Dall'Agnol J, Schwartz E, Lise F. Acesso À Lista De Espera Para O Transplante Renal. *Revista Científica de Enfermagem - RECIEN* [Internet]. 2021;11(35):174–174–84. Available from: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=154409488&site=eds-live>

32. Barbosa J, Jesus M, Barbosa R, Ribeiro C, Navarro S, Ribas J, Cardoso M. Transplante renal: mecanismo de rejeição, terapia imunossupressora e métodos diagnósticos. *Caderno Saúde e Desenvolvimento*. 2020 May 25;
33. Abramyan S HM. Kidney Transplantation. [Internet]. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2022.
34. Jordan SC, Choi J, Vo A. Kidney transplantation in highly sensitized patients. *Br Med Bull* [Internet]. 2015 Jun 1;114(1):113–25. Available from: <https://doi.org/10.1093/bmb/ldv013>
35. Girish K. Transplantation Immunology. In 2011.
36. Lu T, Yang B, Wang R, Qin C. Xenotransplantation: Current Status in Preclinical Research. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Jan 23;10:3060. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32038617>
37. Cozzi E, Schneeberger S, Bellini MI, Berglund E, Böhmig G, Fowler K, et al. Organ transplants of the future: planning for innovations including xenotransplantation. *Transplant International* [Internet]. 2021 Nov 1;34(11):2006–18. Available from: <https://doi.org/10.1111/tri.14031>
38. Maritati F, Bini C, Cuna V, Tondolo F, Lerario S, Grandinetti V, et al. Current Perspectives in ABO-Incompatible Kidney Transplant. *J Inflamm Res* [Internet]. 2022 May 25;15:3095–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35642217>
39. Salvadori M, Tsalouchos A. Current protocols and outcomes of ABO-incompatible kidney transplantation. *World J Transplant* [Internet]. 2020 Jul 29;10(7):191–205. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32844095>
40. Kher V, Jha PK. Paired kidney exchange transplantation – pushing the boundaries. *Transplant International* [Internet]. 2020 Sep 1;33(9):975–84. Available from: <https://doi.org/10.1111/tri.13693>
41. Lima B, Alves H. A Portuguese Living Donor Exchange Program. *Organs, Tissues & Cells*. 2012 Jun 1;15(2):123–9.
42. Guia para a qualidade e segurança dos órgãos para transplantação. Instituto Português do Sangue e da Transplantação [Internet]. Available from: [http://www.ipst.pt/files/TRANSPLANTACAO/DOACAOETRANSPLANTACAO/Guia\\_Qualidade\\_rgos\\_Verso\\_Portuguesa\\_final.pdf](http://www.ipst.pt/files/TRANSPLANTACAO/DOACAOETRANSPLANTACAO/Guia_Qualidade_rgos_Verso_Portuguesa_final.pdf). Direção Europeia da Qualidade dos Medicamentos e Cuidados de Saúde (EDQM); 2013. p. 38–63.

43. Hamid R, Khan M. Living-unrelated kidney donor transplantation: Legalization in exceptional circumstances? *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*. 2019 Sep 1;30:1111.
44. Modi P, Rizvi J, Pal B, Trivedi H, Shah V, Modi M, et al. Dual kidney transplantation from expanded criteria deceased donors: Initial experience from single center. *Indian J Urol* [Internet]. 2011 Jan;27(1):30–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21716886>
45. Baid-Agrawal S, Frei UA. Living donor renal transplantation: recent developments and perspectives. *Nat Clin Pract Nephrol* [Internet]. 2007;3(1):31–41. Available from: <https://doi.org/10.1038/ncpneph0383>
46. Davis CL, Delmonico FL. Living-Donor Kidney Transplantation: A Review of the Current Practices for the Live Donor. *Journal of the American Society of Nephrology* [Internet]. 2005 Jul 1;16(7):2098. Available from: <http://jasn.asnjournals.org/content/16/7/2098.abstract>
47. Xiong Y, Jiang J, Zhang H, Fu Q, Deng R, Li J, et al. Higher Renal Allograft Function in Deceased-Donor Kidney Transplantation Rather Than in Living-Related Kidney Transplantation. *Transplant Proc* [Internet]. 2018;50(8):2412–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041134518303749>
48. Schold J, Kaplan B, Baliga R, Meier-Kriesche HU. The Broad Spectrum of Quality in Deceased Donor Kidneys. *Am J Transplant*. 2005 Oct;5:757–65.
49. Okamura K, Dijkstra JM, Tsukamoto K, Grimholt U, Wiegertjes GF, Kondow A, et al. Discovery of an ancient MHC category with both class I and class II features. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2021 Dec 21;118(51):e2108104118. Available from: <http://www.pnas.org/content/118/51/e2108104118.abstract>
50. Klein J, Sato A. The HLA System. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2000 Sep 7;343(10):702–9. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJM200009073431006>
51. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens* [Internet]. 2009;74(2):101–16. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x>
52. Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol* [Internet]. 1958;20(1–4):156–66. Available from: <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000205478>
53. Barker CF, Markmann JF. Historical overview of transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2013 Apr 1;3(4):a014977–a014977. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23545575>

54. Naito T, Okada Y. HLA imputation and its application to genetic and molecular fine-mapping of the MHC region in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00281-021-00901-9>
55. Kumar A, Kosi E, Halawa A. An Update on Crossmatch Techniques in Transplantation. *J Kidney*. 2017 Oct;3.
56. Wubetu JT, Brown CE, Clancy M. The immunology of solid organ transplantation. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* [Internet]. 2021;22(8):522–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472029921001478>
57. Gupta A, Sinnott P. Clinical relevance of pretransplant human leukocyte antigen donor-specific antibodies in renal patients waiting for a transplant: A risk factor. *Hum Immunol* [Internet]. 2009;70(8):618–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0198885909001098>
58. Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins LS, Fonseca I, Beirão I, et al. Analysis of preformed donor-specific anti-HLA antibodies characteristics for prediction of antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transpl Immunol* [Internet]. 2015;32(2):66–71. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966327415000039>
59. Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins LS, Fonseca I, Beirão I, et al. Impact on mid-term kidney graft outcomes of pretransplant anti-HLA antibodies detected by solid-phase assays: Do donor-specific antibodies tell the whole story? *Hum Immunol* [Internet]. 2017;78(9):526–33. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0198885917304597>
60. Rebellato LM, Ozawa M, Verbanac KM, Catrou P, Haisch CE, Terasaki PI. Clinical and anti-HLA antibody profile of nine renal transplant recipients with failed grafts: donor-specific and non-donor-specific antibody development. *Clinical Transplants*. 2016. 241–53 p.
61. Naik RH SS. Renal Transplantation Rejection. [Internet]. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2022.
62. Jeong HJ. Diagnosis of renal transplant rejection: Banff classification and beyond. *Kidney Res Clin Pract* [Internet]. 2020 Mar 31;39(1):17–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32164120>
63. Lai X, Zheng X, Mathew JM, Gallon L, Leventhal JR, Zhang ZJ. Tackling Chronic Kidney Transplant Rejection: Challenges and Promises. *Front Immunol* [Internet]. 2021 May 20;12:661643. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34093552>

64. Complicações pós-transplante [Internet]. In Manual MSD, Versão para Profissionais de Saúde. Available from: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/immunologia-dist%C3%BArbios-al%C3%A9rgicos/transplante/vis%C3%A3o-geral-dos-transplantes>.
65. Melo Z, Ruiz-Pacheco JA, Echavarría CAMC and R. Immunopathology of Kidney Transplantation. In: Gaze DC, editor. Pathophysiology [Internet]. Rijeka: IntechOpen; 2017. p. Ch. 8. Available from: <https://doi.org/10.5772/intechopen.70596>
66. Thurman JM, Panzer SE, le Quintrec M. The role of complement in antibody mediated transplant rejection. *Mol Immunol* [Internet]. 2019;112:240–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589019303177>
67. Muñoz-Herrera CM, Gutiérrez-Bautista JF, López-Nevot MÁ. Clinical case: Patient with mixed graft rejection four days after kidney transplantation developed specific antibodies against donor bw4 specificities. *Antibodies*. 2021;10(3).
68. (NICE) NI for H and CE. Immunosuppressive Therapy for Renal Transplantation in Adults. London: NICE; 2004.
69. Balani SS, Jensen CJ, Kouri AM, Kizilbash SJ. Induction and maintenance immunosuppression in pediatric kidney transplantation—Advances and controversies. *Pediatr Transplant* [Internet]. 2021 Nov 1;25(7):e14077. Available from: <https://doi.org/10.1111/petr.14077>
70. Muntean A, Lucan M. Immunosuppression in kidney transplantation. *Clujul Med* [Internet]. 2013/08/05. 2013;86(3):177–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26527942>
71. Bauer A, Franco R, Manfro R. Immunosuppression in Kidney Transplantation: State of the Art and Current Protocols. *Curr Pharm Des*. 2020 May 21;26.
72. Bentata Y. Mycophenolates: The latest modern and potent immunosuppressive drugs in adult kidney transplantation: What we should know about them? *Artif Organs* [Internet]. 2020 Jun 1;44(6):561–76. Available from: <https://doi.org/10.1111/aor.13623>
73. Galante NZ. Tratamento de indução no transplante renal. *Brazilian Journal of Nephrology / Jornal Brasileiro de Nefrologia* [Internet]. 2015;37(2):156–156–7. Available from: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edb&AN=103591373&site=eds-live>
74. Caro-Oleas JL, González-Escribano MF, González-Roncero FM, Acevedo-Calado MJ, Cabello-Chaves V, Gentil-Govantes MÁ, et al. Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected

- by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation* [Internet]. 2012 Mar 1;27(3):1231–8. Available from: <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr429>
75. Otten HG, Verhaar MC, Borst HPE, Hené RJ, Zuilen AD van. Pretransplant Donor-Specific HLA Class-I and -II Antibodies Are Associated With an Increased Risk for Kidney Graft Failure. *American Journal of Transplantation* [Internet]. 2012 Jun 1;12(6):1618–23. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03985.x>
76. Gupta A, Iveson V, Varagunam M, Bodger S, Sinnott P, Thuraisingham RC. Pretransplant Donor-Specific Antibodies in Cytotoxic Negative Crossmatch Kidney Transplants: Are They Relevant? *Transplantation* [Internet]. 2008;85(8). Available from: [https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2008/04270/Pretransplant\\_Donor\\_Specific\\_Antibodies\\_in.22.aspx](https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2008/04270/Pretransplant_Donor_Specific_Antibodies_in.22.aspx)
77. Dunn TB, Noreen H, Gillingham K, Maurer D, Ozturk OG, Pruett TL, et al. Revisiting Traditional Risk Factors for Rejection and Graft Loss After Kidney Transplantation. *American Journal of Transplantation* [Internet]. 2011 Oct 1;11(10):2132–43. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03640.x>
78. Richter R, Süsal C, Köhler S, Qidan S, Schödel A, Holschuh L, et al. Pretransplant human leukocyte antigen antibodies detected by single-antigen bead assay are a risk factor for long-term kidney graft loss even in the absence of donor-specific antibodies. *Transplant International* [Internet]. 2016 Sep 1;29(9):988–98. Available from: <https://doi.org/10.1111/tri.12786>
79. Wu P, Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Briley KP, Bolin P, et al. Trends and Characteristics in Early Glomerular Filtration Rate Decline After Posttransplantation Alloantibody Appearance. *Transplantation* [Internet]. 2013;96(10). Available from: [https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2013/11270/Trends\\_and\\_Characteristics\\_in\\_Early\\_Glomerular.13.aspx](https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2013/11270/Trends_and_Characteristics_in_Early_Glomerular.13.aspx)
80. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Ozawa M, Parker K, Briley KP, et al. Incidence and Impact of De Novo Donor-Specific Alloantibody in Primary Renal Allografts. *Transplantation* [Internet]. 2013;95(3). Available from: [https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2013/02150/Incidence\\_and\\_Impact\\_of\\_De\\_Novo\\_Donor\\_Specific.2.aspx](https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2013/02150/Incidence_and_Impact_of_De_Novo_Donor_Specific.2.aspx)
81. Amico P, Hönger G, Mayr M, Steiger J, Hopfer H, Schaub S. Clinical Relevance of Pretransplant Donor-Specific HLA Antibodies Detected by Single-Antigen Flow-Beads. *Transplantation* [Internet]. 2009;87(11). Available from:

[https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2009/06150/Clinical\\_Relevance\\_of\\_Pretransplant\\_Donor\\_Specific.12.aspx](https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2009/06150/Clinical_Relevance_of_Pretransplant_Donor_Specific.12.aspx)

82. Hörmann M, Dieplinger G, Rebellato LM, Briley KP, Bolin P, Morgan C, et al. Incidence and impact of anti-HLA-DP antibodies in renal transplantation. *Clin Transplant* [Internet]. 2016 Sep 1;30(9):1108–14. Available from: <https://doi.org/10.1111/ctr.12794>
83. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, Mizutani K, Moreau A, Meurette A, et al. Frequency and Clinical Implications of Development of Donor-Specific and Non-Donor-Specific HLA Antibodies after Kidney Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology* [Internet]. 2005 Sep 1;16(9):2804. Available from: <http://jasn.asnjournals.org/content/16/9/2804.abstract>

## Anexos


Anexo I – Declaração da aprovação do estudo pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar Universitário do Hospital de São João.

**Centro de Epidemiologia Hospitalar**

Tomei conhecimento. Nada a opor. À DC.

01 de Agosto de 2022

A Diretora do Centro de Epidemiologia Hospitalar

  
(Prof.ª Doutora Ana Azevedo)



n.º 86 / 22

### PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO Realização de Investigação

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração  
do Centro Hospitalar de São João

*21.8.22 emenda Mm  
Fernando 4.8.22 R*

CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO - REUNIÃO  
Presidente do Conselho de Administração

04 AGO 2022

(Prof. Doutor Fernando Araújo)

Diretora Clínica: *MA* Diretora: *AP* Vogal Executivo: *432* Vogal Executivo: *Sapitel*

Prof.ª Doutora Maria João Baptista | Enf.ª Filomena Cardoso | Dr. Luísa Pórcz Gomes | Dr. Sofia Leal

**Nome do Investigador Principal:**  
Sara Carina Ferreira Oliveira

**Título da Investigação:**

Anticorpos não específicos ao dador: contributo no desempenho do rim transplantado com dador vivo

Pretendo realizar no(s) Serviço(s) de:

**Nefrologia/ Unidade de Transplantes Renais**

a investigação em epígrafe, solicito a V. Exa., na qualidade de Investigador/Promotor, autorização para a sua efetivação.

Para o efeito, anexo toda a documentação referida no dossier da Comissão de Ética do Centro Hospitalar de São João/Faculdade de Medicina da Universidade do Porto respeitante à investigação, à qual enderecei pedido de apreciação e parecer.

Com os melhores cumprimentos.

O Investigador/Promotor

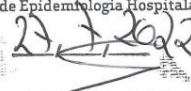
Porto, 17 de Março de 2022. Sara Carina Ferreira Oliveira



Encarregado  
de Proteção de Dados  
Data Protection Officer

Entrada: 03.03.2022

assinatura  
«Centro Hospitalar São João»  
Centro de Epidemiologia Hospitalar



Parecer da Comissão de Ética do  
Centro Hospitalar Universitário de São João / Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

**Título do Projeto:** Anticorpos não específicos ao dador: contributo no desempenho do rim transplantado com dador vivo

**Nome da Investigadora:** Dra. Sara Carina Ferreira Oliveira

**Onde decorre o Estudo:** Na Unidade de Transplantes Renais (Serviço de Nefrologia) do CHUSJ. Apresentou declaração do Prof. Doutor Manuel Pestana. O profissional de ligação será a Dra. Susana Sampaio Norton.

**Objetivos do Estudo:**

Avaliar a presença de anticorpos não específicos ao dador no transplante renal no dador vivo e sua influência na sobrevida do enxerto.

**Conceção e Pertinência do estudo:**

Espera contribuir para um melhor conhecimento da dinâmica dos anticorpos não específicos ao dador na sobrevida do enxerto renal, com uma intervenção precoce no esquema terapêutico de imunossupressão, diminuindo ou prevenindo episódios de rejeição do órgão que favorecem uma evolução do transplante.

Estudo retrospectivo, que compreende todos os receptores e respetivos dadores vivos, submetidos a transplante renal no CHUSJ (e no CHUP) entre janeiro de 2015 e dezembro de 2021.

Estão definidas as variáveis a recolher.

**Benefício/risco:** Não aplicável

**Confidencialidade dos dados:**

Apresentou uma 'avaliação sobre o impacto da proteção de dados' para o EPD.

**Respeito pela liberdade e autonomia do sujeito de ensaio:** Não aplicável

**Curriculum da investigadora:** Adequado à investigação.

**Data previsível da conclusão do estudo:** maio de 2022

**Conclusão:** Proponho um parecer favorável à realização do estudo.

Porto, 22 de abril de 2022

O Relator da CE, Dr. Hugo Santos Sousa



22008040 86-22

Questionário eletrónico



SUBMISSÃO DE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO PARA PARECER E AUTORIZAÇÃO

AUTORIZADO
Faculdade de Medicina Universidade do Porto

Preenchimento em formato digital obrigatório

01/06/2022

IDENTIFICAÇÃO DO ESTUDO

Título do projeto: Anticorpos não específicos ao dador: contributo no desempenho do rim transplantado com dador vivo

Data prevista para início: 01 / 04 / 2022

Data prevista para o término: 30 / 04 / 2022

EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO

1. Investigador principal

Nome: Sara Carina Ferreira Oliveira

Contacto telefónico: 910205466

Endereço eletrónico: saraccarina@hotmail.com

Afiação institucional: CHUSJ

FMUP

Outro: IPST/ Escola Superior de Saude do Porto

Serviço/ Departamento:

Grupo profissional: Estudante

Cédula Profissional n.º: 15212857

Formação em Boas Práticas Clínicas (GCP): Não

2. Co-investigadores

Nome: Cecilia Maria Costa Mendes

Contacto telefónico: 936065511

Endereço eletrónico: cecilia.mendes@IPST.min-saude.pt

Afiação institucional: IPST

Grupo profissional: Tecnica Superior de Saude

Cédula Profissional n.º: C-000801011

Nome: Maria Paula Moreira Pacheco Espirito Santo

Contacto telefónico: 917361575

Endereço eletrónico: paula.santos@ipst.min-saude.pt

Afiação institucional: IPST

Grupo profissional: Tecnica Superior de Saude

Cédula Profissional n.º: C-000758019

(acrescentar n.º de investigadores, se apropriado ao projeto de investigação)

3. Promotor (se aplicável): NA

CARACTERIZAÇÃO DA INVESTIGAÇÃO

1. Metodologia da investigação

Qualitativa

Mista (qualitativa+quantitativa)

Outra. Qual?

Se quantitativa:

Experimental

Observacional

Sem intervenção

Com intervenção

Se experimental ou observacional com intervenção, qual o tipo de intervenção?

Algoritmo de decisão diagnóstica/terapêutica

Comunicação

Outra. Qual?

Gabinete de Apoio ao RAI
Recolhido em
01/06/2022
A funcionária

**CARACTERIZAÇÃO DA INVESTIGAÇÃO**2. Aleatorização dos braços de intervenção:  Não  Sim

3. Se observacional, qual o desenho?

 Coorte prospetivo Coorte retrospectivo Caso-controlo Transversal Ecológico Outro. Qual? \_\_\_\_\_**REALIZAÇÃO DA INVESTIGAÇÃO**Local onde se realiza a investigação:  CHUSJ  FMUP  OutroServiço/ Departamento: Nefrologia/ Unidade de Transplantes RenaisExistem outros Centros onde se realizará a investigação?  Não  Sim. Quais? IPST**ENTIDADE(S) QUE TUTELA(M) A INVESTIGAÇÃO**1. CHUSJ - Serviço: Nefrologia / Unidade de Transplantes Renais

2. FMUP - Departamento: \_\_\_\_\_

3. Outra instituição. Qual? IPST**ORIENTADOR (se aplicável)**Nome: Cecilia Maria Costa MendesAfiliação: IPSTEndereço eletrónico: cecilia.mendes@IPST.min-saude.pt**PROFISSIONAL DE LIGAÇÃO (se aplicável - ver anexo)**Nome: Susana SampaioServiço: Nefrologia/ Unidade de Transplantes Renais**ENQUADRAMENTO DA INVESTIGAÇÃO**Em trabalho académico?  Não  Sim Conferidor de grau?  Não  Sim

Síntese dos objetivos:

**Avaliar a presença de anticorpos não específicos ao dador no transplante renal no dador vivo e sua influência na sobrevida do enxerto.**

Fundamentação ética (incluir informação sobre o estado da arte, ganhos em conhecimento/ inovação, ponderação geral sobre benefícios/risco):

Em anexo no projeto

**PARTICIPANTES PREVISTOS PARA A INVESTIGAÇÃO**Doentes?  Não  SimPessoas incapazes do exercício de autonomia?  Não  SimPessoas menores de 18 anos?  Não  Sim. Justifique:Voluntários saudáveis?  Não  Sim. Justifique:

**PARTICIPANTES PREVISTOS PARA A INVESTIGAÇÃO**

Estão definidos critérios de inclusão / de exclusão de doentes?  Não  Sim

Onde e como serão recrutados os participantes no estudo?

Qual é o tamanho amostral?

Está prevista a recolha de material biológico específico para a investigação?

Não  Sim. Identifique e justifique:

**BENEFÍCIO/RISCO DE CORRENTE DA PARTICIPAÇÃO**

Descreva os benefícios previsíveis:

Espera-se contribuir para um melhor conhecimento da dinâmica dos anticorpos no transplante renal, com uma intervenção precoce no esquema terapêutico de imunossupressão, diminuindo ou prevenindo episódios de rejeição do órgão que favorecem uma melhor evolução do transplante

Descreva os riscos/incómodos previsíveis:

NA

**CONSENTIMENTO INFORMADO, ESCLARECIDO E LIVRE**

Prevê a obtenção de consentimento informado?  Sim  Não. Justifique:  
não

Se sim, prevê informação escrita para os participantes? \_\_\_\_\_

Não. Justifique: \_\_\_\_\_

Sim (se sim, enviar documento de informação a utilizar na investigação)

O modelo para obtenção de consentimento é o modelo institucional do CHUSJ?  Não  Sim

**PROTEÇÃO DE DADOS PESSOAIS**

Necessita consultar registos clínicos?  Não  Sim

Está previsto o tratamento de dados pessoais?  Não  Sim

Se sim, de que forma é garantida a pseudonimização dos dados recolhidos? (codificação, uso de filtros, siglas...)

Descreva o património informacional a que pretende ter acesso (v.g.: nome, idade, data nascimento, idade, morada, diagnóstico, história clínica, tratamento...):

Diagnóstico, valores de função renal, episódios de rejeição e tipo de imunossupressão e informação de realização e resultado de biopsias de enxerto realizadas.

Está prevista a criação de um Banco de Dados?  Não  Sim

Está previsto o registo de som ou de imagem dos participantes?  Não  Sim

O estudo envolve investigação genética?  Não  Sim

**PROPRIEDADE INTELECTUAL**

De quem será a propriedade intelectual da investigação e seus resultados?

Investigador

Promotor

Serviço

Todos

**DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS**

Está prevista a divulgação dos resultados da investigação?  Não  Sim

Se sim, estão definidos critérios de publicação?  Não  Sim. Quais? \_\_\_\_\_

**CONTRAPARTIDAS PARA OS PARTICIPANTES**

Estão previstas contrapartidas para os participantes?  Não  Sim

Pela participação?  Não  Sim

Pelas deslocações?  Não  Sim

Pelas perdas salariais?  Não  Sim

Por outras perdas e/ou danos?  Não  Sim

**EXAMES COMPLEMENTARES DE DIAGNÓSTICO**

Estão previstos exames complementares de diagnóstico, para além dos inerentes à rotina assistencial?

Não  Sim. Quais? \_\_\_\_\_

Por quem serão suportados estes custos?

**PROTOCOLO FINANCEIRO**

Existe protocolo financeiro com o CHUSJ?  Não  Sim (se sim, enviar documento)

**SEGURO**

Este estudo prevê intervenção clínica que implique a existência de um seguro para os participantes?

Não  Sim (se sim, junte cópia da respetiva Apólice)

Data previsível para fim das credenciais de acesso: 31 / 05 / 2022

**DOCUMENTOS ANEXOS (em suporte digital)**

Protocolo do estudo

Caderno de recolha de dados (CRF)

Declaração Diretor(es) Serviço(s)

Informação Orientador

Profissional de ligação

Informação aos participantes

Modelo de consentimento a utilizar

Instrumentos de avaliação (escalas...)

Curriculum vitae (investigador/es)

Questionário para Encarregado de Proteção de Dados (EPD)

Termo de Responsabilidade do Centro Académico Clínico (para investigadores da FMUP que não pertençam ao CHUSJ)

Protocolo financeiro

Outros

## TERMO DE RESPONSABILIDADE

### Aceitação dos termos e condições de reutilização

Cumulativamente com as obrigações decorrentes da Lei n.º 26/2016, de 22 de agosto, maxime dos n.º 2 e 3 do artigo 21 e o n.º 1 e 2 do artigo 12, ao submeter o presente pedido, concordo e fico ainda juridicamente vinculado aos seguintes termos e condições:

- Comprometo-me a manter confidencial toda a informação à qual vou ter acesso;
- Após explicação do RAI do CHUSJ, embora a Lei 26/2016, de 22 de agosto, imponha como requisito a anonimização sem possibilidades de reversão, tal desiderato, é não só uma impossibilidade matemática já comprovada, como ainda resulta num prejuízo para a investigação, face à quantidade e à qualidade da informação a retirar à fonte, razão pela qual, concordando com o RAI, assumimos como compromisso a pseudonimização, o que impõe uma avaliação e gestão do risco, num quadro ético-jurídico que aceitamos e nos comprometemos a colaborar e respeitar;
- Não vou elaborar registos, suscetíveis de identificar ou tornar identificável a identidade das pessoas a quem os mesmos dizem respeito;
- Comprometo-me a consultar os processos clínicos nos termos e locais que me forem indicados para o efeito;
- Tomei conhecimento, que a violação de qualquer dos compromissos aqui assumidos, poderá resultar no apuramento de responsabilidades disciplinares, civis e penais, e ainda, à impossibilidade futura de aceder a informação de saúde para fins de investigação.
- Independentemente de requerer a Certidão de Reutilização, DAta REuse Certificate for Research (DARE), comprometo-me a citar as fontes, sempre que publicar, no todo ou em parte, resultados da presente investigação.

## COMPROMISSO DE HONRA E DECLARAÇÃO DE INTERESSES

Eu, Sara Carina Ferreira Oliveira

abaixo assinado, na qualidade de Investigador Principal, declaro por minha honra que as informações prestadas neste questionário são verdadeiras. Mais declaro que, durante o estudo, serão respeitadas as recomendações constantes na Declaração de Helsínquia (1960, e sucessivas emendas), e da Organização Mundial de Saúde, da Convenção de Oviedo e das 'Boas Práticas Clínicas' (GCP/ICH) no que se refere à experimentação que envolve seres humanos. Aceito, também, a recomendação da CE de que o recrutamento para este estudo se fará junto de doentes que não tenham participado em outro estudo, nos últimos três meses. Comprometo-me a entregar à CE o relatório final da investigação, assim que concluído.

Data: 17 / 03 / 2022

Sara Carina Ferreira Oliveira

assinatura

22/04/2022

Prof. Doutor Filipe Almeida  
Presidente da Comissão de Ética

*Filipe Almeida*

A Comissão de Ética para a Saúde  
APROVA por unanimidade o parecer do  
Relator, pelo que nada tem a opor à  
realização deste projecto de investigação.

<b>Título do Projeto</b>	Anticorpos não específicos ao dador: contributo no desempenho do rim transplantado com dador vivo		
Responsável pelo tratamento	Sara Carina Ferreira Oliveira		
Instituição	Centro Hospitalar Universitário de São João (CHUSJ) Escola Superior de Saúde do Porto (ESSP) Instituto Português de Sangue e da Transplantação (IPST)		
Investigador	Interno <input type="checkbox"/> Externo <input checked="" type="checkbox"/>		
Contacto telefónico	910205466	Endereço Electrónico	saraccarina@hotmail.com
Profissional de Ligação	Susana Maria Moreira Sampaio Norton (Assistente Graduado Hospitalar de Nefrologia)		
Amostra	25		
Análise de Risco	Tolerável <input type="checkbox"/> Baixo <input checked="" type="checkbox"/> Elevado <input type="checkbox"/> Muito Elevado <input type="checkbox"/>		

**Parecer do EPD:**

Data: 26/07/2022

**Finalidade:** Avaliar a presença de anticorpos não específicos ao dador no transplante renal no dador vivo e sua influência na sobrevivência do enxerto.

**Licitude:** fundamento previsto no artigo 9(2)(j), com as garantias do 89(1) do RGPD, e artigo 31(1) da LERGPD.

**Categorias de dados pessoais:** variáveis identificadas com detalhe na AIPD, datada de 13/06/2022, ponto 13 e protocolo de investigação, tendo presente o princípio da minimização dos dados.

**Conservação:** os dados serão alvo de pseudonimização, armazenados em local seguro, em área restrita com acesso limitado ao profissional de ligação e Investigador Principal, com acesso a ficheiros protegido por palavra-passe, efetuando-se a conservação até a conclusão da investigação, durante o prazo máximo de um (1) ano. Os dados recolhidos serão destruídos após a finalização do estudo.

**Comunicação de Dados:** não há partilha de dados pessoais.

Face ao exposto, e observadas as recomendações, entende-se que a presente AIPD apresenta os elementos necessários para assegurar que o tratamento é realizado em conformidade com o RGPD.

**Recomendações:**

1. Garantir medidas de segurança adicionais no transporte dos dados com recurso a dispositivos electrónicos de armazenamento (Laptop), nomeadamente através de medidas de cifragem e autenticação;
2. Em caso de necessidade de extensão de prazo e/ou de qualquer alteração dos pressupostos atinentes ao presente parecer o Investigador Principal deverá solicitar a reapreciação do projeto de investigação junto do EPD.

**Revisão AIPD:**

Data da próxima revisão: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Não carece de revisão.

**Anexos:**

1. Processo CES n.º 86/2022
2. Parecer CES (22/04/2022)
3. AIPD (13/06/2022)
4. Protocolo de Investigação

Encarregado de Proteção de Dados  
Assinado por: PAULO ALEXANDRE MOTA DA SILVA  
Data: 2022.07.26 11:09:11+01'00'  
Localização: CHUSJ

