



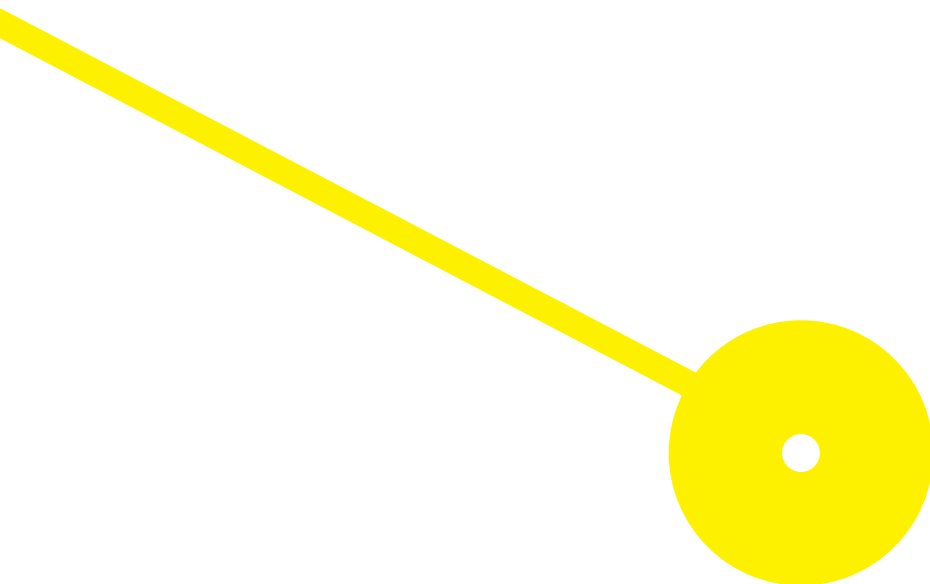
MESTRADO

Análises Clínicas e Saúde Pública – Imunohemoterapia e Transplantação

# Avaliação do *crossmatch* por citometria de fluxo

Daniela Portugal Marques

09/2021





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



## **Avaliação do *crossmatch* por citometria de fluxo**

### **Autor**

Daniela Portugal Marques

### **Orientadores**

Dr. António José Martinho Gomes Teixeira | Responsável Técnico-científico da área de Transplantação do Centro de Sangue e da Transplantação de Coimbra  
Professora Especialista Maria Manuela Amorim de Silva e Sousa | ESS|P.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**

Queria agradecer a todas as pessoas que contribuíram para que este trabalho fosse realizado e que me acompanharam ao longo desta etapa.

Um especial agradecimento aos meus pais e à minha irmã, que me apoiaram e acreditaram nas minhas capacidades.

Contudo, não poderia deixar de agradecer aos docentes da Escola Superior de Saúde do Porto e a todos os colaboradores do Centro do Sangue e da Transplantação de Coimbra que me ajudaram ao longo deste estágio.

A todos, muito obrigada!

## Resumo

O estágio realizou-se no serviço de transplantação do Centro de Sangue e Transplantação de Coimbra, que permitiu adquirir competências a nível das provas de *crossmatch*.

O *crossmatch* anti-linfocitário consiste no ensaio padrão utilizado na área da transplantação que permite avaliar a compatibilidade HLA entre um dador e recetor, prevenindo a rejeição do aloenxerto mediada por anticorpos.

A metodologia atual fornece informações sobre o risco da realização de um transplante, melhorando as taxas de aceitação do enxerto alogénico. No entanto, existem limitações na distinção de padrões de reatividade durante o processo de *crossmatch* por citometria de fluxo, considerando ligações não específicas que conduzem a resultados inexatos que impedem consequentemente o transplante. Desta forma, com os avanços no campo da imuno-histocompatibilidade, têm sido introduzidas atualizações no procedimento das provas cruzadas, como o *Halifax* e *Halifaster*, que possibilitam melhorar os resultados obtidos.

Para este projeto foram propostos métodos adaptados ao serviço, com o objetivo de comparar a sensibilidade e especificidade entre os protocolos de *crossmatch* e investigar a significância clínica na compatibilidade linfocitária entre dadores e recetores. A análise dos casos estudados revelou melhorias na utilização do protocolo *Halifax* estipulado comparando com o *Standard* para as classes HLA, especialmente para a classe II.

**Palavras-chave:** *Crossmatch*; Citometria de fluxo; Antígeno Leucocitário Humano; Anticorpos específicos contra o dador; Otimização de ensaios.

## **Abstract**

The internship took place at the transplantation service of the Blood and Transplantation Center of Coimbra, which allowed the acquisition of skills in crossmatch.

Anti-lymphocytic crossmatch is the standard assay used in transplantation that allows the assessment of HLA compatibility between a given donor and recipient, preventing antibody-mediated allograft rejection.

Current methodology provides information on the risk of performing a transplant, improving allogeneic graft acceptance rates. However, there are limitations in distinguishing reactivity patterns during the crossmatch process by flow cytometry, considering non-specific associations that lead to inaccurate results and consequently stop transplantation. Thus, with advances in the field of immunohistocompatibility, updates have been introduced such as Halifax and Halifaster, which makes it possible to improve the results obtained.

For this project, methods were adapted to the service with the aim of comparing sensitivity and specificity between crossmatch protocols, investigating the clinical significance of lymphocyte compatibility between donors and recipients was further investigated. The analysis of the studied cases revealed considerable improvements in the use of the stipulated Halifax protocol compared to the Standard for HLA classes, especially for class II.

**Keywords:** Crossmatch; Flow cytometry; Human Leukocyte Antigen; Donor specific antibodies; Assay optimization.

## Índice

<b>1.</b>	Introdução.....	1
<b>1.1.</b>	Complexo Major de Histocompatibilidade e Antígeno Leucocitário Humano.....	2
<b>1.1.1.</b>	Importância clínica do HLA na transplantação renal.....	4
<b>1.2.</b>	Técnicas de <i>Crossmatch</i> anti-linfocitário.....	5
<b>1.2.1.</b>	Citotoxicidade mediada pelo complemento.....	6
<b>1.2.2.</b>	<i>Crossmatch</i> clássico por citometria de fluxo.....	9
<b>1.2.3.</b>	Protocolo <i>Halifax</i> e <i>Halifaster</i> .....	10
<b>2.</b>	Objetivos.....	12
<b>3.</b>	Metodologia.....	13
<b>3.1.</b>	Procedimento.....	13
<b>3.2.</b>	População em estudo.....	13
<b>3.3.</b>	Células de doadores.....	17
<b>3.4.</b>	Isolamento celular.....	17
<b>3.4.1.</b>	Separação de células mononucleares de sangue periférico por gradiente de densidade.....	17
<b>3.4.2.</b>	Purificação de linfócitos T e B por microesferas imunomagnéticas.....	18
<b>3.5.</b>	Tratamento celular com pronase.....	19
<b>3.6.</b>	Protocolos de <i>Crossmatch</i> .....	19
<b>3.6.1.</b>	Citotoxicidade dependente de complemento.....	19
<b>3.6.2.</b>	<i>Crossmatch</i> por citometria de fluxo.....	20
<b>3.6.2.1.</b>	<i>XM-CF Standard</i> .....	20
<b>3.6.2.2.</b>	<i>XM-CF Halifax</i> .....	21
<b>3.6.2.3.</b>	<i>XM-CF Halifaster</i> .....	21
<b>3.7.</b>	Análise estatística.....	22
<b>4.</b>	Resultados.....	23
<b>4.1.</b>	Testagem de metodologias.....	23
<b>4.2.</b>	Efeito da pronase no controlo negativo.....	26
<b>4.2.1.</b>	Análise da expressão dos Linfócitos T.....	26
<b>4.2.2.</b>	Análise da expressão dos Linfócitos B.....	27
<b>4.3.</b>	Comparação do tempo de <i>XM-CF</i> .....	28
<b>4.4.</b>	Descrição dos resultados de <i>crossmatch</i> em estudo.....	29
<b>4.5.</b>	Análise do <i>crossmatch</i> virtual versus testes de métodos de <i>crossmatch</i> .....	41

<b>4.6.</b>	Avaliação da sensibilidade e especificidade entre métodos .....	42
<b>4.7.</b>	Ensaio metodológico em casos reais.....	43
<b>4.7.1.</b>	Caso 1.....	43
<b>4.7.2.</b>	Caso 2.....	44
<b>5.</b>	Discussão.....	45
<b>6.</b>	Conclusão.....	49
	Referências Bibliográficas.....	50
	Anexos.....	54

## Índice de Siglas e Abreviaturas

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
AHD	Anti-globulina Humana
APC	Células apresentadoras de Antígenos, do inglês <i>Antigen Presenting Cells</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	Citotoxicidade mediada pelo Complemento
CF	Citometria de Fluxo
CI	Cadeia Invariante
CLIP	Péptido da cadeia invariante associado à Classe II, do inglês <i>Class II associated Invariant-chain Peptide</i>
DTT	Ditiotreitol
DSA	Anticorpos Específicos contra o Dador, do inglês <i>Donor Specific Antibodies</i>
FSC	<i>Forward Scatter Channel</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HLA	Antígeno Leucocitário Humano, do inglês <i>Human Leukocyte Antigen</i>
Ig	Imunoglobulina
Ly	Linfócitos
MFI	Intensidade Média de Fluorescência
MHC	Complexo Major de Histocompatibilidade, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MHC-I	MHC Classe I
MHC-II	MHC Classe II
MIFM	Média de Intensidade de Fluorescência das Medianas
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Ficoeritrina
PMBC	Mononucleares do Sangue Periférico
RE	Retículo Endoplasmático
ROC	Curva Característica do Recetor
RMA	Rejeição Mediada por Anticorpos
SAB	<i>Single Antigen beads Assay</i>
SSC	<i>Side Scatter Channel</i>
TA	Temperatura Ambiente
TAP	Transportadores associados ao processamento de antígenos, do inglês <i>Transporters Associated with Antigen Processing</i>
TCR	Recetor de células T, do inglês <i>T-Cell Receptor</i>
XM	<i>Crossmatch</i>

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Interpretação dos resultados de <i>crossmatch</i> para os linfócitos T e B.....	6
Tabela 2 – Avaliação do teste por CDC e a sua interpretação.....	7
Tabela 3 – Descrição dos anticorpos anti-HLA das amostras em estudo.....	15
Tabela 4 – Descrição genética HLA dos dadores em estudo.....	17
Tabela 5 – Delineamento da técnica de <i>crossmatch</i> por CDC.....	20
Tabela 6 – Resumo da metodologia dos diferentes métodos de <i>crossmatch</i> em análise.....	22
Tabela 7 – Comparação e análise da testagem de metodologias I.....	23
Tabela 8 – Comparação e análise da testagem de metodologias II.....	25
Tabela 9 – Resultados dos diferentes protocolos de <i>crossmatch</i> para a célula D1.....	29
Tabela 10 – Resultados dos diferentes protocolos de <i>crossmatch</i> para a célula D2.....	30
Tabela 11 – Resultados dos diferentes protocolos de <i>crossmatch</i> para a célula D3.....	31
Tabela 12 – Resultados dos diferentes protocolos de <i>crossmatch</i> para a célula D4.....	32
Tabela 13 – Resultados dos diferentes protocolos de <i>crossmatch</i> para a célula D5.....	33
Tabela 14 – Resultados dos diferentes protocolos de <i>crossmatch</i> para a célula D6.....	34
Tabela 15 – Resultados dos diferentes protocolos de <i>crossmatch</i> para a célula D7.....	35
Tabela 16 – Resultados dos diferentes protocolos de <i>crossmatch</i> para a célula D8.....	36
Tabela 17 – Resultados dos diferentes protocolos de <i>crossmatch</i> para a célula D9.....	37
Tabela 18 – Resultados dos diferentes protocolos de <i>crossmatch</i> para a célula D10.....	38
Tabela 19 – Resultados dos diferentes protocolos de <i>crossmatch</i> para a célula D11.....	39
Tabela 20 – Resultados dos diferentes protocolos de <i>crossmatch</i> para a célula D12.....	40
Tabela 21 – Tabela de contigência <i>Standard vs Halifax</i> para a classe I.....	52
Tabela 22 – Tabela de contigência <i>Standard vs Halifax</i> para a classe II.....	53

## Índice de Figuras

Figura 1 – Complexo HLA no cromossoma 6.....	3
Figura 2 – Estrutura das moléculas MHC-I e MHC-II.....	3
Figura 3 – Processo de rejeição mediada por anticorpos.....	5
Figura 4 – Visualização microscópica dos diversos <i>scores</i> no XM-CDC.....	8
Figura 5 – Representações gráficas da configuração do XM-CF.....	9
Figura 6 – Fluxograma do procedimento do estudo laboratorial.....	13
Figura 7 – Princípio da técnica de SAB.....	14
Figura 8 – Isolamento de células mononucleares pelo método de separação por gradiente de densidade.....	18
Figura 9 – Resultado do <i>crossmatch</i> anti-linfocitário do caso 1.....	43
Figura 10 e 11 – Resultado do <i>crossmatch</i> anti-linfocitário do caso 2.....	44

## Índice de Gráficos

Gráfico 1 e 2 – Variação da MIFM C- entre o protocolo <i>Standard</i> (sem pronase) e <i>Halifax</i> (com pronase) para os LyT.....	26
Gráfico 3 e 4 – Variação da MIFM C- entre o protocolo <i>Standard</i> (sem pronase) e <i>Halifax</i> (com pronase) para os LyB.....	27
Gráfico 5 – Comparação do tempo em minutos para a realização das provas de XM-CF dos protocolos <i>Standard</i> , <i>Halifax</i> e <i>Halifaster</i> modificados.....	28
Gráfico 6 – <i>Crossmatch</i> virtual versus testes de métodos de <i>crossmatch</i> .....	41
Gráfico 7 – Análise da curva ROC para a avaliação metodológica.....	42

## 1. Introdução

O presente estudo laboratorial foi realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública, ramo de Imunohemoterapia e Transplantação da Escola Superior de Saúde do Porto. Este estágio teve uma duração aproximada de 4 meses e foi efetuado no Centro de Sangue e Transplantação de Coimbra do Instituto Português da Transplantação, que teve como objetivo a aprendizagem de conhecimentos e competências a nível das provas de *crossmatch* entre doadores e recetores renais.

A insuficiência renal crónica é uma doença em que os rins deixam de realizar de forma adequada as suas funções normais, cuja solução é, por vezes, o recurso ao transplante alogénico. A transplantação renal é, assim, um procedimento cirúrgico bem estabelecido que engloba a implantação de um rim saudável no doente após ponderação dos riscos associados. Atualmente é considerada a modalidade terapêutica mais eficaz no tratamento da insuficiência renal crónica terminal, tendo como principal finalidade a restituição da função renal, que se pretende prolongar no maior período de tempo possível, garantindo melhorias na qualidade de vida do doente (1).

A área da transplantação tem progredido rapidamente, particularmente nas últimas décadas, devido à constante evolução da prática cirúrgica, ao avanço das terapêuticas imunossupressoras e ao progresso do conhecimento científico da histocompatibilidade e imunobiologia da transplantação. Neste caso, destaca-se a diversidade das abordagens à monitorização imunológica, continuada, do doente quer na fase que antecede o transplante quer após o transplante renal. Embora a disponibilidade de rins esteja dependente de doadores vivos e doadores cadáver em morte cerebral, a escassez e a rejeição crónica são os principais obstáculos ao pleno sucesso do transplante (1).

Enquanto que os auto e isotransplantes não impõem uma barreira imunológica relevante ao nível da compatibilidade tecidual, no que respeita a alotransplantes, nomeadamente provenientes doadores cadáver em morte cerebral, em que a compatibilidade entre doente e dador é parcial, a rejeição celular/humoral é quase inevitável. Essencialmente, quanto maior o grau de compatibilidade no sistema HLA (Antigénio Leucocitário Humano, do inglês *Human Leukocyte Antigen*) entre o dador e recetor, previsivelmente maior será a taxa de sucesso no resultado do transplante. A diminuição de eventuais alvos que promovam o reconhecimento antigénico por parte do sistema imunológico do doente, com a conseqüente redução da produção de anticorpos específicos contra dador (DSA, do inglês *Donor Specific Antibodies*), estará na base do sucesso e da longevidade do enxerto (2).

Assim, a avaliação imunológica de doadores e potenciais recetores inclui critérios como a compatibilidade do grupo sanguíneo ABO/Rh (D), genotipagem do sistema HLA classe I (-A, -B, -C) e classe II (-DR, -DQ), pesquisa e identificação de anticorpos anti-HLA especialmente classe I, e análise de marcadores víricos, evitando o risco de transmissão de doenças como pelos vírus da imunodeficiência humana, hepatite B e C, citomegalovírus e Epstein-Barr (1). A execução destas análises é preponderante na determinação da segurança de um eventual transplante, que culmina com a realização de provas cruzadas finais entre as

células do dador e soros dos doentes, que permite avaliar a viabilidade e o risco imunológico do transplante (2). Este teste de *crossmatch* é um dos ensaios mais importantes para o sucesso do transplante renal e, tal como referido, tem também vindo a sofrer alguma evolução técnica, crucial para a crescente sobrevivência dos aloenxertos.

Desta forma, é fundamental a seleção criteriosa do melhor par dador-recetor pela análise do perfil imunológico dos doentes e do dador, visando minimizar possíveis reações patológicas e/ou efeitos adversos determinantes para a viabilidade do transplante.

### **1.1. Complexo Major de Histocompatibilidade e Antígeno Leucocitário Humano**

O Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) é constituído por um conjunto de genes altamente polimórficos, que se encontram localizados no braço curto do cromossoma 6 na posição 6p21.3 (3). As moléculas MHC encontram-se diretamente associadas ao desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico através da codificação de diversas estruturas proteicas expressas na superfície de células nucleadas, e atuam como recetores transmembranares que possibilitam o reconhecimento distinto e correto de antígenos (Ags) próprios e não próprios. Os genes são expressos co-dominantemente, ou seja, ambos os alelos são herdados em bloco provenientes de um haplótipo materno e paterno, que contribuem igualmente para o fenótipo.

No ser humano, esta região do genoma que constitui o MHC é designada de Antígeno Leucocitário Humano, inicialmente descrito por Jean Dausset em 1958, embora a correspondência de tecidos tenha sido sugerida por Alexis Carrel, George Snell e Peter Gorer em estudos com animais (4–6).

A porção cromossómica do MHC pode ser subdividida em três regiões distintas, partilhando a tarefa de apresentação de epítomos na superfície celular para o reconhecimento pelas células T: (a) MHC classe I (MHC-I), composto pelos *locis* HLA-A, -B e -C, expresso na grande maioria das células nucleadas, com a função de exibição de antígenos endógenos aos linfócitos (Ly) T CD8+, (b) MHC classe II (MHC-II), principalmente formadas por HLA-DR, -DQ e -DP, limitado às células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen Presenting Cells*) como as células dendríticas, monócitos/macrófagos e linfócitos B, para o reconhecimento de Ags exógenos às células T CD4+, (c) MHC classe III (MHC-III), inclui genes que codificam, entre outras, proteínas do sistema de complemento como C2 e C4 e os fatores de necrose tumoral (TNF) (Figura 1) (7–11)(11)(11)(11)(11)(11)(11)(11)(11)(11). No entanto apenas as moléculas MHC-I e MHC-II codificam proteínas de interesse para a transplantação que são reconhecidas pelo sistema imunológico do recetor, enquanto que MHC-III não atua na apresentação de antígenos às células T (3,12).

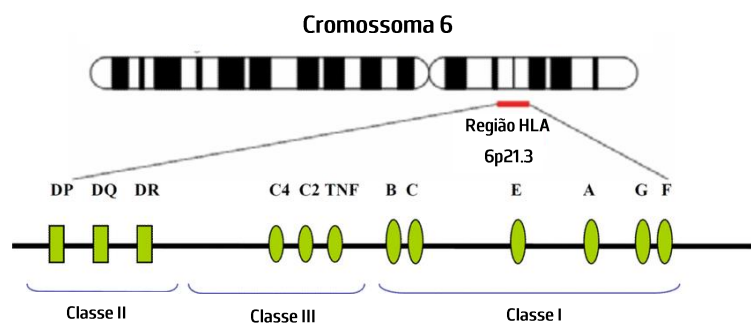


Figura 1 – Complexo HLA no cromossoma 6. Imagem adaptada de Li X, Fasano R, Wang E, Yao K-T, Marincola F. HLA Associations with Nasopharyngeal Carcinoma. *Curr Mol Med*. 2009;9(6):751–65.

As moléculas MHC-I apresentam-se na forma de uma cadeia pesada  $\alpha$  ancorada à membrana celular caracterizada por três domínios extracelulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ ). Para a manutenção da estrutura da molécula, a cadeia polipeptídica alfa necessita de estar acoplada através de uma ligação não covalente à  $\beta 2$ -microglobulina. O péptido antigénico interage com o sulco formado pelos domínios alfa 1 e alfa 2 da  $\alpha$ -hélice, estabelecendo o local da sua ligação para a apresentação aos recetores dos linfócitos T. Relativamente à estrutura do MHC-II, é composta por duas cadeias transmembranares  $\alpha$  e  $\beta$ , distinguindo-se as subunidades  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\beta 2$ . Nestas moléculas, o par composto pelas regiões  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  formam o vínculo para o péptido antigénico (Figura 2)(2,10,13).

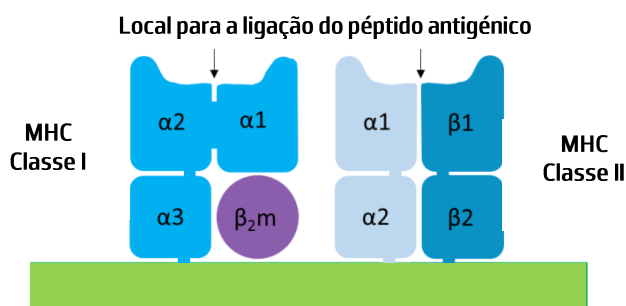


Figura 2 – Estrutura das moléculas MHC-I e MHC-II. Imagem adaptada de Peräsaari J. The relevance of donor-specific HLA antibodies in renal transplantation [Internet]. 2018

A apresentação de antígenos aos linfócitos T pode ocorrer através de duas vias: (a) Via endógena, relacionada com a deteção de células tumorais ou infetadas por vírus. No citosol, o proteossoma permite a degradação de proteínas patogénicas em péptidos mais pequenos, que vão ser transportados para o retículo endoplasmático (RE) pela proteína TAP (Transportadores associados ao processamento de antígenos, do inglês *Transporters Associated with Antigen Processing*), que interage com MHC-I. Na ligação do péptido antigénico à fenda da molécula MHC-I, o complexo migra através do aparelho de Golgi até à superfície da célula pela fusão com a membrana celular, de modo a ser exposto e reconhecido pelos

LyT citotóxicos CD8+. (b) Via exógena, nomeadamente para a eliminação de bactérias e antigénios desconhecidos ao organismo. Os antigénios exógenos podem ser capturados por algumas APC através de fagocitose e/ou endocitose e são internalizados formando um endossoma. A fusão com um lisossoma gera um endolisossoma, que permite a digestão das partículas internas em pequenos fragmentos através de enzimas proteolíticas. Paralelamente, a molécula MHC-II é sintetizada no RE e encontra-se associada à cadeia invariante (CI), que impede a ligação de péptidos. Posteriormente, o MHC-II é transportado via aparelho de Golgi, no qual a CI é digerida, ficando apenas a porção CLIP (Péptido da cadeia invariante associado à Classe II, do inglês *Class II associated Invariant-chain Peptide*). A vesícula contendo a molécula MHC-II juntamente com a fração CLIP, funde-se com os vacúolos endocíticos e os fragmentos dos péptidos exógenos unem-se ao MHC-II, auxiliados pela molécula HLA-DM que substitui o CLIP, sendo finalmente apresentados na superfície celular e reconhecidas pelos LyT *helper*CD4+ através do recetor TCR (Recetor de células T, do inglês *T-Cell Receptor*) (9,10,13,14).

### **1.1.1. Importância clínica do HLA na transplantação renal**

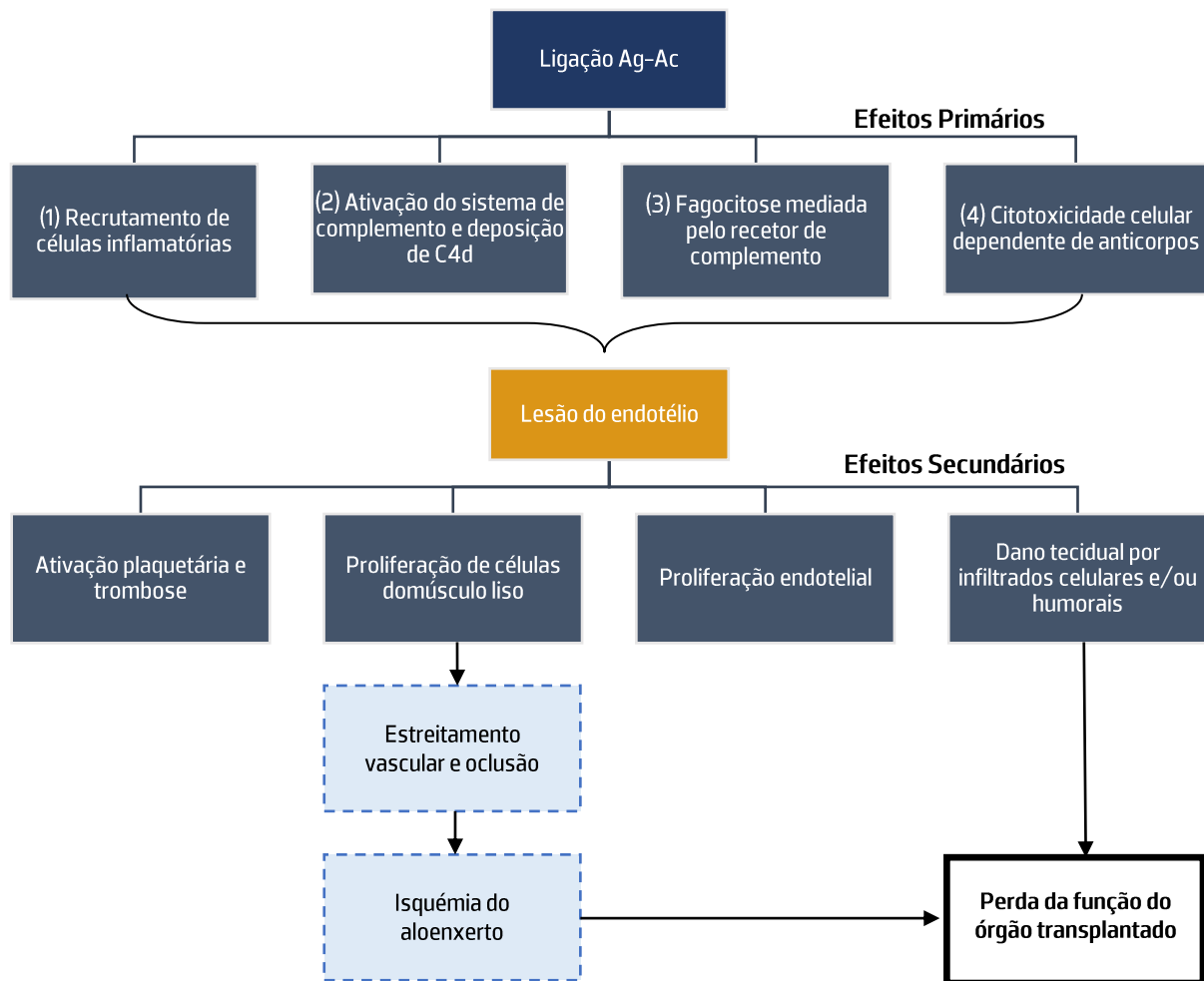
A sensibilização contra antigénios HLA pode desenvolver-se após a exposição a episódios transfusionais, infeções por vírus ou bactérias, gestações e transplantes, e manifestar-se no contexto do transplante renal, em diferentes graus que podem conduzir a uma rejeição mediada por anticorpos (RMA). A grande maioria destas rejeições é originada pela presença de aloanticorpos dirigidos contra antigénios HLA não próprios, expressos no endotélio vascular renal. A presença de anticorpos anti-HLA, e subsequente ligação aos antigénios HLA, poderá resultar na ativação de uma cascata de efeitos primários e secundários, que conduzem à perda da função do enxerto (Figura 3) (15–18).

A identificação de anticorpos anti-HLA específicos contra o dador tornou-se uma prática indispensável para a correspondência dos pré-requisitos para a realização de um transplante, em virtude de ser um fator que está diretamente associado a uma resposta imunológica humoral e celular contra o aloenxerto renal, permitindo a sua execução com maior segurança e sucesso (19,20).

De facto, doentes hipersensibilizados com a presença de DSA têm menor taxa de sobrevivência do aloenxerto renal quando comparados com doentes que não possuem até o momento do transplante ou desenvolvem *de novo* (21–23).

Desta forma, a condição imunológica dos doentes deve ser avaliada periodicamente a fim de monitorizar a presença de anticorpos anti-HLA contra o dador. Mais concretamente, em cerca de 20 a 30% dos doentes pós-transplantados ocorre a produção de DSA, principalmente de classe II, estando associados a um pior prognóstico em relação aos anticorpos anti-HLA classe I (8,20,24). Assim, o impacto clínico da presença de aloanticorpos depende da sua reatividade e tipo de especificidade HLA, constituindo uma contraindicação para o avanço de um transplante devido ao seu efeito destrutivo nos tecidos (25–27).

A realização de provas cruzadas de linfócitos torna-se uma ferramenta essencial para avaliar o risco da presença de DSA através da previsão de potenciais efeitos da resposta imunológica (3,12,25).



**Figura 3** – Processo de rejeição mediada por anticorpos. A rejeição de um aloenxerto resulta da ação conjunta de vários sistemas, podendo ainda ser classificada de hiperaguda (minutos a horas), aguda (dias a semanas) ou aguda tardia (3 meses após o transplante). Retirado de Cai J, Terasaki PI. Humoral theory of transplantation: Mechanism, prevention, and treatment. *Hum Immunol.* 2005;66(4): 334–342.

## 1.2. Técnicas de *Crossmatch* anti-linfocitário

O teste de *crossmatch* (XM) ou prova cruzada consiste na avaliação da reatividade humoral no soro de um doente contra os linfócitos T e B dador, numa fase pré-transplante. A resposta imunológica ocorre essencialmente devido à presença de anticorpos linfocitotóxicos, anti-HLA classe I e classe II, porém outros anticorpos anti-linfocitários poderão produzir reatividade no *crossmatch* induzindo ou não citotoxicidade celular mediada pelo complemento.

A observação de uma reação citotóxica após o cruzamento do soro de um receptor renal contra os linfócitos do dador é sugestiva da presença de anticorpos específicos anti-HLA. Mais concretamente, um *crossmatch* positivo contra os linfócitos T reflete a presença isolada de anticorpos anti-HLA contra o

dador classe I, enquanto que para os linfócitos B pode estar relacionado a DSA classe I e/ou classe II, por expressarem constitutivamente ambas as classes de HLA (Tabela 1) (3).

**Tabela 1** – Interpretação dos resultados de *crossmatch* para os linfócitos T e B. Adaptado de Mulley WR, Kanellis J. Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist. *Nephrology*. 2011;16(2):125–33

<b>Crossmatch</b>		<b>Interpretação</b>
<b>XM-LyT</b>	<b>XM-LyB</b>	
-	-	▪ Ausência ou presença de baixos títulos de DSA
+	+	▪ Presença de DSA classe I ou um conjunto de acs anti-HLA classe I e II
-	+	▪ Presença de DSA classe II ou presença de baixos títulos de acs anti-HLA classe I
+	-	▪ Erro técnico ou derivado de interferência de anticorpos não-HLA

Como referido anteriormente, a presença de anticorpos específicos contra o dador é um factor clinicamente relevante e é visto como uma contraindicação para o avanço da transplantação por estar associado a um maior risco de rejeição do órgão pelo doente, impossibilitando o seu sucesso. Desta forma, o ensaio de XM permite a avaliação do risco da realização de um transplante alogénico demonstrando a possibilidade de incompatibilidade de um determinado par dador-recetor (17,28).

A contínua evolução e otimização de técnicas disponíveis possibilita um aumento da sensibilidade e especificidade no reconhecimento de respostas imunológicas e assim, melhorar os resultados na área da transplantação. Para este estudo laboratorial foram executadas as técnicas de XM por citotoxicidade mediada pelo complemento (CDC) e por citometria de fluxo pelo método *Standard*, *Halifax* e *Halifaster* modificados. De seguida é apresentada uma compreensão básica das práticas realizadas como também uma associação relativamente às suas vantagens e desvantagens, permitindo uma melhor interpretação dos resultados.

### **1.2.1. Citotoxicidade mediada pelo complemento**

O *crossmatch* por citotoxicidade mediada pelo complemento (XM-CDC) foi introduzido por Terasaki e McClelland no início dos anos 60, estabelecendo-se ainda nos dias de hoje como o método convencional mais amplamente utilizado para a deteção de anticorpos específicos anti-HLA, em conjunto com outras técnicas mais sensíveis (6,29). A importância da prova cruzada pré-transplante foi demonstrada em 1969 por Terasaki e Patel através de um estudo que indicou em 80% dos transplantes realizados com resultados de um XM positivo, ocorreu uma rejeição imediata do órgão. Neste estudo verificaram ainda

que os doentes com alta probabilidade de ter anticorpos, tais como mulheres com histórico de gravidez prévia ou doentes retransplantados, estavam diretamente relacionados com o aumento significativo no risco de perda do aloenxerto (5,30,31). A partir desse momento, a presença de uma prova cruzada positiva foi considerada como uma contraindicação à realização de um transplante.

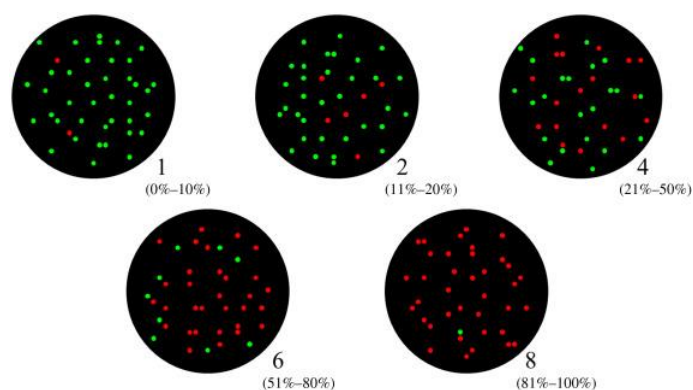
A técnica estabelecida envolve inicialmente a separação de linfócitos do dador, nomeadamente linfócitos T, os quais são posteriormente testados contra o soro do doente em meio de microplaca. Se estiverem presentes anticorpos específicos contra os antígenos HLA do dador, irá ocorrer a formação de complexos Ag-Ac (antígeno-anticorpo) que resultam na ativação da cascata do complemento via clássica que, subsequentemente provoca a lise celular (3,12,23). De modo a reforçar os efeitos da ativação do sistema, é adicionado complemento, normalmente derivado de soro de coelho, possibilitando avaliar a reatividade humoral. A lise celular é determinada pela adição de corantes específicos que são captados apenas pelos linfócitos lisados devido à rutura da membrana lipídica, facilitando a diferenciação das células mortas das vivas (32). Por oposição, o complemento não atua quando não ocorre uma interação antígeno-anticorpo, mantendo a integridade da membrana celular e o corante não penetra nas células vivas.

A interpretação na leitura do teste é realizada através do uso de um microscópio de fluorescência, que permite a análise da percentagem de células mortas quando comparadas com um controlo negativo (soro sem anticorpos anti-HLA). A visualização celular é correlacionada a uma tabela de pontuações de 0-8, que avalia de forma semi-quantitativa a força das reações (Tabela 2):

**Tabela 2 – Avaliação do teste por CDC e a sua interpretação**

Mortalidade Celular (%)	Pontuação	Interpretação
-----	0	Ilegível
0-10	1	Negativo
11-20	2	Fracamente Positivo
21-50	4	Positivo
51-80	6	Positivo
81-100	8	Fortemente Positivo

Um *crossmatch* é considerado negativo quando se verifica <10% de células mortas, sendo que um *score* de 2 é considerado como o *cut-off* mínimo para a consideração de um XM-CDC positivo, em que é possível notar uma mortalidade celular entre 11-20%. A observação de uma pontuação de nível 8 representa uma reação altamente positiva, no qual quase todas as células aparentam ter sofrido lise (Figura 4) (3,12,33).



**Figura 4** – Visualização microscópica dos diversos *scores* no XM-CDC. Imagem proveniente de Gautreaux MD. Histocompatibility Testing in the Transplant Setting. Kidney Transplantation, Bioeng Regen. 2017; 17(Complement-Dependent Cytotoxicity):223–34

No entanto, têm sido apurados alguns casos de doentes transplantados sem anticorpos detetáveis por CDC, que experienciaram perda ou rejeição do excerto. O surgimento de resultados falsos negativos na presença de DSA pode ocorrer em determinadas situações: (a) incapacidade de ativação do complemento devido à existência de baixos títulos de anticorpos anti-HLA, (b) apresenta reações de anticorpos anti-HLA não fixadores do complemento e não HLA, (c) linfócitos com baixa expressão antigénica (3,34). Conforme foi apurado, houve a necessidade de se desenvolverem métodos mais sensíveis que facilitassem a sua deteção e por isso, foram realizadas modificações à versão do teste de *crossmatch* por CDC clássico (31). O CDC-AHD consiste no uso de anti-globulina humana (AHD), que se vai unir aos anticorpos anti-HLA ligados à superfície dos linfócitos, aumentando a disponibilidade dos recetores Fc. A probabilidade de ligação do complemento aumenta consideravelmente para se dar o início da ativação da cascata e se revelar como um resultado de XM positivo, quando comparado ao CDC original (35). A amplificação das reações de citotoxicidade promove a diminuição nas falhas na deteção de DSA e assim, melhorar a taxa de sensibilidade da técnica (3,31,32,36).

A presença de autoanticorpos numa amostra pode ainda influenciar a manifestação de resultados como falsos positivos no CDC em cerca de 20%, e impedir incorretamente a realização de um transplante, visto que geralmente os anticorpos IgM não são prejudiciais para um aloenxerto (3,32,37,38). Em caso de dúvida, deve ser realizado um *auto-crossmatch*, que consiste no cruzamento de um soro e células do próprio. O CDC deve ser também repetido após um tratamento com o agente redutor Ditiotreitól (DTT), que cliva as ligações dissulfeto dos Acs IgM e reduz a sua atividade, não afetando a capacidade de reação das restantes classes de anticorpos, nomeadamente IgG (12,39). Caso estejamos perante um XM-CDC positivo, em que após a adição de DTT revelou ser um resultado negativo, existe uma grande probabilidade de ter sido causado por autoanticorpos e não por DSA.

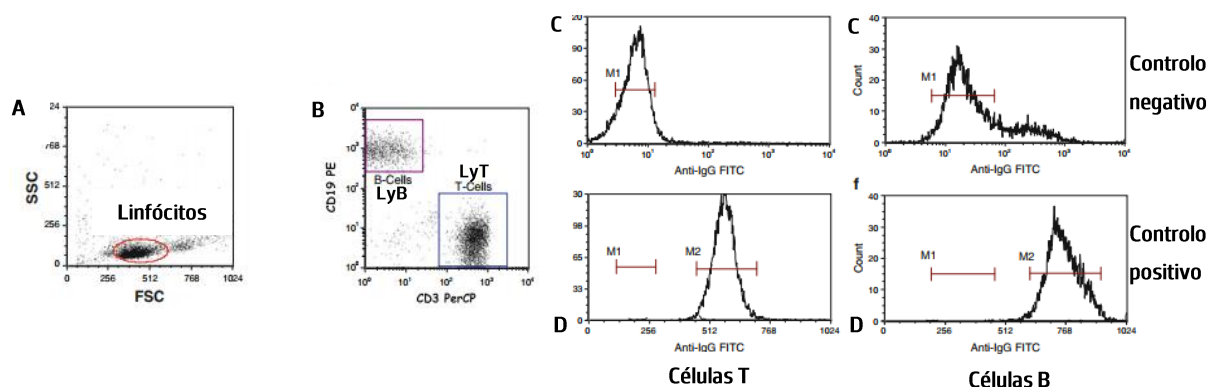
Apesar do ensaio do CDC ter uma série de falhas a nível da sensibilidade, este representa um teste básico funcional que tem um papel importante na prevenção da rejeição mediada por anticorpos e/ou perda do órgão transplantado. A indicação de um CDC positivo, especialmente para os LyT que expressam moléculas HLA classe I, é um fator clinicamente decisivo na transplantação devido à alta incidência de falhas associadas (30,40,41).

A fim de melhorar a sobrevivência de aloenxertos foram desenvolvidos métodos mais sensíveis e eficazes na consideração de anticorpos específicos contra o dador, que têm ganho cada vez mais atenção na avaliação pré-transplante, como a citometria de fluxo (CF) (31).

### 1.2.2. Crossmatch clássico por citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo envolve a análise de vários parâmetros físico-químicos de partículas, como o tamanho e complexidade, através da deteção da dispersão da luz e da fluorescência emitida por fluorocromos, que é diretamente proporcional ao número de ligações moleculares (28).

Na preparação do ensaio, as células de interesse são marcadas especificamente por anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos característicos, sendo posteriormente analisadas no equipamento de citometria. Quando as amostras são adquiridas pelo sistema de pressão do citómetro de fluxo, as células em suspensão são intercetadas individualmente por um feixe de luz proveniente de um determinado laser, que resulta na refração da luz e ativação dos fluorocromos, que vão emitir determinados comprimentos de onda captados pelos detetores. Nestes sensores ocorre a conversão dos sinais luminosos em elétricos, e posteriormente em digitais, que são analisados por um *software* computacional específico. Uma análise multiparamétrica é feita através de representações gráficas, como histogramas e *dot-plots*, que interpretam a intensidade de fluorescência emitida pelo fluorocromo e as respetivas características celulares (Figura 5) (25,32).



**Figura 5** – Representações gráficas da configuração do XM-CF. (A) “Gate” dos linfócitos, determinado pelos parâmetros SSC (*Side Scatter Channel*), que avalia a complexidade da célula e FSC (*Forward Scatter Channel*), que deteta o tamanho celular; (B) Marcação e identificação de reações de XM para as células T (CD3-PerCP) e para as células B (CD19-PE); (C e D) Comparação da fluorescência emitida pela anti-IgG FITC num controlo negativo e num controlo positivo respetivamente. Adaptado de Bray RA. Lymphocyte crossmatching by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2013;1034:285–96.

A utilização da citometria de fluxo no *crossmatch* (XM-CF) foi inicialmente descrita por Garovoy em 1983 e tem sido amplamente aplicada na transplantação de órgãos sólidos (42). Esta metodologia é considerada a ferramenta mais sensível para a avaliação da presença de anticorpos contra as células de um determinado dador visto que deteta não só baixos níveis de anticorpos anti-HLA como também anticorpos não fixadores de complemento, ao contrário do XM por CDC (28,32,43). Isto acontece porque foi demonstrado que a presença deste tipo de anticorpos pode influenciar negativamente a sobrevivência de um transplante, especialmente num doente de alto risco (44).

A determinação de um XM-CF positivo revelou estar associado a um risco elevado de rejeição do enxerto por parte dos recetores, enquanto alotransplantes com resultados negativos por XM-CF em conjunto com o teste por CDC, evidenciaram menor taxa de rejeição e com subsequente melhor prognóstico (3,44-46).

O fundamento deste ensaio envolve inicialmente a incubação de células mononucleares do dador com o soro do doente. A posterior deteção de ligações de aloanticorpos aos linfócitos é realizada pela adição de um anticorpo anti-IgG, que se vai unir aos complexos Ag-Ac, caso estes estejam presentes. As populações celulares são ainda diferenciadas pela utilização de marcadores específicos (anticorpos monoclonais), como o anti-CD3 para os linfócitos T e anti-CD19 para os linfócitos B respetivamente, permitindo uma avaliação simultânea da reatividade imunológica (25,32,47). Uma posterior análise gráfica dos níveis de fluorescência e do cálculo do *cut-off* do teste através comparação da mediana da reação com o controlo negativo, permite avaliar a prova cruzada e concluir a expressão dos resultados como positivos ou negativos (32).

Embora a importância da técnica esteja bem definida, a existência de resultados discordantes entre um XM-CF positivo mas negativo por parte do CDC, tem causado alguma controvérsia particularmente para os LyB (31,41). As dúvidas centram-se na verdadeira significância clínica de um XM-CF positivo, que pode ser causado pela presença de ligações inespecíficas de anticorpos aos recetores Fc, que levam a apresentação de resultados como falsos positivos. Embora se verifique que a técnica apresenta um alto nível de sensibilidade, nota-se que a sua eficiência é comprometida pela falta de especificidade (41,45,48). Desta forma, foram introduzidas atualizações ao método de XM-CF pela preparação celular com pronase, que elimina potencialmente a deteção de anticorpos irrelevantes (31,47,49).

### **1.2.3. Protocolo Halifax e Halifaxer**

O protocolo original de *crossmatch* é um procedimento consideravelmente longo e demorado, exigindo diversas horas para ser concluído e pode levar a atrasos significativos para a transplantação. O tempo alargado de espera pode comprometer a qualidade geral dos órgãos, contribuindo para o agravamento da probabilidade de isquemia do enxerto e outros danos irreversíveis (50).

Dr. Robert Liwski, médico patologista, é o principal responsável pela inovação do XM-CF, desenvolvendo em 2011 o protocolo *Halifax*, e tendo implementado uma versão melhorada em 2014 designada de *Halifaster*. Segundo Liwski, as suas investigações resultaram no desenvolvimento de protocolos válidos mais rápidos e eficazes, impactando positivamente os resultados dos doentes (51).

Em ambos os métodos otimizados de *crossmatch*, foram modificados parâmetros que permitem reduzir não só o tempo da sua execução como também a economia de despesas associadas, sem prescindir da qualidade e sensibilidade da técnica. Durante o estudo, foi possível comprovar que a alteração de determinadas variáveis permitia uma redução em mais de 60% do tempo e a obtenção de resultados mais consistentes na confirmação da compatibilidade do órgão em comparação com o ensaio padrão. As modificações englobam a diminuição dos diversos tempos de lavagem, o aumento da proporção do soro para a suspensão celular e a utilização de uma temperatura de incubação mais alta em tempo reduzido (50).

Para além disso, o ensaio atual foi modificado através do tratamento prévio dos linfócitos do dador com pronase (47). Esta substância é caracterizada por ser uma enzima proteolítica que tem como função a atenuação da expressão de recetores Fc na superfície das células T e B, de modo a reduzir a reatividade de fundo no XM-CF causada por ligação de complexos imunes não específicos (48,49). A sua utilização visa proporcionar uma maior especificidade e sensibilidade à técnica, no entanto o tema é algo controverso pois existe uma grande discrepância nas investigações em relação ao seu papel nos resultados do XM-CF. Enquanto alguns estudos referem pela positiva a sua aplicação, outros indicam a obtenção de provas de *crossmatch* falsamente incompatíveis, o que prejudica a sua implementação (52,53). Esta discordância é explicada pela possibilidade desta enzima provocar alterações na conformação de antígenos ou outras moléculas presentes na superfície celular como o HLA, originando uma maior acessibilidade de ligação a epítomos expostos pela pronase e causar uma reação na prova cruzada não significativa (47).

Adicionalmente, no procedimento *Halifaster* foi incorporada a técnica de isolamento de linfócitos, no qual as células são marcadas por microesferas magnéticas e separadas através do uso de uma coluna magnética. Este método permite melhorar a pureza dos linfócitos em comparação com a separação por gradiente de densidade e minimizar ligações não específicas que provoquem potencialmente interferência no decorrer do *crossmatch* (50).

## **2. Objetivos**

O projeto tem como principal objetivo avaliar comparativamente a sensibilidade e especificidade dos diferentes protocolos de *crossmatch* e assim, apurar consecutivamente o impacto da presença de anticorpos específicos contra o dador no resultado. Pretende-se ainda analisar uma possível transposição dos dados obtidos para a otimização da prática clínica-laboratorial na seleção do par dador-recetor na transplantação renal.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Procedimento

O estudo iniciou-se pela escolha seletiva de uma população de doentes renais baseada nas suas características serológicas (ponto 3.2). Consequentemente foi selecionado um conjunto de dadores com tipagem HLA de interesse a nível imunológico e de acordo com os doentes em análise. Após a colheita de amostras dos dadores, foi realizado o isolamento das suas células mononucleares com a posterior execução de diversas provas cruzadas contra linfócitos T e B, de modo a comparar as mesmas para a avaliação de um potencial *crossmatch*. A utilização de células de dadores e soros de doentes está autorizada com o consentimento informado para estudos.

Para este ensaio laboratorial experimental foram cruzados oito soros contra doze células de dadores, sendo avaliados por quatro técnicas diferentes de *crossmatch*: (1) *Standard*, que consiste no método protocolar executado no Centro de Sangue e Transplantação de Coimbra; (2) *Halifax*; (3) *Halifaster* e por (4) CDC (Figura 6). Ambos os métodos otimizados de *Halifax* e *Halifaster* foram modificados e adaptados ao serviço de transplantação através de realização de diferentes testagens que analisaram a modificação de diferentes variáveis. Posteriormente, foram comparados os ensaios metodológicos, *Standard* e *Halifax* modificado, na pesquisa de compatibilidade linfocitária em dois casos reais, avaliando a sua possível aplicação. Na execução deste estudo foram utilizadas medidas apropriadas para a centrífuga *Kubota 5910*.

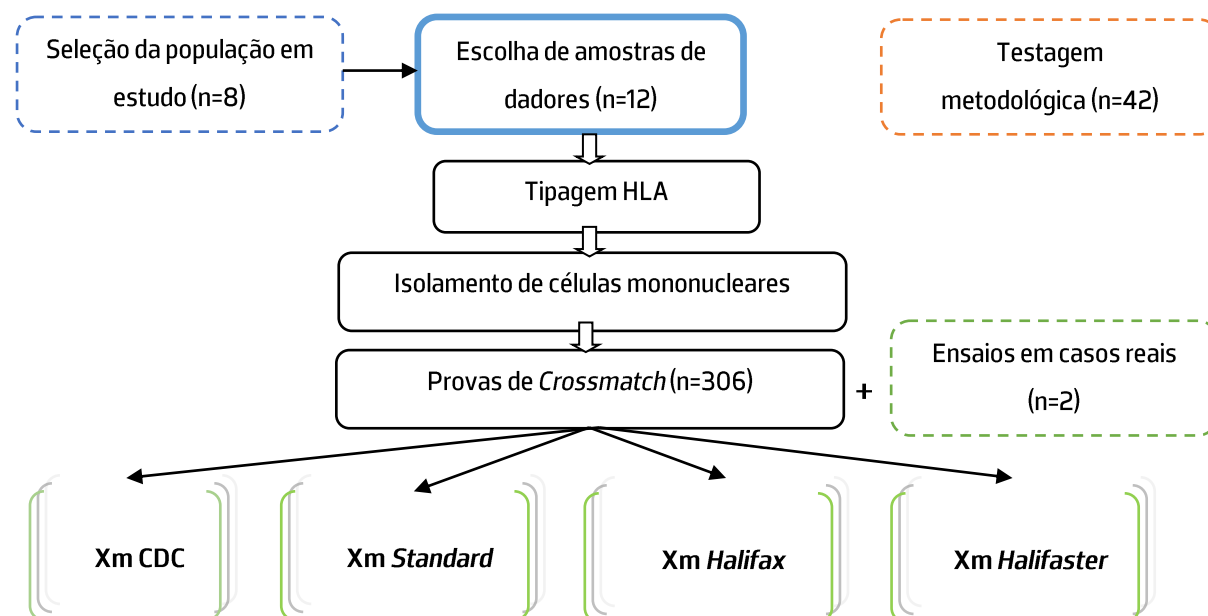


Figura 6 – Fluxograma do procedimento do estudo laboratorial

#### 3.2. População em estudo

A população em estudo inclui oito soros de monitorização pós-transplante provenientes de doentes com insuficiência renal crónica previamente estudados no contexto da alosensibilização HLA, durante o ano

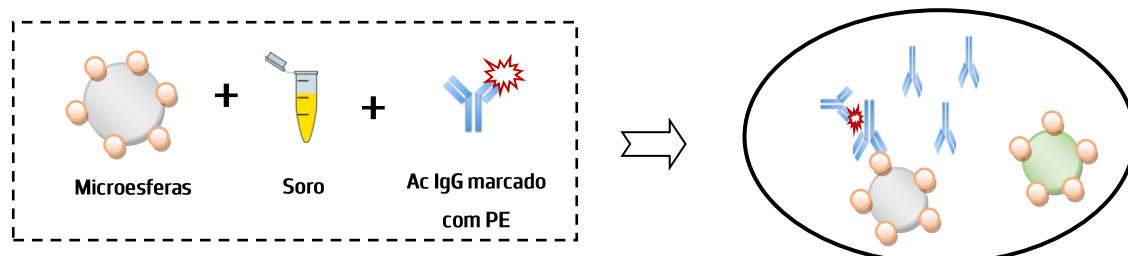
de 2017 a 2021. A escolha das amostras em análise foi categorizada não só pela diversidade da presença/ausência de anticorpos específicos contra o antígeno HLA como também pelo nível da intensidade média de fluorescência (MFI) dos mesmos:

- Soros hipersensibilizados com presença de anticorpos anti-HLA ( $MFI \geq 10000$ );
- Presença de anticorpos anti-HLA com valores intermédios ( $MFI 1000-10000$ );
- Ausência de anticorpos anti-HLA.

No entanto, foram descartadas amostras que apresentaram baixo volume de soro e/ou revelaram a presença de auto-anticorpos.

A pesquisa de anticorpos alogénicos contra o Ag HLA classe I (HLA-A, -B, -C) e classe II (HLA -DQ, -DR) foram determinados pela técnica de *Single Antigen Beads assay* (SAB) em plataforma Luminex. Este imunoensaio é usado rotineiramente no estudo de DSA, permitindo a realização de um *crossmatch* virtual e consequentemente prever potenciais reações contra determinadas especificidades HLA. A sensibilidade adicional fornecida por este ensaio possibilita a determinação de anticorpos HLA que não são particularmente detetáveis por outras técnicas, melhorando subsequentemente a taxa de sucesso do transplante e/ou especialmente retransplantes. De acordo com a tipagem do dador, a presença de anticorpos contra o dador são avaliados.

O princípio básico deste método caracteriza-se pela utilização de microesferas revestidas por antígenos recombinantes HLA, distinguindo-se pela impregnação de fluorocromos em diferentes proporções, que permite a emissão de um sinal único que identifica a especificidade do anticorpo HLA. Na presença de um soro que contenha anticorpos contra o dador, estes vão reagir e ligar-se à microesfera característica que expressa a molécula HLA correspondente. A ligação é posteriormente detetada por um segundo anticorpo IgG, normalmente marcado por ficoeritrina (PE), que ao ser excitado por um laser apropriado integrado no sistema Luminex, emite um sinal fluorescente exclusivo indicando a presença do imunocomplexo (Figura 7). A combinação dos diversos sinais emitidos pelos fluorocromos permite não só determinar o analito respectivo como também quantificar a magnitude da intensidade da junção Ag-Ac, que corresponde proporcionalmente à ligação do PE (54–56).



**Figura 7** – Princípio da técnica de SAB. As microesferas contêm moléculas de um HLA específico. Na presença de Acs respetivos para essa especificidade HLA, ocorre uma ligação Ag-Ac que é detetada por um segundo Ac anti-IgG, marcado por ficoeritrina (PE). Os lasers do sistema Luminex permitem a determinar os sinais emitidos pela microesfera que revela a especificidade HLA em análise, e a sua intensidade através da fluorescência derivada do PE.

A presença de um anticorpo anti-HLA foi considerada positiva quando a intensidade média de fluorescência atingiu um valor igual ou superior a 1000 e negativa quando é apresentado um MFI inferior a 1000. Os soros analisados são caracterizados pelo seguinte perfil de alo-sensibilização HLA (Tabela 3):

Tabela 3 – Descrição dos anticorpos anti-HLA das amostras em estudo

Soros	Ano	Anticorpos anti-HLA (MFI)*	
		Classe I	Classe II
<b>S1</b>	2021	Ausência	
<b>S2</b>	2021	Ausência	
<b>S3</b>	2020	<b>A26</b> (8466); <b>A25</b> (6878); <b>A43</b> (6491); <b>A66</b> (4917); <b>B72</b> (4777); <b>Cw1</b> (1137); <b>Cw12</b> (1070)	<b>DQ8</b> (22801); <b>DQ7</b> (22403); <b>DQ9</b> (22330); <b>DR103</b> (22220); <b>DQ4</b> (22051); <b>DR13</b> (21754); <b>DQ6</b> (20852); <b>DR11</b> (20605); <b>DQ5</b> (19746); <b>DR16</b> (17819); <b>DR12</b> (17348); <b>DR51</b> (14772); <b>DR8</b> (14680); <b>DR7</b> (11206); <b>DR15</b> (10347); <b>DR4</b> (4690); <b>DR9</b> (1478)
<b>S4</b>	2017	<b>A68</b> (12692); <b>A2</b> (9187); <b>A69</b> (7103); <b>A11</b> (7003); <b>B57</b> (6514); <b>B67</b> (4778); <b>B58</b> (4484); <b>A29</b> (3126); <b>B77</b> (2089); <b>B48</b> (2085); <b>A66</b> (1600); <b>Cw7</b> (1540); <b>B81</b> (1460); <b>Cw4</b> (1452); <b>Cw14</b> (1268); <b>Cw18</b> (1266); <b>Cw17</b> (1236); <b>Cw12</b> (1180); <b>Cw6</b> (1081); <b>A43</b> (1077); <b>Cw1</b> (1030); <b>A24</b> (1012); <b>B44</b> (1005)	<b>DR16</b> (4767); <b>DR7</b> (1774); <b>DQ7</b> (1761); <b>DR52</b> (1712); <b>DQ9</b> (1198); <b>DR103</b> (1115); <b>DR9</b> (1093); <b>DR10</b> (1092)
<b>S5</b>	2018	<b>A2</b> (7650); <b>A11</b> (3271)	<b>DR51</b> (23359); <b>DR103</b> (13582); <b>DP17</b> (12900); <b>DR15</b> (10033); <b>DQ4</b> (6130); <b>DR1</b> (6004); <b>DQ6</b> (4697); <b>DQ2</b> (4619); <b>DQ5</b> (4203); <b>DR10</b> (4009); <b>DQ9</b> (3973); <b>DR9</b> (3410); <b>DQ8</b> (2909)

Tabela 3 – Descrição dos anticorpos anti-HLA das amostras em estudo (continuação)

Soros	Ano	Anticorpos anti-HLA (MFI)*	
		Classe I	Classe II
S6	2020	B56 (11422); B58 (11162); A68 (10327); B63 (9538); A33 (9320); A69 (8229); B57 (8176); A34 (8077); B67 (7431); A66 (6674); B55 (6461); B42 (6011); A36 (5235); A24 (3803); A32 (3759); A3 (3076); A25 (3032); A2-2934; A31 (2634); A74 (2530); B54 (2498); B81 (2213); B7 (2162); B82 (2127); A29 (1901); A26 (1269); B49 (1264); A30 (1037)	DQ6 (9708); DQ9 (8651); DQ8 (7822)
		Cw16 (11970); B8 (6883); A68 (4760); B75 (4422); Cw7 (3972); B35 (3252); A33 (3076); A66 (2586); A69 (2340); A29 (2189); Cw8 (1897); Cw4 (1691); A34 (1676); Cw17 (1486); A43 (1324); B67 (1316); B63 (1241); B58 (1240); Cw5 (1218); A11 (1179); A80 (1154); B65 (1120); B37 (1094); B73 (1087); Cw10 (1056); Cw15 (1051); Cw2 (1043); B44 (1041); B57 (1027); B82 (1020); B72 (1002); Cw14 (1001)	DR53 (24886); DQ2 (16661); DQ4 (15186); DQ8 (14720); DQ6 (12271); DQ9 (11587); DQ7 (10982); DR4 (8802); DR7 (3738); DR9 (3717); DR103 (1772); DR1 (1678); DR14 (1413); DR12 (1081); DR8 (1066); DR15 (1007)
		A2 (10245); B57 (5034); B58 (4829); A3 (2811); A43 (1735); A29 (1338); Cw2 (1255); Cw15 (1014)	DQ9 (14081); DQ8 (13499); DQ4 (11846); DQ7 (10855); DQ2 (7852); DR10 (7015); DR53 (5483); DR14 (4804); DR9 (4399); DR4 (2354); DR103 (1528)

Nota: Apenas estão apresentados anticorpos anti-HLA para os quais estes são valorizáveis (MFI ≥1000) e não na sua totalidade

### 3.3. Células de dadores

Para a execução de todos os procedimentos de *crossmatch* foram utilizadas células provenientes de duas fontes: (1) amostras diárias de sangue periférico colhidas em tubos com EDTA K3 de dadores voluntários saudáveis ou (2) a partir de células do baço de dadores cadáver com prévia preparação e congelação. Apenas foram consideradas amostras em condições ótimas designadas de D1-D12, sendo excluídas aquelas que apresentaram baixa concentração de linfócitos ou o tempo da sua colheita até à sua análise tenha ultrapassado as 24 horas. No total foram consideradas doze células com caracterização genética HLA pré-determinada e de acordo com o perfil serológico da amostragem elegida para estudo (Tabela 4):

Tabela 4 – Descrição genética HLA dos dadores em estudo

Amostra celular	Origem	Tipagem HLA
D1	Sangue periférico	A*03, *26; B*51, *38; DRB1*01, *13; DQB1*05, *06
D2	Sangue periférico	A*25, *32; B*44, *44; DRB1*07, *15; DQB1*02, *06
D3	Sangue periférico	A*25, *32; B*44, *44; C*03, *16; DRB1*07, *15; DQB1*02, *06
D4	Sangue periférico	A*02, *33; B*14, *55; C*01, *08; DRB1*07, *15; DQB1*02, *06
D5	Sangue periférico	A*23, *29; B*72, *58; C*02, *07; DRB1*07, *10; DQB1*05, *09
D6	Sangue periférico	A*02, *24; B*44, *58; C*03, *05; DRB1*04, *11; DQB1*07, *08
D7	Sangue periférico	A*11, *32; B*35, *61; C*02, *04; DRB1*01, *13; DQB1*05, *06
D8	Sangue periférico	A*24, *32; B*07, *65; C*07, *08; DRB1*04, *07; DQB1*08, *09
D9	Sangue periférico	A*02, *26; B*27, *44; C*01, *05; DRB1*01, *13; DQB1*05, *06
D10	Sangue periférico	A*01, *26; B*45, *50; C*06, *06; DRB1*01, *04; DQB1*05, *08
D11	Baço	A*02, *33; B*07, *14; C*07, *08; DRB1*13, *15; DQB1*06, *06
D12	Sangue periférico	A*11, *68; B*35, *51; C*04, *15; DRB1*04, *04; DQB1*08, *08

Nota: Para algumas células não temos informação sobre a especificidade Cw

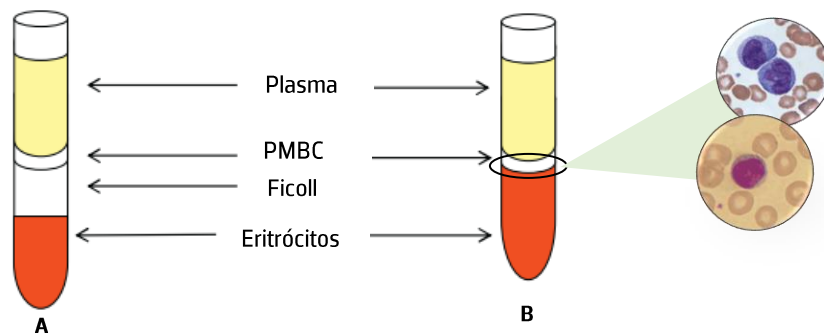
### 3.4. Isolamento celular

#### 3.4.1. Separação de células mononucleares de sangue periférico por gradiente de densidade

As amostras de sangue periférico em EDTA foram previamente diluídas a ½ com soro fisiológico e vertidas sobre uma camada de *Lymphoprep* com densidade específica de 1.077. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 800xg por 20 minutos com desaceleração caracterizada por travagem mínima. Este procedimento vai ocasionar uma separação eficiente entre os diferentes tipos celulares devido às diferenças de densidades entre as células sanguíneas. A solução por ser mais densa que os

linfócitos, plaquetas e monócitos, vai permitir que estes se mantenham na interface plasma-Lymphoprep, enquanto que os granulócitos e eritrócitos se sedimentam (Figura 8) (57). Seguidamente, o anel de células mononucleares (PBMC) foi removido e diluído com HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) a ½ com posterior centrifugação a 290xg por 10 minutos. O sobrenadante foi rejeitado e as células foram ressuspensas em 1 ml de HBSS.

Após a contagem hematológica, a concentração de PBMC foi ajustada para  $3 \times 10^6$  células/mL.



**Figura 8** – Isolamento de células mononucleares pelo método de separação por gradiente de densidade; (A) Separação celular com Ficoll; (B) Divisão celular prévia à utilização de Ficoll. Imagem adaptada de Lu, Y., Ahmed, S., Harari, F., & Vahter, M. Impact of Ficoll density gradient centrifugation on major and trace element concentrations in erythrocytes and blood plasma”. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2015. 29, 249–254.

### 3.4.2. Purificação de linfócitos T e B por microesferas imunomagnéticas

Aproximadamente uma concentração de  $10 \times 10^6$  células/mL após tratamento com pronase (ponto 3.5) foi utilizada para executar a separação de linfócitos para o protocolo Halifaster. A purificação de linfócitos foi realizada segundo o método de seleção positiva utilizando microesferas imunomagnéticas e de acordo com as instruções do kit para as células B e T (*EasySep™ Human CD19 positive selection kit II*; *EasySep™ Human CD3 positive selection kit II*; *STEMCELL Technologies Inc*). Para o isolamento de linfócitos B utiliza-se um complexo de anticorpos monoclonais direcionados ao reconhecimento do CD19, sendo posteriormente adicionada uma suspensão de partículas magnéticas que se ligam às células. As células marcadas são atraídas para a parede do tubo quando este é colocado numa coluna magnética, enquanto o sobrenadante é introduzido num novo tubo para proceder à separação dos linfócitos T. A técnica para o seu isolamento ocorre de forma semelhante, mas neste caso, a mistura de anticorpos liga-se ao CD3, descartando-se no final as restantes células. Após o isolamento de CD19+ e CD3+ separadamente, as células são ressuspensas em RPMI de modo a removê-las da parede do tubo para posterior estudo.

Após isolamento de linfócitos B e T pela técnica de microesferas imunomagnéticas, foi testada a pureza celular por citometria de fluxo segundo o procedimento protocolar. Separadamente, cerca de  $0,5-1 \times 10^6$

de células mononucleares T e B foram diluídas em 100  $\mu$ l de PBS com posterior adição de 5  $\mu$ l do anticorpo monoclonal anti-CD19 e anti-CD3, para os Ly B e T respetivamente, deixando-se em incubação por 10 minutos no escuro. Foi adicionado 2 mL de PBS e realizada a sua centrifugação a 400xg por 5 minutos, com final ressuspensão em 250  $\mu$ l de PBS.

### **3.5. Tratamento celular com pronase**

Apenas para os protocolos *Halifax* e *Halifaster* foi realizado um tratamento celular com pronase após o isolamento de células mononucleares. Os linfócitos obtidos a uma concentração de  $3 \times 10^6$  cél./mL foram incubados a uma temperatura de 37°C em banho-maria durante 15 minutos na presença de 15  $\mu$ l de pronase ([1 U/ $\mu$ l]) (50,53). Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de RPMI com 30% de soro fetal vitelino a 400xg por 5 minutos e logo ressuspensas em 1 mL de HBSS. A contagem e a pureza celular foram determinadas utilizando o contador hematológico *Ac-T diff2* (*Beckman Coulter*).

### **3.6. Protocolos de *Crossmatch***

#### **3.6.1. Citotoxicidade dependente de complemento**

O delineamento da técnica de *crossmatch* por citotoxicidade dependente de complemento foi seguido segundo a tabela 5, analisando as reações para os Ly totais.

Para o teste de CDC foram utilizadas duas placas de Terasaky com óleo mineral, colocando primeiramente 1  $\mu$ l de HBSS nos poços designados do controlo negativo. De seguida, a placa é preenchida com os soros nos alvéolos respetivos nas quantidades de 2  $\mu$ l, 1  $\mu$ l e  $\frac{1}{2}$  diluído com HBSS. Após todos os soros serem colocados com exceção do controlo positivo, distribuiu-se 1  $\mu$ l da suspensão celular com uma concentração de  $3 \times 10^6$  células/mL em todos os poços. Apenas posteriormente à pipetagem das células colocou-se o controlo positivo. Após o preenchimento de toda a placa de *crossmatch*, procedeu-se a uma incubação à temperatura ambiente (TA) por 35 minutos de modo a permitir a formação de possíveis complexos antigénios-anticorpos. Decorrido este tempo, adicionou-se 5  $\mu$ l de complemento de coelho com incubação mínima de 75 minutos. Por fim foi adicionado 1  $\mu$ l de corante, *FluoroQuench*, em todos os poços, aguardando-se 10 minutos no escuro.

A leitura e interpretação das placas foi efetuada num microscópio invertido de fluorescência, sendo que o teste de CDC foi considerado positivo quando se observou mais de 20% de lise celular quando comparado com o controlo negativo.

Tabela 5 – Delineamento da técnica de *crossmatch* por CDC

	A	B	C	D	E	F	Descrição
1	C-	C-	C-	C-	C-	C-	Controlo negativo
2	2	2	1	1	½	½	Soro 1
3	C-	C-	C-	C-	C-	C-	Controlo negativo
4	2	2	1	1	½	½	Soro 2
5	C-	C-	C-	C-	C-	C-	Controlo negativo
6	2	2	1	1	½	½	Soro 3
7	C-	C-	C-	C-	C-	C-	Controlo negativo
8	2	2	1	1	½	½	Soro 4
9	C-	C-	C-	C-	C-	C-	Controlo negativo
10					C+	C+ ½	Controlo positivo

### 3.6.2. *Crossmatch* por citometria de fluxo

Para todos os XM-CF foram utilizados dois controlos negativos (soro AB), um controlo positivo puro (*pool* de soros hiper-imunizados), um controlo positivo diluído 1/30 com PBS, um controlo isótipo (*tritest*) e os soros em estudo. As diferentes técnicas foram executadas pelo método em tubo, sendo previamente preparados e identificados treze tubos para cada *crossmatch*, analisados posteriormente no citómetro de fluxo *BD FACSCalibur™*.

No desempenho do XM-CF, o cálculo da mediana de intensidade de fluorescência é realizado através do uso do *cut-off* determinado pelo MIFM do controlo negativo, considerando um resultado positivo se a diferença dos soros em análise exibir valores superiores a 50 para células T e 80 para células B respetivamente.

#### 3.6.2.1. XM-CF *Standard*

No protocolo *Standard* retiraram-se 100 µl de uma concentração celular de  $3 \times 10^6$  células/mL para cada tubo, sendo os mesmos centrifugados a 400xg por 5 minutos, rejeitando posteriormente o sobrenadante por inversão. De seguida colocou-se 20 µl de cada soro nos respetivos tubos, contabilizando também os controlos, procedendo-se à sua incubação durante 30 minutos à TA, agitando os tubos 2-3 vezes durante esse período de tempo. As células foram lavadas duas vezes com 1 mL de PBS a 400xg por 5 minutos, rejeitando o restante e ressuspensando as mesmas no vórtex. Adicionaram-se anticorpos monoclonais: 20 µl anti-gamaglobulina-FITC, 8 µl anti-CD19-PerCp e 5 µl anti-CD3-PE em todas as amostras com exceção do controlo isótipo, em que apenas é pipetado 5 µl do *Tritest*. Após esta junção, incubou-se por 20 minutos a uma temperatura de 2-8°C ao abrigo da luz. Concluiu-se com uma lavagem com 1 mL de PBS a 400xg por 5 minutos, com posterior rejeição do

sobrenadante por inversão e as células foram ressuspensas em 250 µl de PBS para a sua aquisição e análise no citómetro de fluxo (Tabela 6).

### **3.6.2.2. XM-CF Halifax**

No protocolo *Halifax* retiram-se 100 µl de uma concentração celular de  $3 \times 10^6$  células/mL para cada tubo, sendo os mesmos centrifugados a 400xg por 5 minutos, rejeitando posteriormente o sobrenadante por inversão. De seguida colocou-se 50 µl de cada soro nos respetivos tubos, contabilizando também com os controlos, procedendo-se à sua incubação durante 20 minutos à TA, agitando os tubos 2-3 vezes durante esse período de tempo. As células foram lavadas duas vezes com 750 µl de PBS a 400xg por 3 minutos, rejeitando o restante e ressuspendendo as mesmas no vórtex. Adicionaram-se anticorpos monoclonais: 15 µl anti-gamaglobulina-FITC, 6 µl anti-CD19-PerCp e 4 µl anti-CD3-PE em todas as amostras com exceção do controlo isótipo, em que apenas é pipetado 4 µl do Tritest. Após esta junção, incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Concluiu-se com uma lavagem com 750 µl de PBS a 400xg por 3 minutos, com posterior rejeição do sobrenadante por inversão e as células foram ressuspensas em 250 µl de PBS para a sua aquisição e análise no citómetro de fluxo (Tabela 6).

### **3.6.2.3. XM-CF Halifaster**

Para o protocolo *Halifaster* não foi possível realizar a contagem de linfócitos após o isolamento com as microesferas imunomagnéticas, por isso a preparação da suspensão foi ajustada consoante a contagem celular após o tratamento com pronase. Aproximadamente 35 µl da suspensão celular foram pipetados, sem proceder à sua centrifugação.

De seguida colocou-se 30 µl de cada soro nos respetivos tubos, contabilizando também com os controlos, procedendo-se à sua incubação durante 20 minutos à TA, agitando os tubos 2-3 vezes durante esse período de tempo. As células foram lavadas duas vezes com 500 µl de PBS a 400xg por 3 minutos, rejeitando o restante e ressuspendendo as mesmas no vórtex. Adicionaram-se anticorpos monoclonais: 10 µl anti-gamaglobulina-FITC, 4 µl anti-CD19-PerCp e 2,5 µl anti-CD3-PE em todas as amostras com exceção do controlo isótipo, em que apenas é pipetado 2,5 µl do Tritest. Após esta junção, incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Concluiu-se com uma lavagem com 500 µl de PBS a 400xg por 3 minutos, com posterior rejeição do sobrenadante por inversão e as células foram ressuspensas em 250 µl de PBS para a sua aquisição e análise no citómetro de fluxo (Tabela 6).

**Tabela 6** – Resumo da metodologia dos diferentes métodos de *crossmatch* em análise

	<i>Standard</i>	<i>Halifax</i>	<i>Halifaster</i>
<b>Tipo de isolamento celular</b>	Separação por gradiente de densidade	Separação por gradiente de densidade	Microesferas imunomagnéticas
<b>Tratamento com pronase (µl/min./T°C)</b>	----- --	15/15/37°C em banho-maria	15/15/37°C em banho-maria
<b>Tempo de preparação celular (min.)*</b>	≈30	≈55	≈ 97
<b>Concentração celular (cél./mL)</b>	3 x 10 <sup>6</sup>	3 x 10 <sup>6</sup>	≈10 x 10 <sup>6</sup> *
<b>Suspensão celular (µl)</b>	100 µl	100 µl	≈35 µl ( <i>Pool</i> de LyT e LyB)
<b>Soro (µl)</b>	20 µl	50 µl	30 µl
<b>1º Tempo de incubação (min.)</b>	30	20	20
<b>1ª Lavagem</b>	(1 mL x 400xg x 5 min.) x 2	(0,75 mL x 400xg x 3 min.) x 2	(0,5 mL x 400xg x 3 min.) x 2
<b>Ac monoclonais (anti-gamaglobulina-FITC/anti-CD19-PerCp/anti-CD3-PE/Tritest (µl)</b>	20/8/5/5	15/6/4/4	10/4/2,5/2,5
<b>2º Tempo de incubação no escuro</b>	20 min. a 2-8°C	10 min. à TA	5 min. à TA
<b>2ª Lavagem</b>	1 mL x 400xg x 5 min.	0,75 mL x 400xg x 3 min.	0,5 mL x 400xg x 3 min.
<b>Suspensão final (µl)</b>	250	250	250
<b>Tempo do XM-CF (min.)*</b>	≈70	≈44	≈34
<b>Tempo total do XM-CF (min.)*</b>	≈100	≈99	≈131

Nota: Tempo sem contabilização do procedimento manual

### 3.7. Análise estatística

Para a análise de dados foram utilizadas tabelas de contingência e testes estatísticos como o teste t, teste qui-quadrado e curvas ROC utilizando o *software GraphPad Prism* e *RStudio* de modo a avaliar a sensibilidade e especificidade entre os protocolos de *crossmatch*. O tratamento estatístico considera resultados significativos para um valor *p-value* < 0,05 e um intervalo de confiança de 95%.

## 4. Resultados

### 4.1. Testagem de metodologias

Originalmente, os protocolos de *Halifax* e *Halifaster* foram definidos para serem executados em microplacas, no entanto estas técnicas foram modificadas para serem realizadas pelo método em tubo de modo a ser compatível com o equipamento laboratorial.

Para a testagem das metodologias foram utilizados dois soros pré-transplante hipersensibilizados com anticorpos anti-HLA, um deles designado como ST1 com um PRA (Painel de Reatividade de Anticorpos) de 86% e um segundo soro, ST2 de 4%. Com estas amostras, foi possível realizar o seu cruzamento com seis testes de controlo, avaliando a alteração de algumas variáveis protocolares. Para além disso, testaram-se nomeadamente diferentes quantidades de pronase, analisando a sua eficácia na leitura e interpretação das provas de *crossmatch* (Tabela 7). Em conclusão, efectuou-se um sétimo e oitavo teste, mas desta vez com quatro soros e duas células provenientes do controlo de qualidade externo *UK NEQAS*, realizando uma comparação final entre a metodologia *Standard* e o *Halifax* modificado (Tabela 8).

Tabela 7 – Comparação e análise da testagem de metodologias I

Teste de controlo	Tipagem HLA	Soro teste	Crossmatch		Notas
			Standard	Halifax	
TC1	A*03, *03, *; B*07, *07; C*07, *07; DRB1*09, *15; DQB1*03, *06	ST1	T: Positivo	T: Positivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Halifax</i>: 30 µl de pronase;</li> <li>• Ocorre a marcação de células T no tritest. Com isto conclui-se que está a existir marcação celular incorreta.</li> </ul>
			B: Positivo	B: Positivo	
		ST2	T: Negativo	T: Negativo	
			B: Negativo	B: Negativo	
TC2	A*01, *26; B*45, *57; C*06, *07; DRB1*01, *04; DQB1*05, *08	ST1	T: Positivo	T: Positivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Halifax</i>: 10 µl de pronase;</li> <li>• Amostra com apenas 53,6% de linfócitos, com possível falha de deteção de um XM positivo no ST2 pelo <i>Halifax</i>;</li> <li>• Leitura com pouca remoção de marcações inespecíficas.</li> </ul>
			B: Positivo	B: Positivo	
		ST2	T: Positivo	T: Negativo	
			B: Positivo	B: Negativo	
TC3	A*02, *26; B*38, *44; C*05, *12; DRB1*04, *13; DQB1*06, *07	ST1	T: Positivo	T: Positivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Halifax</i>: 15 µl de pronase;</li> <li>• Melhoria na limpeza do fundo;</li> <li>• Deteção de um XM positivo no ST2, com DSA em valores intermédios.</li> </ul>
			B: Positivo	B: Positivo	
		ST2	T: Negativo	T: Negativo	
			B: Negativo	B: Positivo	

Tabela 7 – Comparação e análise da testagem de metodologias I (continuação)

Teste de controlo	Tipagem HLA	Soro teste	Crossmatch		Notas
			Standard	Halifax	
TC4	A*01, *68; B*08, *14; C*07, *08; DRB1*03, *13	ST1	T: Positivo	T: Positivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Halifax: 15 µl de pronase;</li> <li>Verificou-se que se perdiam muitas células ao fazer todas as lavagens propostas no protocolo original de Halifax. Desta forma, optou-se por reduzir uma lavagem após a marcação com Acs monoclonais.</li> </ul>
			B: Positivo	B: Positivo	
		ST2	T: Negativo	T: Negativo	
			B: Negativo	B: Negativo	
TC5	A*02, *29; B*18, *44; C*02, *16; DRB1*04, *07; DQB1*02, *03	ST1	T: Positivo	(1) T: Positivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dois testes com diferentes quantidades de pronase: (1) 10 µl e (2) 15 µl;</li> <li>Leitura mais clara com a utilização de 15 µl de pronase através da diminuição da reatividade de fundo;</li> <li>A redução de uma lavagem permitiu poucas perdas celulares, melhorando o estudo do XM.</li> </ul>
			B: Positivo	(2) T: Positivo	
			(1) B: Positivo	(2) B: Positivo	
		ST2	T: Negativo	(1) T: Negativo	
			B: Negativo	(2) T: Negativo	
			(1) B: Negativo	(2) B: Negativo	
TC6	A*01, *30; B*08, *62; C*03, *07; DRB1*07, *17; DQB1*02, *02	ST1	T: Positivo	T: Positivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Halifax: 15 µl de pronase;</li> <li>Continuou-se a verificar uma ligeira redução de reatividade inespecífica com a utilização de pronase;</li> <li>Foi realizado ainda um teste em duplicado com a utilização de esferas imunomagnéticas (Halifaster), no qual se observou uma grande redução do nº de células. Ocorreu uma boa marcação de Ly T, mas para os Ly B verificou-se algum arrasto celular.</li> </ul>
			B: Positivo	B: Positivo	
		ST2	T: Negativo	T: Negativo	
			B: Negativo	B: Negativo	

Tabela 8 – Comparação e análise da testagem de metodologias II

Teste de controle	Tipagem HLA	Soro teste	Crossmatch		Notas			
			Standard	Halifax				
TC7	A*02, *69; B*14, *44; C*05, *08; DRB1*04, *13; DQB1*07, *08	SN1	T: Positivo	T: Positivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Halifax: 15 µl de pronase;</li> <li>Resultados idênticos. Apenas se observou uma diminuição da expressão do XM como positivo para as células B pelo método Halifax no cruzamento do TC7 com o SN4;</li> <li>CDC nível 2 com o SN1 e nível 4 para o SN2.</li> </ul>			
			B: Positivo	B: Positivo				
		SN2	T: Positivo	T: Positivo				
			B: Positivo	B: Positivo				
		SN3	T: Negativo	T: Negativo				
			B: Negativo	B: Negativo				
		SN4	T: Negativo	T: Negativo				
			B: Positivo	B: Positivo				
		TC8	A*02, *34; B*13, *14; C*06, *08; DRB1*07, *15; DQB1*02, *06	SN1		T: Negativo	T: Negativo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Halifax: 15 µl de pronase;</li> <li>Provas de crossmatch semelhantes entre o protocolo Standard e Halifax;</li> <li>CDC nível 4 com o SN1 e nível 8 para o SN3.</li> </ul>
						B: Positivo	B: Positivo	
				SN2		T: Negativo	T: Negativo	
						B: Negativo	B: Negativo	
SN3	T: Positivo			T: Positivo				
	B: Positivo			B: Positivo				
SN4	T: Negativo			T: Negativo				
	B: Positivo			B: Positivo				

## 4.2. Efeito da pronase no controlo negativo

Para a realização do XM-CF foram utilizados soros do grupo sanguíneo AB não sensibilizados como controlo negativo e um *pool* de soros hipersensibilizados como controlo positivo. De modo a verificar o efeito da pronase na expressão dos recetores Fc das células T (Gráfico 1 e 2) e B (Gráfico 3 e 4), pretendeu-se comparar e analisar as diferenças provocadas na média de intensidade de fluorescência das medianas (MIFM) entre a sua utilização e não utilização nos soros sem DSA.

### 4.2.1. Análise da expressão dos Linfócitos T

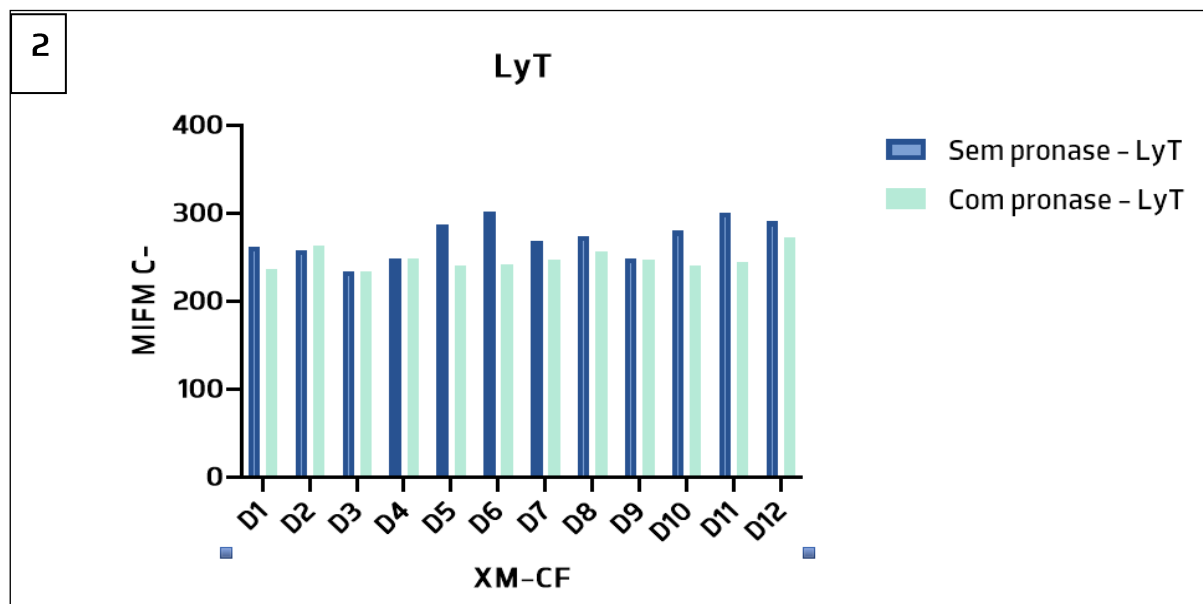
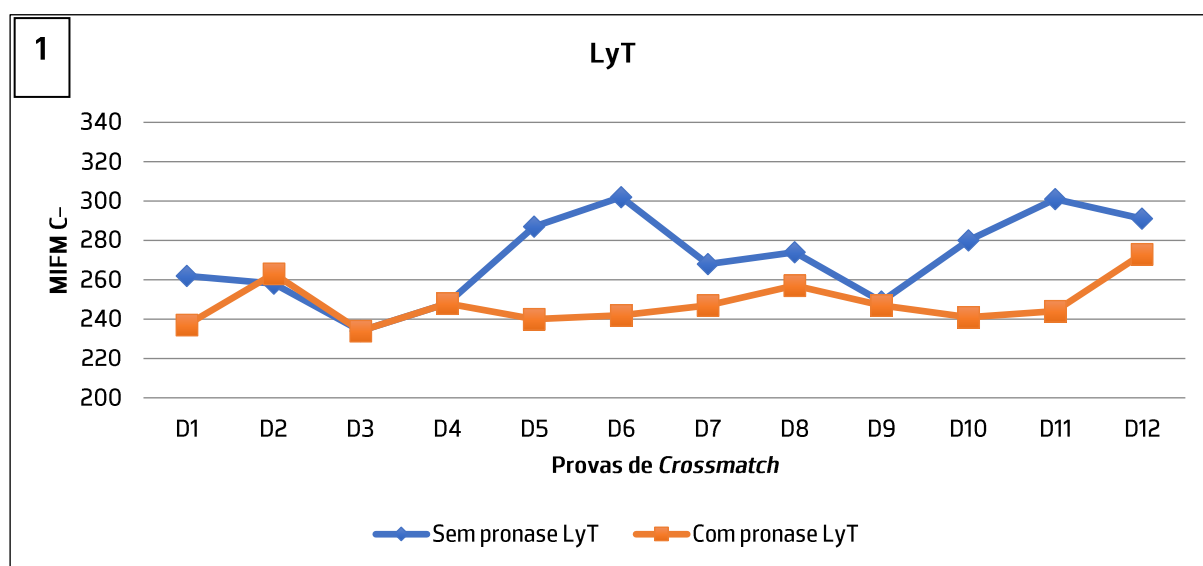


Gráfico 1 e 2 – Variação da MIFM C- entre o protocolo *Standard* (sem pronase) e *Halifax* (com pronase) para os LyT. (1) MIFM C- *Standard*: Mínimo: 234,0; Máximo: 302,0; (2) MIFM C- *Halifax*: Mínimo: 234,0; Máximo: 273,0; (3) Média da diferença da expressão da MIFM no XM-CF nos soros AB com pronase vs sem pronase é de  $-23,42 \pm 7,104$ , equivalente a uma taxa média de variação de aproximadamente de -8,15%.

## 4.2.2. Análise da expressão dos Linfócitos B

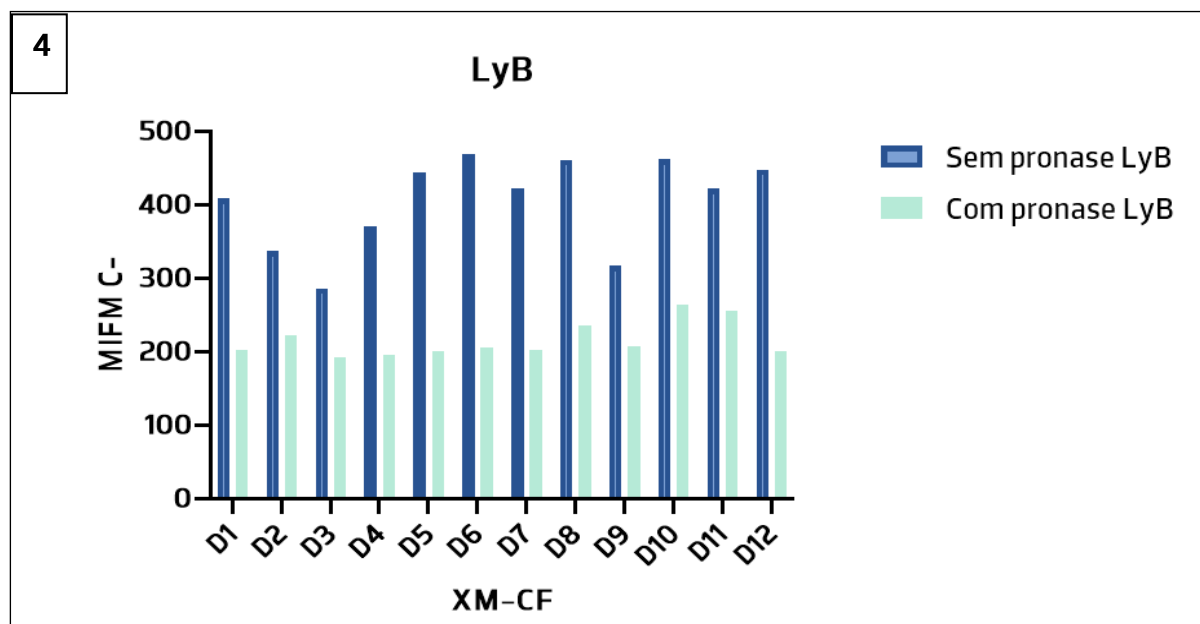
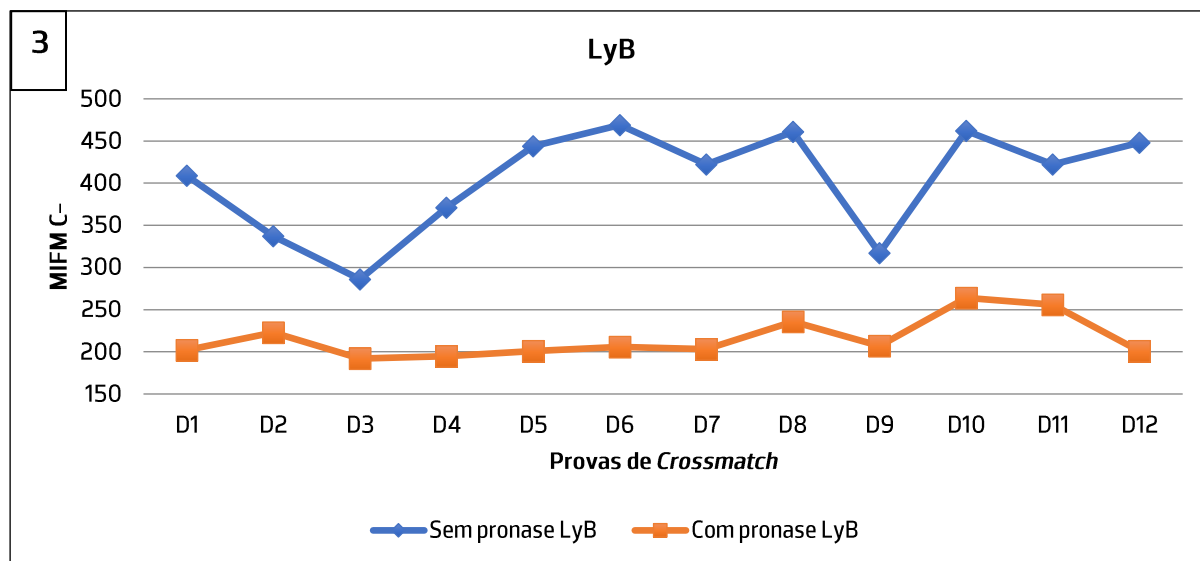
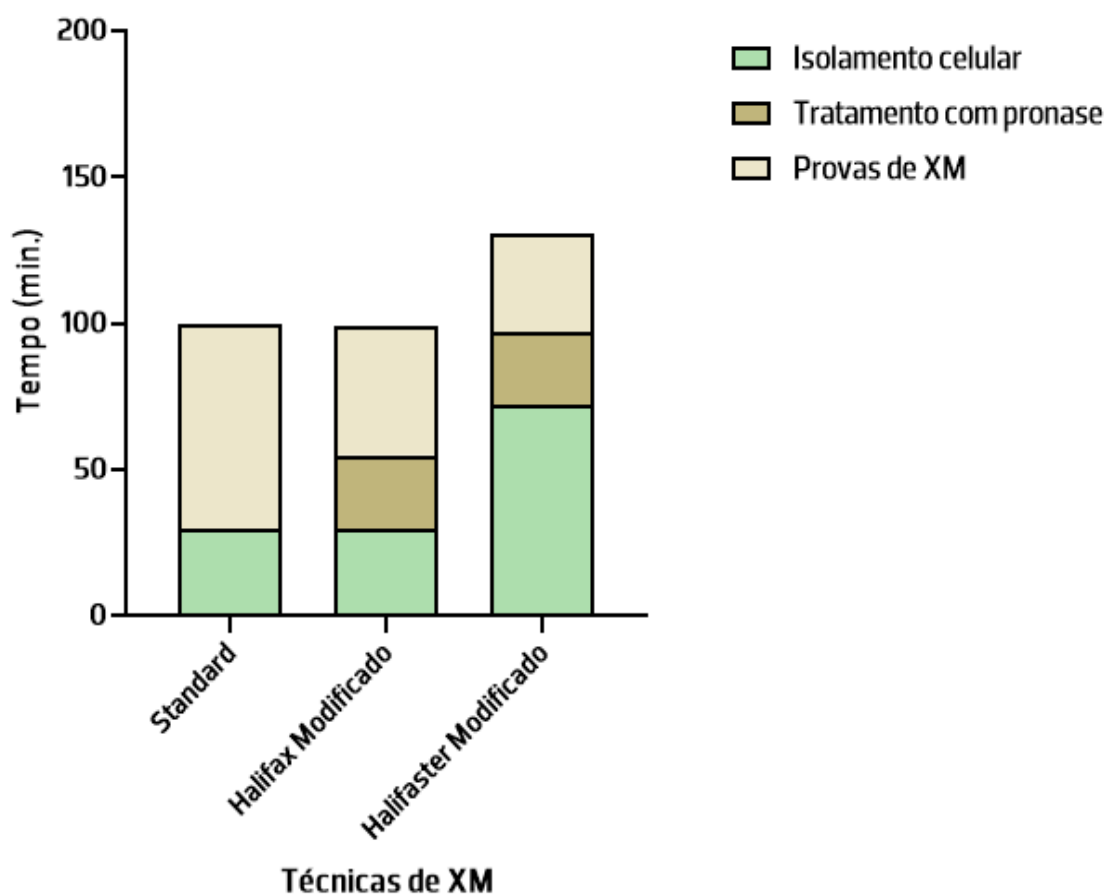


Gráfico 3 e 4 – Variação da MIFM C- entre o protocolo *Standard* (sem pronase) e *Halifax* (com pronase) para os LyB. (1) MIFM C- *Standard*: Mínimo: 286,0; Máximo: 469,0; (2) MIFM C- *Halifax*: Mínimo: 192,0; Máximo: 264,0; (3) Média da diferença da expressão da MIFM no XM-CF nos soros AB com pronase vs sem pronase é de  $-188,5 \pm 19,16$ , equivalente a uma taxa média de variação aproximadamente de  $-45,69\%$ .

### 4.3. Comparação do tempo de XM-CF

Devido à introdução de novas metodologias para a realização de provas de *crossmatch* por citometria de fluxo, é necessário avaliar a duração da preparação das mesmas até a sua análise, visto que se pretende implementar protocolos mais rápidos e eficazes. Desta forma, foram classificadas comparativamente as técnicas *Standard*, *Halifax* e *Halifaster* modificados relativamente ao tempo dispensado na preparação celular, que engloba o isolamento e tratamento dos linfócitos com pronase, como também a própria execução do *crossmatch* (Gráfico 5).



**Gráfico 5** – Comparação do tempo em minutos para a realização das provas de XM-CF dos protocolos *Standard*, *Halifax* e *Halifaster* modificados. A duração total do método *Standard* é similar ao *Halifax* modificado ( $\approx 1\%$ ) porque o acrescento da fase de tratamento dos Ly com pronase equiparou-se ao facto de coexistir uma diminuição considerável na realização do XM. Relativamente ao *Halifaster* modificado, este é significativamente mais longo em comparação às restantes técnicas devido ao tempo excessivo no isolamento celular.

#### 4.4. Descrição dos resultados de *crossmatch* em estudo

No cruzamento de oito soros em estudo contra doze dadores obtiveram-se os seguintes resultados nas provas de *crossmatch* (Tabela 9-20):

Tabela 9 – Resultados dos diferentes protocolos de *crossmatch* para a célula D1

Célula	Soros	DSA anti-HLA		Protocolos de <i>Crossmatch</i>			
		Classe I	Classe II	<i>Standard</i>	<i>Halifax</i>	<i>Halifaster</i>	CDC
D1  A3, 26; B51, 38; DR1, 13; DQ5, 6	S1	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	S2	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	S3	A26; A25; A66	DR13; DQ6; DQ5	T: <b>Positivo</b> B: Positivo	T: <b>Positivo</b> B: Positivo	T: <b>Negativo</b> B: Positivo	Nível 4
	S4	A66	DR52	T: Negativo B: <b>Negativo</b>	T: Negativo B: <b>Negativo</b>	T: Negativo B: <b>Positivo</b>	Nível 1
	S5	0	DR1; DQ6; DQ5	T: Negativo B: <b>Positivo</b>	T: Negativo B: <b>Positivo</b>	T: Negativo B: <b>Negativo</b>	Nível 1
	S6	A34; A66; A3; A25; A26	DQ6	T: <b>Positivo b</b> B: <b>Positivo b</b>	T: <b>Negativo</b> B: <b>Positivo</b>	T: <b>Negativo</b> B: <b>Negativo</b>	Nível 1
	S7	A66; A34	DQ6; DR1; DR14	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	S8	A3	DR14	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1

Legenda: Positivo b – Positivo *borderline*

**Observações:** Resultados semelhantes entre o protocolo *Standard* e *Halifax*, verificando-se uma alteração no cruzamento da célula D1 com o S6. No *Halifax* ocorreu uma diminuição da expressão do XM nas células T, o que era um resultado provável devido à manifestação de um positivo *borderline* no protocolo *Standard*. Por contrapartida houve um aumento bastante significativo na expressão do XM positivo para as células B.

Relativamente ao *Halifaster*, houve não só a presença de falhas na deteção de XM positivos para as células T e B, como também se observou um positivo duvidoso no S4 devido ao baixo valor de MFI dos DSA (A66-1600; DR52-1712), entrando em discrepância com os resultados das restantes provas de *crossmatch*.

Tabela 10 – Resultados dos diferentes protocolos de *crossmatch* para a célula D2

Célula	Soros	DSA anti-HLA		Protocolos de <i>Crossmatch</i>			
		Classe I	Classe II	<i>Standard</i>	<i>Halifax</i>	<i>Halifaster</i>	CDC
D2 A25, 32; B44, 44; DR7, 15; DQ2, 6	S1	0	0	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	S2	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	S3	A26; A25; A66	DQ6; DQ5; DR16; DR51; DR15; DR7; DR15	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Negativo	Nível 4
	S4	A66; B44	DR7; DR16	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	S5	0	DR51; DR15; DQ6; DQ2; DQ5	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	S6	A33; A34; A66; A32; A25; A31; A26; A30	DQ6	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	T: Positivo f B: Negativo	Nível 1
	S7	A33; A66; A34; B44	DR53; DQ2; DQ6; DR7; DR15	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	S8	0	DQ2; DR53	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Negativo	Nível 2

Legenda: Positivo f – Positivo fraco

**Observações:** Existência de um falso positivo no protocolo *Standard* visto que não foi quantificado qualquer tipo de DSA no soro S1. Este resultado já não se observou durante o protocolo *Halifax* e *Halifaster*, suportando a utilização da pronase na possível eliminação de uma interferência celular não HLA.

Os resultados finais das provas cruzadas da célula D2 com os restantes soros foram idênticos entre o método *Standard* e *Halifax*.

No protocolo *Halifaster* continuou-se a observar falhas na deteção de XM positivos nomeadamente nas células B, para além de se verificar um dado inválido no S6.

Tabela 11 – Resultados dos diferentes protocolos de *crossmatch* para a célula D3

Célula	Soros	DSA anti-HLA		Protocolos de <i>Crossmatch</i>			
		Classe I	Classe II	Standard	Halifax	Halifaster	CDC
D3  A25, 32; B44, 44; C3, 16; DR7, 15; DQ2, 6	<b>S1</b>	0	0	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S2</b>	0	0	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S3</b>	A26; A25; A66	DQ6; DQ5; DR16; DR51; DR15; DR7; DR15	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Negativo	Nível 4
	<b>S4</b>	A66; B44	DR7; DR16	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S5</b>	0	DR51; DR15; DQ6; DQ2; DQ5	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S6</b>	A33; A34; A66; A32; A25; A31; A26; A30	DQ6	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	T: Positivo f B: Negativo	Nível 1
	<b>S7</b>	Cw16; A33; A66; A34; B44	DR53; DQ2; DQ6; DR7; DR15	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S8</b>	0	DQ2; DR53	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Negativo	Nível 2

Legenda: Positivo f – Positivo fraco

**Observações:** Os resultados são compatíveis com o que se observou no cruzamento com a célula D2, que apresenta a mesma genotipagem HLA que a célula D3 e no qual existe uma associação familiar.

Na execução do protocolo *Standard* surgiram dois falsos positivos para as células B no XM com os soros S1 e S2, visto que não apresentam anticorpos anti-HLA contra o dador. Estes dados já foram diferentes dos obtidos no *Halifax* e *Halifaster* que se revelam como um XM negativo.

No *Halifaster* obtiveram-se as mesmas falhas que na célula D2.

Tabela 12 – Resultados dos diferentes protocolos de *crossmatch* para a célula D4

Célula	Soros	DSA anti-HLA		Protocolos de <i>Crossmatch</i>		
		Classe I	Classe II	Standard	Halifax	CDC
D4  A2, 33; B14, 55; C1, 8; DR7, 15; DQ2, 6	<b>S1</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S2</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S3</b>	Cw1	DQ6; DQ5; DR16; DR51; DR15; DR7; DR15	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	<b>S4</b>	A68; A2; A69; Cw1	DR16; DR7	T: Positivo B: Positivo	T: Positivo f B: Positivo f	Nível 2
	<b>S5</b>	A2	DR51; DR15; DQ6; DQ2; DQ5	T: Positivo f B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	<b>S6</b>	B56; A68; A33; A69; B55; A32; A2; A31; A30	DQ6	T: Positivo B: Positivo	T: Positivo B: Positivo	Nível 8
	<b>S7</b>	A68; A33; A69; Cw8; B65	DR53; DQ2; DQ6; DR7; DR15	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Positivo f	Nível 1
	<b>S8</b>	A2	DQ2; DR53	T: Positivo B: Negativo	T: Positivo B: Positivo	Nível 1

Legenda: Positivo f – Positivo fraco

**Observações:** Nos diversos XM com a célula D4 verificaram-se algumas discrepâncias. Surgiu uma diminuição na expressão do XM + com o soro S4 pelo método *Halifax* quando comparado com o *Standard*. Os DSA classe I revelaram um nível de MFI considerável enquanto que os acs anti-HLA classe II estão presentes em valores mais baixos. Devido à presença deste conjunto de DSA era expectável que se desse uma reação fortemente positiva como foi verificado pelo método *Standard*. No entanto, no teste por CDC apenas se observou uma pontuação de 2. O S5 apresenta um DSA classe I em valores intermédios de MFI (A2-7650), divergindo entre o resultado de XM positivo fraco para os LyT no protocolo *Standard* e negativo no *Halifax*.

O XM com o S7 revelou-se como um positivo fraco para as células B segundo o procedimento *Halifax* e negativo no *Standard*, apesar de aparentar altos valores de MFI de DSA.

Observou-se ainda um erro técnico no S8 pelo método *Standard*.

Tabela 13 – Resultados dos diferentes protocolos de *crossmatch* para a célula D5

Célula	Soros	DSA anti-HLA		Protocolos de <i>Crossmatch</i>		
		Classe I	Classe II	Standard	Halifax	CDC
<b>D5</b> A23, 29; B72, 58; C2, 7 DR7, 10; DQ9, 5	<b>S1</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S2</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S3</b>	B72	DQ9; DQ5; DR7	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 2
	<b>S4</b>	B57; B58; A29; Cw7; A24	DR7; DQ9; DR10	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S5</b>	0	DQ5; DR10	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	<b>S6</b>	B58; A33; B57; A24; A32; A31; A74; A29; A30	DQ9	T: Positivo B: Positivo	T: Positivo B: Positivo	Nível 2
	<b>S7</b>	Cw7; A33; A29; B58; B57; B72	DR53; DQ9; DR7	T: Negativo B: <b>Negativo</b>	T: Negativo B: <b>Positivo</b>	Nível 1
	<b>S8</b>	B57; B58; A29; Cw2	DQ9; DR53; DR10;	T: <b>Negativo</b> B: <b>Positivo b</b>	T: <b>Positivo f</b> B: <b>Positivo</b>	Nível 1

Legenda: Positivo f – Positivo fraco; Positivo b – Positivo *bordeline*

**Observações:** Novamente com o soro S7, o procedimento *Halifax* indica um XM positivo para as células B do D5, enquanto que surge como negativo no protocolo *Standard*. O MFI dos acs anti-HLA classe II encontram-se em valores bastante elevados (DR53–24886; DQ9–11587; DR7– 3738), por isso era provável que surgir-se algum tipo de reação imunológica.

No XM *Halifax* com o soro S8 ocorreu um aumento notável da expressão tanto para as células T como para B quando comparado com o método *Standard*.

Tabela 14 – Resultados dos diferentes protocolos de *crossmatch* para a célula D6

Célula	Soros	DSA anti-HLA		Protocolos de <i>Crossmatch</i>		
		Classe I	Classe II	Standard	Halifax	CDC
D6 A2,24; B44,58; C3,5 DR4,11; DQ7,8	S1	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	S2	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	S3	0	DQ8; DQ7; DR11; DR12; DR4	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 2
	S4	A68; A2; A69; B57; B58; B44	DQ7; DR52	T: Positivo B: Positivo	T: Positivo B: Positivo	Nível 1
	S5	A2	DQ8	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	S6	B58; A68; A69; B57; A24; A2	DQ8	T: Positivo B: Positivo	T: Positivo B: Positivo	Nível 8
	S7	A68; A69; B58; Cw5; B44; B57	DR53; DQ8; DQ7; DR4; DR12	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	S8	A2; B57; B58	DQ8; DQ7; DR53; DR4	T: <b>Negativo</b> B: Positivo	T: <b>Positivo</b> B: Positivo	Nível 1

**Observações:** Observaram-se resultados idênticos em todas as provas cruzadas anti-linfocitárias pelos dois protocolos.

Era esperado que o *crossmatch* entre o dador D6 e o soro 8 nas células T surgir-se como positivo pelo procedimento *Standard* devido à presença de diversos DSA em valores altos/intermédios de MFI. Este resultado segundo o XM *Halifax* verificou-se bastante positivo.

Tabela 15 – Resultados dos diferentes protocolos de *crossmatch* para a célula D7

Célula	Soros	DSA anti-HLA		Protocolos de <i>Crossmatch</i>		
		Classe I	Classe II	Standard	Halifax	CDC
D7 A11,32; B35,61; C2, 4 DR1,13; DQ5,6	<b>S1</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S2</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S3</b>	0	DR13; DQ6; DQ5	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	<b>S4</b>	A11; A29; Cw4	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S5</b>	A11	DR1; DQ6; DQ5	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	<b>S6</b>	A33; A32; A31; A74; A29; A30	DQ6	T: Negativo B: <b>Negativo</b>	T: Negativo B: <b>Positivo</b>	Nível 1
	<b>S7</b>	B35; A33; A29; Cw4; A11; Cw2	DQ6; DR1; DR14	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S8</b>	A29; Cw2	DR14	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1

**Observações:** Apresentam-se resultados semelhantes entre o protocolo de XM *Standard* e *Halifax* para a célula D7 com os soros em análise.

No cruzamento da célula D7 com o soro S6 existe uma grande variedade de anticorpos anti-HLA contra o dador, quase todos em valores intermédios, e por isso, é justificável a indicação de um XM positivo nas células B segundo o método *Halifax*.

Tabela 16 – Resultados dos diferentes protocolos de *crossmatch* para a célula D8

Célula	Soros	DSA anti-HLA		Protocolos de <i>Crossmatch</i>		
		Classe I	Classe II	Standard	Halifax	CDC
D8 A24,32; B7,65; C7,8 DR4,7; DQ8,9	<b>S1</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S2</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S3</b>	0	DQ8; DQ9; DR7; DR4	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	<b>S4</b>	A29; Cw7; A24	DR7; DQ9	T: Negativo B: Positivo f	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S5</b>	0	DQ9; DQ8	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S6</b>	A33; A24; A32; A31; A74; B7; A29; A30	DQ9; DQ8	T: Positivo B: Positivo b	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	<b>S7</b>	Cw7; A33; A29; Cw8; B65	DR53; DQ8; DQ9; DR4; DR7	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	<b>S8</b>	A29	DQ9; DQ8; DR53; DR4	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1

Legenda: Positivo f – Positivo fraco; Positivo b – Positivo *bordeline*

**Observações:** A discrepância do XM para o soro S4 é possivelmente correspondente aos DSA que se encontram em valores positivos baixos (A29-3126; Cw7-1540; A24-1012; DR7-1774; DQ9-1198). Em relação ao CDC também se observou uma pontuação de nível 1.

A intensidade do XM positivo pelo protocolo *Standard* entre as células T e B no cruzamento com o S6, é um resultado surpreendente porque seria expectável que a reação fosse superior nas células B por expressarem Ag HLA tanto da classe I como classe II.

Tabela 17 – Resultados dos diferentes protocolos de *crossmatch* para a célula D9

Célula	Soros	DSA anti-HLA		Protocolos de <i>Crossmatch</i>		
		Classe I	Classe II	Standard	Halifax	CDC
D9 A2,26; B27,44; C1,5; DR1,13 DQ5,6	<b>S1</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S2</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S3</b>	A26; A25; A66; Cw1	DR13; DQ6; DQ5	T: Positivo B: Positivo	T: Positivo B: Positivo	Nível 1
	<b>S4</b>	A68; A2; A69; A66; B44	0	T: Positivo B: Positivo	T: Negativo b B: Negativo b	Nível 1
	<b>S5</b>	A2	DR1; DQ6; DQ5	T: Positivo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	<b>S6</b>	A68; A69; A34; A66; A25; A2; A26	DQ6	T: Positivo B: Positivo	T: Positivo B: Positivo	Nível 1
	<b>S7</b>	A68; A66; A69; A34; B44	DQ6; DR1; DR14	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S8</b>	A2	DR14	T: Positivo B: Positivo	T: Positivo B: Positivo	Nível 1

Legenda: Negativo b – Negativo *borderline*

**Observações:** Apesar de não existirem DSA classe II no soro S4, intervém um conjunto de anticorpos anti-HLA classe I que é consideravelmente imunogénico. Portanto, houve uma falha no protocolo *Halifax* na deteção deste *crossmatch* como positivo apesar de se revelar como um negativo *borderline*.

O procedimento *Halifax* não revelou um XM positivo para os linfócitos T na presença do anticorpo anti-HLA classe I (A2-7650). O mesmo já se observou em resultados anteriores como nas provas cruzadas do S5 com as células D4 e D6.

Tabela 18 – Resultados dos diferentes protocolos de *crossmatch* para a célula D10

Célula	Soros	DSA anti-HLA		Protocolos de <i>Crossmatch</i>		
		Classe I	Classe II	Standard	Halifax	CDC
D10  A1,26; B45,50; C6; DR 1,4; DQ 5,8	<b>S1</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S2</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S3</b>	A26; A25; A66	DQ8; DQ5; DR4	T: Positivo B: Positivo	T: Positivo B: Positivo	Nível 1
	<b>S4</b>	A66; Cw6	0	T: Positivo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 2
	<b>S5</b>	0	DR1; DQ5; DQ8	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	<b>S6</b>	A34; A66; A25; A26; B49	DQ8	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S7</b>	A66; A34; B44	DQ8; DR53; DR4; DR1	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	<b>S8</b>	0	DQ8; DR53; DR4	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1

**Observações:** No cruzamento com o soro S4 ocorreu um XM + com as células do dador D10 apesar dos baixos valores de MFI dos DSA (A66-1600;Cw6-1081).

No XM *Halifax* com o soro S6 ocorreu a deteção de uma reação positiva que é compatível com a presença de DSA a nível intermédio, ao contrário do método *Standard*.

A falha na deteção de um XM positivo para o S7 pelo método *Standard*, já foi observada semelhantemente nas provas cruzadas com as células D4 e D5. Para além disso, no cruzamento com o soro S8 verificou-se a mesma situação, neste caso para a presença de DSA em valores muito altos. Segundo o protocolo *Halifax*, tanto o S7 e S8 foram detetados como um *crossmatch* positivo nas células B.

Tabela 19 – Resultados dos diferentes protocolos de *crossmatch* para a célula D11

Célula	Soros	DSA anti-HLA		Protocolos de <i>Crossmatch</i>		
		Classe I	Classe II	Standard	Halifax	CDC
D11 A2, 33; B7, 14; C7, 8; DR13, 15; DQ6	<b>S1</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S2</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S3</b>	0	DR13; DQ6; DR16; DR51; DR15	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 4
	<b>S4</b>	A68; A2; A69;	DR16; DR52	T: Positivo B: Positivo	T: Positivo B: Positivo	Nível 1
	<b>S5</b>	A2	DR51; DR15; DQ6	T: <b>Positivo</b> B: Positivo	T: <b>Positivo f</b> B: Positivo	Nível 1
	<b>S6</b>	A68; A69; A32; A31; A74; B7; A29; A30	DQ6	T: Positivo B: Positivo	T: Positivo B: Positivo	Nível 8
	<b>S7</b>	-----				
	<b>S8</b>	A2; A29	DR14	T: Positivo B: <b>Negativo</b>	T: Positivo B: <b>Positivo</b>	Nível 1

Legenda: Positivo f – Positivo fraco

**Observações:** Obtidos resultados idênticos entre o procedimento *Standard* e *Halifax*, analisando-se apenas uma diminuição da expressão do *crossmatch* positivo com o S5 nas células T pelo método *Halifax*.

Verificou-se um erro técnico no S8 pelo método *Standard*, semelhantemente ao XM do D4.

Devido ao baixo volume de soro do S7, já não foi possível continuar a sua testagem nas provas cruzadas.

Tabela 20 – Resultados dos diferentes protocolos de *crossmatch* para a célula D12

Célula	Soros	DSA anti-HLA		Protocolos de <i>Crossmatch</i>		
		Classe I	Classe II	Standard	Halifax	CDC
D12 A11, 68; B35, 51; C4, 15; DR4; DQ8	<b>S1</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S2</b>	0	0	T: Negativo B: Negativo	T: Negativo B: Negativo	Nível 1
	<b>S3</b>	0	DQ8; DR4	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	<b>S4</b>	A68; A2; A69; A11; Cw4	0	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1
	<b>S5</b>	A2, A11	DQ8	T: <b>Positivo</b> B: Positivo	T: <b>Negativo</b> B: Positivo	Nível 1
	<b>S6</b>	A68; A69; A2	DQ8	T: Positivo B: Positivo	T: Positivo B: Positivo	Nível 8
	<b>S7</b>	-----				
	<b>S8</b>	A2; Cw15	DQ8; DR4	T: Negativo B: Positivo	T: Negativo B: Positivo	Nível 1

**Observações:** Resultados idênticos das provas de *crossmatch* entre o procedimento *Standard* e *Halifax*.

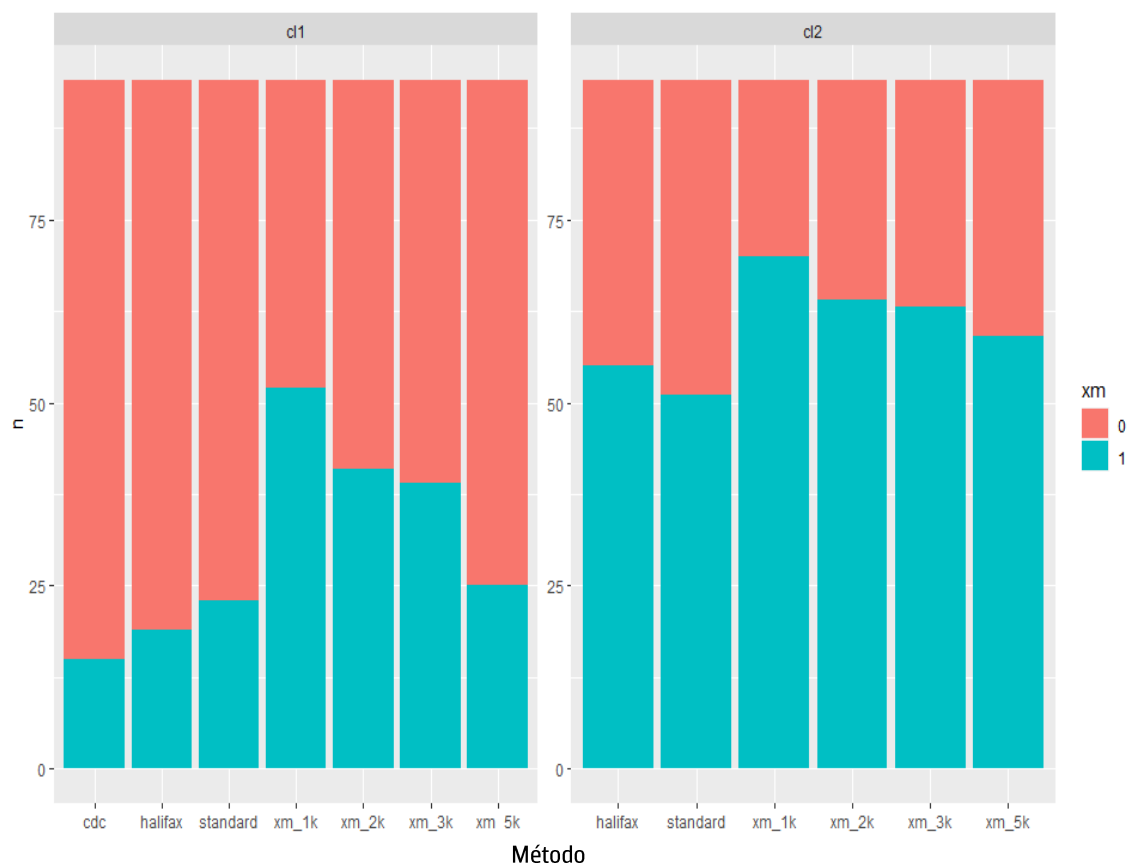
Segundo o método *Halifax*, a expressão média/baixa dos DSA presentes no S5 indica um XM negativo. Esta discrepância foi verificada em situações similares, como no cruzamento do S5 com as células D4, D6, D9 que se revelou como negativo para os mesmos acs e no D11 como positivo fraco.

Devido ao baixo volume de soro do S7, já não foi possível continuar a sua testagem nas provas cruzadas.

#### 4.5. Análise do *crossmatch* virtual versus testes de métodos de *crossmatch*

O mecanismo do *crossmatch* virtual baseia-se na comparação dos anticorpos anti-HLA do recetor contra os antígenos HLA do dador renal, no entanto é altamente dependente da precisão da deteção de Acs pelo ensaio de microesferas. Por analogia, a aplicação desta análise torna-se uma medida útil para uma antevisão de possíveis reações nas provas cruzadas *in vivo*, auxiliando na escolha de um par dador-recetor adequado. O valor preditivo incorpora informações adicionais sobre a presença de incompatibilidades HLA que contribui para a prevenção da deterioração do aloenxerto e/ou desenvolvimento de DSA *de novo* pela análise dos padrões de reatividade.

Desta forma, foi efetuada uma análise comparativa entre o *crossmatch* virtual em diferentes pontos de corte com os métodos *Standard*, *Halifax* e CDC para a classe I e classe II separadamente.

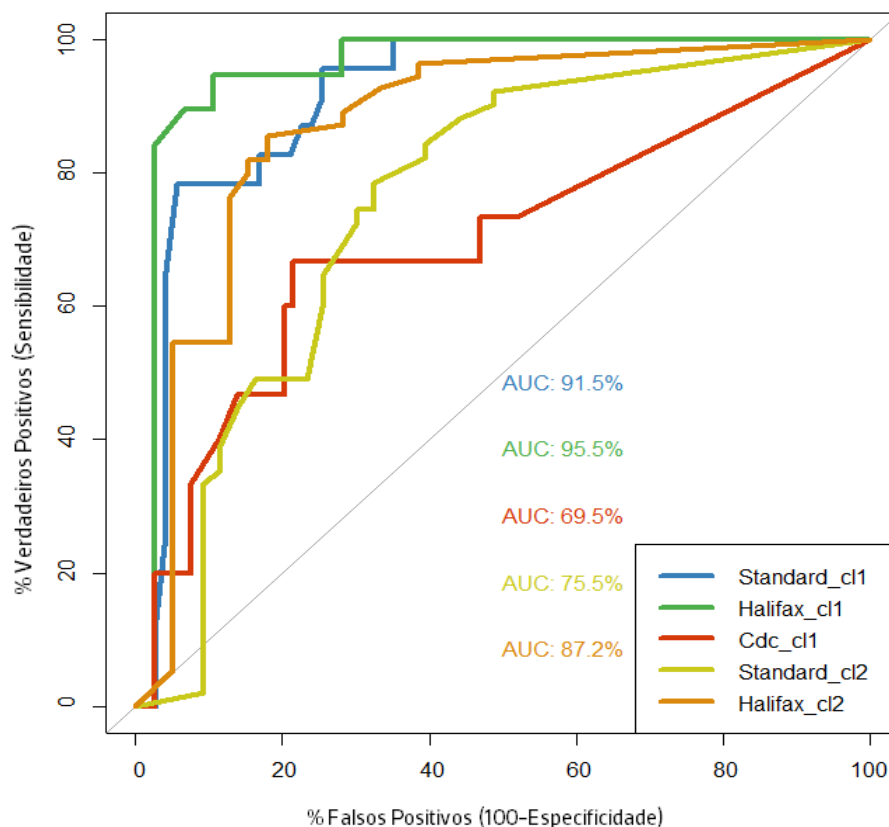


Legenda: cl1 – classe I; cl2 – classe II; xm – *crossmatch*; xm\_k – ponto de corte MFI

**Gráfico 6 – *Crossmatch* virtual versus testes de métodos de *crossmatch*.** A descrição de um Xm “0” significa um resultado negativo, enquanto que o valor “1” indica um XM positivo. O teste de CDC foi efetuado pela utilização de Ly totais e por isso, foi incluído na análise de classe I devido á proporção de células T para B. Relativamente à classe I comprovou-se uma melhoria na deteção de XM positivos pelo método *Standard*, enquanto que para a classe II constatou-se que o protocolo *Halifax* apresentou otimizações na identificação de XM positivos.

#### 4.6. Avaliação da sensibilidade e especificidade entre métodos

As curvas ROC resultam numa representação gráfica que ilustra o desempenho da qualidade de um teste de diagnóstico, compreendendo a razão entre a sensibilidade e especificidade ao longo de um conjunto de pontos de *cut-off*. A execução deste estudo permite a análise da performance técnica através da distinção entre as classes de verdadeiros positivos e falsos positivos, que é proporcional à área sob a curva ROC (Anexo 1 – Tabelas 21 e 22). Mais concretamente, quando maior for a área, maior será a exatidão do teste.



Legenda: AUC – área sob a curva ROC; cl1 – classe I; cl2 – classe II.

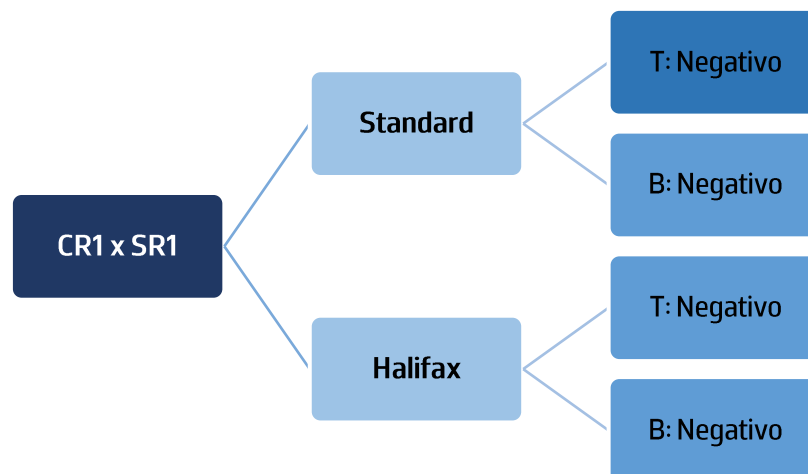
**Gráfico 7** – Análise da curva ROC para a avaliação metodológica. Para avaliar a precisão diagnóstica de um método, é analisada a especificidade e sensibilidade. A especificidade caracteriza a percentagem de falsos positivos, representada no eixo das abcissas e a sensibilidade resulta na percentagem de verdadeiros positivos, que é representada no eixo das ordenadas, podendo variar de 0 a 1 (0-100%). As curvas ROC revelam uma melhoria considerável na exatidão do teste de *crossmatch* pelo método *Halifax* quando comparado com o *Standard* e CDC, nomeadamente para a classe II, com uma diferença de 11,7%. Considerando a classe I, verificou-se um aumento de apenas 4% entre os testes de *crossmatch* por citometria de fluxo.

#### 4.7. Ensaio metodológico em casos reais

Para a análise de uma possível transposição das metodologias para a prática clínico-laboratorial na transplantação renal foram comparados os ensaios, *Standard* e *Halifax* modificado, na pesquisa de compatibilidade linfocitária em dois casos reais.

##### 4.7.1. Caso 1

- CR1:
  - Grupo sanguíneo ABO/Rh: O RhD positivo
  - Tipagem HLA: A\*02, \*03; B\*35, \*49; C\*04, \*07; DRB1\*08, \*08; DQB1\*07, \*07
- SR1:
  - Grupo sanguíneo ABO/Rh: A RhD positivo
  - Alosensibilização anti-HLA: Classe I – Negativo; Classe II – DQ2, DQ8, DQ9



**Figura 9** – Resultado do *crossmatch* anti-linfocitário do caso 1.

Presença de incompatibilidade ABO entre o dador e o recetor e verifica-se um *crossmatch* anti-HLA virtual negativo. Ambos os métodos *Standard* e *Halifax* consolidaram a correspondência de um resultado negativo na avaliação das provas cruzadas anti-linfocitárias.

#### 4.7.2. Caso 2

- CR2:
  - Grupo sanguíneo ABO/Rh: O RhD negativo
  - Tipagem HLA: A\*11, \*68; B\*35, \*51; C\*04, \*15; DRB1\*04, \*04; DQB1\*08, \*08
- SR2:
  - Grupo sanguíneo ABO/Rh: O RhD negativo
  - Alosensibilização anti-HLA: Classe I – B65; Classe II – Negativo
  - SR3: Soro de monitorização trimestral

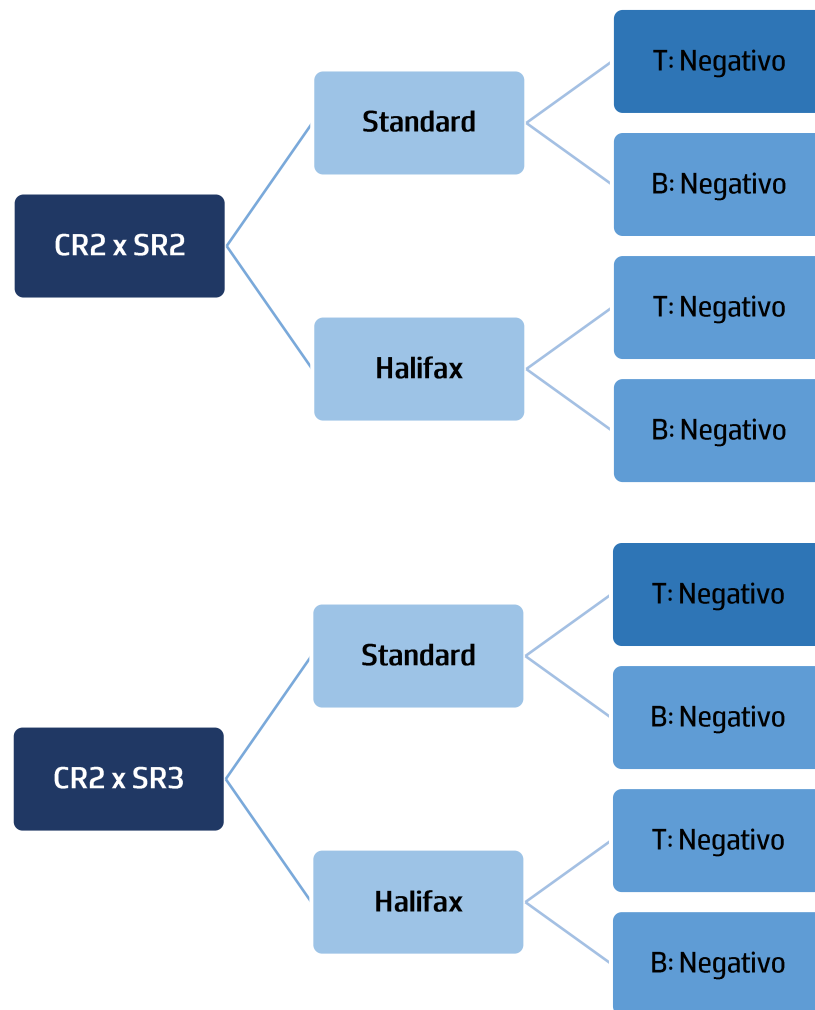


Figura 10 e 11 – Resultado do *crossmatch* anti-linfocitário do caso 2.

Relativamente ao SR2 e SR3 é de salientar que se trata do mesmo dador com uma tratando-se de uma diferença de monitorização trimestral.

O dador e o recetor apresentam compatibilidades a nível do grupo sanguíneo ABO e um *crossmatch* anti-HLA virtual negativo. Os métodos *Standard* e *Halifax* revelaram um resultado de *crossmatch* anti-linfocitário negativo, validando a possível realização de um transplante renal adequado.

## 5. Discussão

A execução de provas de *crossmatch* é um passo fundamental para a preparação de um transplante renal através da determinação de anticorpos linfocitotóxicos direcionados contra os antígenos HLA do dador (3,12,25). A influência negativa da presença de aloanticorpos anti-HLA encontra-se bem estabelecida pela sua associação direta a desfechos como a rejeição de enxertos. O início de respostas imunológicas contra os Ags HLA expressos no endotélio vascular renal resulta na ativação da cascata do sistema de complemento provocando uma série de efeitos destrutivos nos tecidos, constituindo uma contraindicação para avanço de um transplante (15–18).

O desempenho de testes cruzados permite uma avaliação aproximada da compatibilidade entre um determinado par dador–receptor evitando reações adversas contra o aloenxerto, como a rejeição mediada por anticorpos, melhorando as taxas de sucesso na transplantação (15,17,28).

O ensaio de citotoxicidade mediada pelo complemento é considerado um dos primeiros testes padrão para a prevenção da perda do órgão transplantado pela ação de potenciais DSA, no entanto foram verificadas falhas na sensibilidade da metodologia ocasionando a observação de falsos negativos (3,34). De modo a garantir a melhoria na avaliação pré-transplante foram desenvolvidos métodos mais sensíveis e eficazes para a consideração de DSA, com o objetivo de alcançar a aceitação do aloenxerto a longo prazo.

A introdução da prática de XM–CF permitiu a expansão de conhecimentos na área da transplantação de órgãos sólidos por ser uma metodologia mais sensível na análise da presença de anticorpos anti-HLA contra o dador, pelo acréscimo da detecção de Ac em níveis mais baixos e/ou não fixadores de complemento que prejudiquem a viabilidade do transplante (28,31,32,43). Um resultado positivo na realização de uma prova de XM–CF tem como consequência um aumento do risco na perda do aloenxerto por parte dos receptores, enquanto um cruzamento negativo revela uma taxa superior na probabilidade de sobrevivência do transplante renal com um prognóstico favorável (44–46). Embora se experiencie grandes vantagens na utilização desta técnica, têm surgido dúvidas na verdadeira significância clínica de um XM–CF positivo, que pode ser causado pela presença de ligações inespecíficas de anticorpos a receptores Fc, que levam a apresentação de resultados como falsos positivos, principalmente para os linfócitos B, impedindo incorretamente a realização de um transplante (31,41).

A inovação de versões melhoradas do *crossmatch* por citometria de fluxo, como o protocolo *Halifax* e *Halifaster*, permite a implementação de modificações corretivas que visam ultrapassar as desvantagens associadas e melhorar de uma forma mais rápida, a eficácia e eficiência da técnica sem comprometer a sensibilidade e qualidade (50). Mais concretamente, neste estudo experimental foram testadas alterações aos métodos otimizados de *Halifax* e *Halifaster*, adaptando-os ao serviço de transplantação. No entanto, para a execução desta prática laboratorial foram averiguadas algumas limitações como a disposição de um painel celular restrito, não conseguindo reunir todas as especificidades HLA, exclusão

de diversas amostras devido à baixa concentração de linfócitos e quantidade de soro insuficiente para a realização de todas as provas de *crossmatch* em estudo.

Os protocolos originais *Halifax* e *Halifaster* foram desenvolvidos para serem executados em meio de microplaca, contudo foram reformulados para serem realizadas em tubo de modo a ser compatível com o equipamento laboratorial. Para tal, tiveram de ser analisados parâmetros como a concentração celular em uso, aumento da proporção do soro para a suspensão celular, tempos de lavagem e a aplicação de uma temperatura de incubação mais alta em menos tempo. Ainda durante a estipulação da estrutura do procedimento, apurou-se uma perda significativa de células ao realizar todas as lavagens propostas no protocolo original de *Halifax* e por isso, optou-se pela redução para apenas uma lavagem após a marcação com os anticorpos monoclonais, que melhorou o estudo do *crossmatch*.

Uma das principais alterações relativamente ao *Standard* associa-se ao tratamento prévio dos linfócitos com pronase, uma enzima proteolítica caracterizada por atenuar a expressão de recetores Fc na superfície das células T e B e assim, eliminar potencialmente a deteção de anticorpos irrelevantes no decorrer do XM (48,49).

Para a testagem metodológica foram analisadas diferentes quantidades de pronase utilizando 10 µl, 15 µl e 30 µl, avaliando as divergências na determinação de um *crossmatch*. No uso de 30 µl desta enzima proteolítica, verificou-se a marcação de células T no teste tritest, para o qual era presumível a observação isolada de células B. Ao que tudo indica, a aparente aplicação de altas proporções de pronase provoca o aparecimento de marcações inespecíficas, tornando-se um fator negativo para a sua implementação. Relativamente à utilização de quantidades de pronase mais baixas, observou-se não só uma redução na reatividade celular de fundo no decorrer do *crossmatch* como também melhorias na determinação de resultados positivos, notavelmente mais acentuada na utilização de 15 µl. Assim, de acordo com alguns estudos (50,53) e consoante os resultados obtidos na testagem das diferentes porções de pronase, foi determinada que o uso de uma quantidade de 15 µl para uma concentração linfocitária de  $3 \times 10^6$  células/mL é a ideal, não só pela visível redução da reatividade de fundo no XM-CF como também pela correta marcação celular perceptível.

De modo a compreender melhor as consequências da sua utilização, foi avaliado o efeito da pronase nos soros do grupo sanguíneo AB não sensibilizados que funcionam como controlo negativo. Comparando a variação da intensidade de fluorescência das medianas foi estabelecido que a aplicação desta enzima proteolítica reduziu em média cerca de -8% a expressão nos linfócitos T, notando-se especialmente um grande impacto nos linfócitos B devido a uma diferença média entre os cruzamentos de -45,69%. Estes dados suportam o papel positivo da pronase nos resultados do XM-CF como foi descrito por alguns estudos, minimizando a possibilidade de falsos positivos (28,45,48,49). Contrariamente a esta hipótese, outras investigações consideraram que a sua implementação resulta em provas de *crossmatch* falsamente incompatíveis, surgindo a teoria de que a pronase pode causar alterações na conformação de

moléculas na superfície celular que criam maior acessibilidade de ligação, motivando reações não específicas (47,52,53). A marcação inespecífica de células T no teste tritest aquando o uso de uma quantidade de pronase de 30  $\mu$ l vem de acordo com esta teoria, visto que o excesso desta substância pode contribuir para o surgimento de ligações inadequadas.

Ainda no procedimento *Halifaster*, o isolamento linfocitário difere pela adição da separação celular por microesferas imunomagnéticas pelo método de seleção positiva. Após a sua obtenção isolada foi testada a pureza celular por citometria de fluxo, que revelou uma boa marcação de linfócitos T mas difícil delimitação dos linfócitos B pela existência de arrasto celular, tornando-se uma causa provável de erros durante o procedimento de *crossmatch*.

Comparando a duração total da execução de provas cruzadas entre técnicas, é possível afirmar que o protocolo *Standard* equipara-se ao *Halifax* modificado. Apesar da redução em cerca de 60% do tempo do procedimento de *crossmatch* no protocolo *Halifax*, a adição do tratamento celular prévio dos linfócitos vem equilibrar o tempo dispensado para a realização do *crossmatch*. Quanto ao método *Halifaster* modificado, este tornou-se significativamente no método mais demorado em comparação às restantes técnicas devido ao tempo excessivo no isolamento celular.

Durante a testagem no cruzamento de 12 células com os 8 soros em análise, apuraram-se resultados semelhantes entre o protocolo *Standard* e *Halifax*, ao contrário do método *Halifaster*. Apesar de se verificar concordâncias na grande maioria dos estudos de *crossmatch*, constata-se que ocorre uma diminuição da expressão nas células T pelo método *Halifax*, especialmente na presença de resultados *borderline*, quando comparado com o *Standard*. Por contrapartida verifica-se um aumento bastante significativo na expressão de reações cruzadas positivas para as células B, possibilitando a deteção precoce de eventuais reações que resultem na rejeição do aloenxerto. As conclusões observadas são comprovadas pela comparação com as informações preditivas do *crossmatch* virtual, que revelou que existe de facto uma melhoria na deteção de XM positivos pelo método *Standard* para a classe I e o procedimento *Halifax* para a classe II respetivamente.

Relativamente ao procedimento *Halifaster*, determinou-se que devido às constantes discordâncias com as restantes técnicas na falha de deteção de XM positivos, nomeadamente para os linfócitos B, e se tenha verificado também a presença de falsos positivos, decidiu-se não progredir com o avanço da sua análise metodológica após testagem para três células. O defeito deve-se essencialmente ao erro na delimitação das células B pelas microesferas imunomagnéticas por seleção positiva durante o isolamento celular, que impossibilitou a demonstração de reações consistentes.

Para a avaliação final entre metodologias foi efetuada a correlação entre a sensibilidade e especificidade pela utilização de curvas ROC para o método *Standard*, *Halifax* e CDC, permitindo a análise da exatidão e performance técnica. Como era expectável, a prova por CDC com linfócitos totais revela a taxa mais baixa com um valor de 69,5%, comprovando a baixa sensibilidade da técnica relativamente à utilização

da citometria de fluxo para a execução das provas cruzadas. Em seguida, a representação gráfica das curvas ROC apresenta resultados ótimos para o protocolo *Halifax*, em que se obteve uma melhoria considerável na exatidão do teste para ambas as classes, especialmente para a classe II com uma diferença de 11,7% do *Standard*. Estas alterações foram perceptíveis pela detecção de falsos positivos em três provas cruzadas pelo método *Standard*, em que não foi quantificado qualquer tipo de anticorpos anti-HLA contra o dador, os quais já não foram observados durante o protocolo *Halifax* e *Halifaster*, suportando a utilização da pronase na possível eliminação de uma interferência celular.

A possível transposição para a prática clínico-laboratorial do método de *Halifax* proposta foi analisada através da sua comparação com o *Standard* para dois casos reais. Em ambos os estudos ficou consolidada a correspondência de resultados na avaliação das provas cruzadas anti-linfocitárias entre os métodos *Standard* e *Halifax*.

## 6. Conclusão

Neste estudo laboratorial foram observadas melhorias consideráveis na utilização do protocolo *Halifax* em comparação ao *Standard*, não só pela diminuição de interferências inespecíficas minimizando a possibilidade de falsos positivos como também pelo aumento da expressão de reações positivas exatas para as células B. Apesar de não se verificar uma mudança considerável na duração total da execução das provas de *crossmatch* entre estas duas técnicas, é possível notar a potencial significância na obtenção de resultados mais fidedignos para a transplantação renal.

Para a continuação da investigação experimental sugere-se a repetição do protocolo *Halifaster* com o uso de microesferas imunomagnéticas por seleção negativa em sangue total para o seu isolamento. Desta forma, é possível reduzir notavelmente o tempo total da preparação celular como também diminuir a possibilidade de perdas de linfócitos durante a técnica e, conseqüentemente, potenciar os resultados obtidos no *crossmatch*.

## Referências Bibliográficas

1. Direção Europeia da Qualidade dos Medicamentos e Cuidados de Saúde do Concelho da Europa. Guia para a qualidade e segurança dos órgãos para transplantação. Inst Port do Sangue e da Transplantação [Internet]. 2013;(5):329.
2. Peräsari J. The relevance of donor-specific HLA antibodies in renal transplantation [Internet]. 2018.
3. Mulley WR, Kanellis J. Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist. *Nephrology*. 2011;16(2):125–33.
4. DAUSSET J. Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol*. 1983;20(1–4):156–66.
5. Barker CF, Markmann JF. Historical overview of transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(4):1–18.
6. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens*. 2009;74(2):101–16.
7. Tinckam KJ, Chandraker A. Mechanisms and role of HLA and non-HLA alloantibodies. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1(3):404–14.
8. Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13:182–92.
9. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: Conformational plasticity in antigen presentation. *Front Immunol*. 2017;8(MAR):1–16.
10. Goldberg AC arl., Rizzo LV icent. MHC structure and function – antigen presentation. Part 1. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(1):153–6.
11. Li X, Fasano R, Wang E, Yao K-T, Marincola F. HLA Associations with Nasopharyngeal Carcinoma. *Curr Mol Med*. 2009;9(6):751–65.
12. A K, A M, A S, M EK, A H. An Update on Crossmatch Techniques in Transplantation. *J Kidney*. 2017;03(04).
13. Choo SY. The HLA system: Genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. Vol. 48, *Yonsei Medical Journal*. 2007. p. 11–23.
14. Malmstrøm M, Et al. Unraveling the Evolution of the Atlantic Cod's (*Gadus morhua* L.) Alternative Immune Strategy. *PLoS One*. 2013;8(9).
15. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant*. 2003;3(5):665–673.
16. Cai J, Terasaki PI. Humoral theory of transplantation: Mechanism, prevention, and treatment. *Hum Immunol*. 2005;66(4):334–42.
17. Yeung MY. Pre-formed DSA and kidney allograft outcomes. *J Bras Nefrol*. 2020;42(2):136–7.
18. Garces JC, Giusti S, Staffeld-coit C, Bohorquez H, Ari J, Loss GE. Antibody-Mediated Rejection : A Review. 2017;46–55.

19. Santos S, Castro A, Campos A, Pedroso S, Dias L, Henriques C. Kidney transplantation in patients with preformed and exclusively anti-HLA-Cw donor specific antibody. *Port J Nephrol Hypertens.* 2017;31(1):50–3.
20. Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol [Internet].* 2012;8(6):348–57.
21. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-Transplant Assessment of Donor-Reactive, HLA-Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. Risk. *Am J Transplant.* 2003;3(12):1488–500.
22. Zeevi A, Girit A, Duquesnoy R. HLA antibody analysis: Sensitivity, specificity, and clinical significance in solid organ transplantation. *Immunol Res.* 2006;36(1–3):255–64.
23. Gupta A, Iveson V, Varaganam M, Bodger S, Sinnott P, Thuraisingham RC. Pretransplant donor-specific antibodies in cytotoxic negative crossmatch kidney transplants: Are they relevant? *Transplantation.* 2008;85(8):1200–4.
24. Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, Einecke G, Mengel M, Chang J, et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant.* 2009;9(11):2532–41.
25. Bray RA. Lymphocyte crossmatching by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2013;1034:285–96.
26. 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.
27. Sullivan HC, Liwski RS, Bray RA, Gebel HM. The Road to HLA Antibody Evaluation: Do Not Rely on MFI. *Am J Transplant.* 2017;17(6):1455–61.
28. Guillaume N. Improved flow cytometry crossmatching in kidney transplantation. *Hla.* 2018;92(6):375–83.
29. Terasaki, PI; McClelland J. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature.* 1964;204:998.
30. Patel, R; Terasaki P. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. 1969. p. 735–9.
31. Bray RA, Nickerson PW, Kerman RH, Gebel HM. Evolution of HLA antibody detection: Technology emulating biology. *Immunol Res.* 2004;29(1–3):41–53.
32. Callus R, Buttigieg J, Anastasi AA, Halawa A. Basic concepts in kidney transplant immunology. *Br J Hosp Med.* 2017;78(1):32–7.
33. Gautreaux MD. Histocompatibility Testing in the Transplant Setting. *Kidney Transplantation, Bioeng Regen.* 2017;17(Complement-Dependent Cytotoxicity):223–34.
34. Katalinic N, Starcevi A, Mavrincac M, Balen S. Complement-dependent cytotoxicity and Luminex

- technology for human leucocyte antigen antibody detection in kidney transplant candidates exposed to different sensitizing events. *Clin Kidney J.* 2017;10(6):852–8.
35. JOHNSON AH, ROSSEN RD, BUTLER WT. Detection of Alloantibodies Using a Sensitive Antiglobulin Microcytotoxicity Test: Identification of Low Levels of Pre-Formed Antibodies in Accelerated Allograft Rejection. *Tissue Antigens.* 1972;2(4):215–26.
  36. Saito PK, Yamakawa RH, da Silva Pereira LCM, da Silva Junior WV, Borelli SD. Complement-dependent cytotoxicity (CDC) to detect anti-HLA antibodies: Old but gold. *J Clin Lab Anal.* 2014;28(4):275–80.
  37. Tardif, GN; McCalmon RJ. Successful renal transplantation in the presence of donor specific HLA IgM antibodies. *Transplant Proc.* 1995;27(1):664–.
  38. Khodadadi L, Adib M, Pourazar A. Immunoglobulin Class (IgG, IgM) Determination by Dithiothreitol in Sensitized Kidney Transplant Candidates. *Transplant Proc.* 2006;38(9):2813–5.
  39. South AM, Grimm PC. Transplant Immuno-Diagnostics: Cross-Match and Antigen Detection. *Pediatr Nephrol.* 2016;31(6):897–905.
  40. Pollinger HS, Stegall MD, Gloor JM, Moore SB, Degoey SR, Ploeger NA, et al. Kidney transplantation in patients with antibodies against donor HLA class II. *Am J Transplant.* 2007;7(4):857–63.
  41. Thammanichanond D, Athimang W, Paisooksantivatana K, Mongkolsuk T, Ingsathit A, Worawichawong S, et al. Cytotoxic flow cytometric crossmatch in renal transplantation: A single assay to simultaneously detect antibody binding and cytotoxicity. *Transplant Proc [Internet].* 2012;44(1):62–5.
  42. Garovoy et al. Flow cytometry analysis: A high technology cross-match technique facilitating transplantation. 1983;
  43. Karpinski M, Rush D, Jeffery J, Exner M, Regele H, Dancea S, et al. Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(12):2807–14.
  44. Tambur AR, Klein T. Flow cytometry application in organ transplantation. *Isr Med Assoc J.* 2000;2(4):310–5.
  45. Apithy MJ, Desoutter J, Gicquel A, Guiheneuf E, Westeel PF, Lesage A, et al. Pronase treatment improves flow cytometry crossmatching results. *Hla.* 2017;90(3):157–64.
  46. Mahoney RJ, Garovoy et al. The flow cytometric crossmatch and early renal transplant loss. 1990. p. Vol. 49 527–535.
  47. Hart JD, Lutz CT, Jennings CD, May JR, Nelson K, Jacobs S, et al. Falsely incompatible b-cell flow cytometry crossmatch after pronase treatment: A case report. *Transplant Proc [Internet].* 2015;47(3):831–3.

48. Vaidya S, Cooper TY, Avandsalehi J, Barnes T, Brooks K, Hymel P, et al. Improved flow cytometric detection of HLA alloantibodies using pronase: Potential implications in renal transplantation. *Transplantation*. 2001;71(3):422–8.
49. Lobo PI, Spencer CE, Stevenson WC, McCullough C, Pruett TL. The use of pronase-digested human leukocytes to improve specificity of the flow cytometric crossmatch. *Transpl Int*. 1995;8(6):472–80.
50. Liwski RS, Greenshields AL, Conrad DM, Murphey C, Bray RA, Neumann J, et al. Rapid optimized flow cytometric crossmatch (FCXM) assays: The Halifax and Halifaster protocols. *Hum Immunol* [Internet]. 2018;79(1):28–38.
51. Liwski R, Pochinco D, Tinckam K, Gebel H, Campbell P, Nickerson P. EVALUATION OF RAPID OPTIMIZED FLOW CROSSMATCH (ROFCXM) PROTOCOL. *Hum Immunol* [Internet]. 2012;73(2012):26.
52. Backer M, Steward K, Wegner W, Balgansuren G, Chen D-F. Pronase Treatment Interfering with T Cell Crossmatch. *Histocompatibility*. 2012;94(2403):795.
53. Szewczyk K, Barrios K, Magas D, Sieg K, Labuda B, Jendrisak MD, et al. Flow cytometry crossmatch reactivity with pronase-treated T cells induced by non-HLA autoantibodies in human immunodeficiency virus-infected patients. *Hum Immunol* [Internet]. 2016;77(6):449–55.
54. Nakamura T, Ushigome H, Shirouzu T, Yoshimura N. Donor-Specific Anti-HLA Antibodies in Organ Transplantation: Transition from Serum DSA to Intra-Graft DSA. *Hum Leukoc Antigen*. 2019;
55. Lachmann N, Todorova K, Schulze H, Schönemann C. Luminex® and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, and transfusion. *Transfus Med Hemotherapy*. 2013;40(3):182–9.
56. Tait BD. Detection of HLA antibodies in organ transplant recipients – triumphs and challenges of the solid phase bead assay. *Front Immunol*. 2016;7(DEC).
57. Lu Y, Ahmed S, Harari F, Vahter M. Impact of Ficoll density gradient centrifugation on major and trace element concentrations in erythrocytes and blood plasma. *J Trace Elem Med Biol* [Internet]. 2015;29:249–54.

## Anexos

### Anexo 1 – Tabelas de contingência e Coeficiente de correlação de *Pearson*

- *Standard vs Halifax* – Classe I

Tabela 21 – Tabela de contingência *Standard vs Halifax* para a classe I

Método	-	Halifax Classe I	
-	Resultado	0	1
Standard Classe I	0	69	2
	1	6	17

- $t = 11.254$
- $p\text{-value} < 2.2e-16$

- *Standard vs Halifax* – Classe II

Tabela 22 – Tabela de contingência *Standard vs Halifax* para a classe II

Método	-	Halifax Classe I	
-	Resultado	0	1
Standard Classe I	0	35	8
	1	4	47

- $t = 10.671$
- $p\text{-value} < 2.2e-16$