

Exclusão da prova cruzada por citotoxicidade pré-transplante: estamos perdendo algo?

Phasing out the pre-transplant cytotoxicity crossmatch: Are we missing something?

Autores

Jamile Abud^{1,2} 
 Bruna Brasil Dal Pupo¹ 
 Cynthia da Silva³ 
 Elizete Keitel³ 
 Valter Duro Garcia³ 
 Roberto Ceratti Manfro² 
 Jorge Neumann¹ 

¹Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Laboratório de Imunologia de Transplantes, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Centro de Nefrologia e Transplante Renal, Porto Alegre, RS, Brasil.

Data de submissão: 01/03/2020.

Data de aprovação: 07/12/2020.

Manuscrito baseado na tese acadêmica intitulada Caracterização de novas ferramentas diagnósticas em imunologia de transplantes para avaliação de candidatos à transplante renal. Jamile Abud. 2018. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Correspondência para:

Jamile Abud.
 E-mail: jamile.abud.genetica@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2019-0222>

RESUMO

Introdução: O ensaio de prova cruzada por citotoxicidade dependente do complemento antiglobulina humana (AHG-CDCXM - do inglês anti-human globulin-enhanced complement-dependent cytotoxicity crossmatch) tem sido usado para avaliar a presença de anticorpos específicos contra o doador (DSA - do inglês donor-specific antibodies) no soro do receptor antes do transplante renal. O ensaio de prova cruzada por citometria de fluxo (CFXM) foi introduzido pela primeira vez como um teste adicional. O objetivo deste estudo foi validar clinicamente o uso único do ensaio CFXM. **Métodos:** Este estudo comparou os resultados de uma coorte de pacientes de transplante renal que foram submetidos apenas ao CFXM (grupo CFXM) contra uma coorte de pacientes de transplante renal submetidos ao AHG-CD-CXM (grupo controle). **Resultados:** Foram incluídos noventa e sete pacientes no grupo CFXM e 98 controles. Todas as provas cruzadas no grupo controle foram negativas. Um paciente no grupo CFXM teve uma prova cruzada positiva para células B. Um ano após o transplante, não houve diferenças significativas na sobrevida do paciente ($p = 0,591$) e na sobrevida do enxerto ($p = 0,692$) entre os grupos. Também não foi encontrada diferença significativa na incidência de episódios de rejeição aguda celular ($p = 0,289$) segundo critério de Banff $\geq 1A$. No entanto, rejeições agudas mediadas por anticorpos ocorreram em 3 controles ($p = 0,028$). **Conclusão:** Os resultados mostraram que a interrupção do ensaio AHG-CDCXM não modifica os desfechos clínicos em um acompanhamento de 1 ano.

Descritores: Citometria de Fluxo; Testes Imunológicos de Citotoxicidade; Rejeição de Enxerto; Transplantation.

ABSTRACT

Introduction: The anti-human globulin-enhanced complement-dependent cytotoxicity crossmatch (AHG-CDCXM) assay has been used to assess the presence of donor-specific antibodies (DSA) in recipient's serum before kidney transplantation. The flow cytometric crossmatch (FCXM) assay was first introduced as an additional test. The aim of this study was to clinically validate the single use of the FCXM assay. **Methods:** This study compared the outcomes of a cohort of kidney transplant patients that underwent FCXM only (FCXM group) versus a cohort of kidney transplant patients that underwent AHG-CDCXM (control group). **Results:** Ninety-seven patients in the FCXM group and 98 controls were included. All crossmatches in the control group were negative. One patient in the FCXM group had a positive B cell crossmatch. One year after transplantation, there were no significant differences in patient survival ($p = 0.591$) and graft survival ($p = 0.692$) between the groups. Also, no significant difference was found in the incidence of Banff $\geq 1A$ acute cellular rejection episodes ($p = 0.289$). However, acute antibody-mediated rejections occurred in 3 controls ($p = 0.028$). **Conclusion:** The results showed that discontinuing the AHG-CDCXM assay does not modify the clinical outcomes in a 1-year follow-up.

Keywords: Flow Cytometry; Cytotoxicity Tests, Immunologic; Graft Rejection; Transplante.

INTRODUÇÃO

A avaliação de risco imunológico pré-transplante é um elemento chave na seleção clínica de receptores potenciais para um transplante renal de doador falecido. Ferramentas sensíveis e precisas para detecção precoce de anticorpos HLA no soro do receptor, tais como ensaios de fase sólida (EFS), permitem a previsão de resultados de prova cruzada e ajudam a orientar o uso de agentes imunossupressores na presença de anticorpos específicos contra o doador (DSA)¹. No entanto, a prova cruzada de células B e T permanece essencial para a tomada de decisões de transplante na maioria dos centros².

O ensaio de prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDCXM) foi proposto por Terasaki em 1969^{3,4} e tem sido comumente usado para avaliar os anticorpos doador-receptor⁵. Desde então, foram feitas modificações para aumentar sua sensibilidade, como a adição de globulina anti-humana (AHG), já que alguns pacientes não tinham anticorpos detectáveis no CDCXM, mas sofriam de rejeição aguda mediada por anticorpos e perda do enxerto⁶. Foi observado um aumento substancial na sensibilidade da prova cruzada com o uso da citometria de fluxo (CFXM)⁷⁻⁹. O ensaio CFXM não apenas forneceu maior sensibilidade, mas também exigiu menos tempo para ser realizado, levando a uma redução no tempo de isquemia fria (TIF), que é inerente ao transplante de doador falecido e um dos principais preditores da função inicial do enxerto¹⁰. Em 2011, um novo protocolo CFXM foi proposto por Liwski et al¹¹. O chamado protocolo Halifax reduziu ainda mais o tempo total de ensaio, contribuindo assim para uma diminuição significativa do TIF.

Neste contexto, nosso laboratório adotou o protocolo Halifax CFXM como o ensaio único de prova cruzada de pré-transplante em setembro de 2013. O presente estudo avaliou os desfechos clínicos e laboratoriais em pacientes de transplante renal submetidos a uma avaliação de risco imunológico pré-transplante com um único CFXM em comparação com pacientes do período em que o CDCXM foi utilizado. O objetivo foi validar clinicamente o uso único do ensaio CFXM no processo de tomada de decisão para o transplante, e também avaliar se a falta de informações sobre anticorpos fixadores de complemento, a prova cruzada por CDC, poderia ter qualquer impacto negativo em nossos transplantes.

PACIENTES E MÉTODOS

PACIENTES

Este estudo foi realizado no Hospital Santa Casa de Misericórdia em Porto Alegre, no estado do Rio Grande do Sul. Seguimos uma coorte de 100 pacientes com transplante renal, que foram selecionados consecutivamente e avaliados com um único CFXM antes do transplante (grupo CFXM). Da mesma forma, estudamos uma coorte retrospectiva de 100 pacientes com transplante renal que foram avaliados com os ensaios de CDCXM (grupo controle). Cinco pacientes que receberam transplante combinado fígado-rim foram excluídos.

Pacientes adultos e pediátricos que receberam um transplante renal de doadores falecidos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, foram incluídos no estudo. O período de acompanhamento pós-transplante foi de 1 ano.

AValiação de Risco Imunológico

O resultado dos testes de reatividade de anticorpos contra painel (PRA - do inglês panel-reactive antibody) realizados nos soros dos pacientes nos últimos quatro meses antes do transplante foi coletado. Foram realizados ensaios de esferas de antígeno único (SAB - do inglês single-antigen bead) (LABScreen Single Antigen Beads, OneLambda, CA, EUA) em todos os receptores. O protocolo SAB incluiu tratamento térmico dos soros para minimizar reações falso-negativas. Foram usados escores PRA para anticorpos HLA classes I e II, bem como especificidade e média da intensidade de fluorescência (MIF) de anticorpos HLA classes I e II, quando estes estavam presentes. Os testes foram conduzidos de acordo com as instruções do fabricante, e o sistema Luminex 100 e o software Fusion HLA foram usados para analisar os resultados. Os anticorpos foram considerados positivos se a MIF fosse superior a 1.000 e consideramos DSA para HLA-A, -B e DRB1 para todos os pacientes. Em pacientes tipados para HLA-C e HLA-DQB1, esses anticorpos também foram considerados.

A tipagem HLA de doadores (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1) e receptores (HLA-A, -B, -DRB1 em todos e HLA-C e DQB1 em alguns) foi realizada por um conjunto primers de sequência específica (SSP, OneLambda, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O número de incompatibilidades HLA entre doador-receptor foi analisado com base na tipagem HLA para HLA-A, HLA-B e HLA-DRB1.

Os gânglios linfáticos ou o baço do doador foram usados como fontes de células para realizar os ensaios CFXM e CDCXM com os dois últimos soros dos receptores, armazenados a -80°C . As células foram separadas por centrifugação com gradiente de densidade Ficoll-Hypaque. O ensaio CFXM foi conduzido de acordo com o protocolo Halifax. Foi realizado o tratamento de linfócitos com pronase¹², e as células T e B foram avaliadas usando o complexo proteína peridina-clorofila (PERCP - do inglês peridinin-chlorophyll-protein complex) anticorpo anti-CD3 (clone SK7, BD Biosciences) e ficoeritrina (PE) anti-CD19 (clone HIB19, BD Biosciences). Adicionou-se isotiocianato de fluoresceína (FITC) F(ab')₂ Anti-IgH Humano, fragmento Fc específico (Jackson ImmunoResearch Laboratories, EUA). As amostras foram coletadas e analisadas com o citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Biosciences), e as pontuações de corte foram definidas em 40 para as células T e 100 para as células B. As amostras para CDCXM foram tratadas com ditiotreitol, o ensaio de globulina anti-humana (AHG-CDCXM) foi realizado para células T e CDCXM não modificado foi realizado para células B. Os protocolos foram conduzidos de acordo com o protocolo da Sociedade Americana de Histocompatibilidade e Imunogenética (ASHI - do inglês American Society for Histocompatibility and Immunogenetics)¹³ usando um marcador fluorescente para quantificação de células mortas e esferas magnéticas para separação de células T e B.

VARIÁVEIS CLÍNICAS E PREDITIVAS

Foram coletados dados demográficos de doadores e receptores. Os doadores foram classificados como doadores com critérios expandidos (DCE) de acordo com a definição da United Network for Organ Sharing (UNOS). Dados sobre TIF, doenças subjacentes e transplantes anteriores foram coletados dos prontuários médicos eletrônicos dos receptores. No período do estudo, não houve mudanças nos protocolos de imunossupressão do centro de transplante. Todos os pacientes transplantados com DSA negativo foram tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD25 (receptor de interleucina-2). Pacientes com escore de PRA maior que 50%, pacientes com DSA positivo, e pacientes cujos doadores tinham TIF maior que 24 horas foram tratados com globulina antitimócitos (GAT). A terapia de manutenção consistiu em tacrolimus, micofenolato e prednisona.

DESFECHOS CLÍNICOS

A relação proteína/creatinina (RPC) e a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) foram avaliadas aos 3, 6, e 12 meses após o transplante. A TFGe foi calculada pela equação do Estudo sobre a Modificação de Dieta em Doença Renal (MDRD - do inglês Modification of Diet in Renal Disease)^{14,15} em pacientes adultos, e pela equação de Schwartz em pacientes menores de 18 anos¹⁶. Em pacientes que foram submetidos ao teste de SAB pós-transplante, foi determinada a presença de DSA *de novo*. A função retardada do enxerto (FRE) foi definida como a necessidade de diálise até o sétimo dia após o transplante, e o tempo da FRE foi medido. As rejeições foram categorizadas com base na interpretação do patologista de transplante de acordo com a classificação de Banff 2007¹⁷. A rejeição aguda mediada por anticorpos (RAMA) foi avaliada de acordo com a classificação de Banff 2013¹⁸. A perda do enxerto foi definida como a necessidade de retomar a diálise, e as causas da perda do enxerto foram coletadas dos registros médicos. As mortes e suas causas foram coletadas de registros médicos e revistas por um médico da equipe de transplante renal.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se os programas StatCalc e SPSS, versão 20, para as análises estatísticas. As variáveis categóricas foram expressas como frequências absolutas (número de pacientes) e frequências relativas (porcentagem). Os dados paramétricos foram comparados usando o teste t de Student, enquanto os dados não paramétricos foram comparados usando o teste U de Mann-Whitney. As variáveis categóricas foram comparadas usando o teste Qui-quadrado. A análise de sobrevida de Kaplan-Meier foi utilizada para pacientes e enxertos. As análises multivariadas não foram feitas. Para fins estatísticos, foi estabelecido um nível de significância abaixo de 0,05. A lista de verificação da iniciativa denominada Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) foi utilizada para orientar o estudo.

ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Santa Casa de Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul, sul do Brasil, sob o protocolo de número 41095914.1.0000.5335.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DO DOADOR E DO RECEPTOR NO MOMENTO DO TRANSPLANTE

Avaliamos 100 pacientes no grupo CFXM, porém 3 foram excluídos (transplantes renais realizados entre Outubro de 2013 e Outubro de 2014) e 100 pacientes no grupo controle (transplantes renais realizados entre Outubro de 2012 e Setembro de 2013). Cinco pacientes foram excluídos devido a transplantes combinados fígado-rim. Os dados demográficos e clínicos pré-transplante dos grupos são mostrados na Tabela 1.

Todos os doadores falecidos tiveram morte cerebral. Havia 116 doadores homens no total, incluindo 46 no grupo CFXM (47,4%) e 70 no grupo controle (71,4%) ($p < 0,001$). A idade média do doador foi de $41 \pm 18,8$ anos no grupo CFXM e $40 \pm 21,4$ anos no grupo controle ($p = 0,124$). Trinta e oito doadores no grupo CFXM (40%) e 39 controles (39,8%) foram classificados como DCE, sem diferença significativa entre os grupos ($p = 0,977$). O TIF não diferiu entre os grupos (grupo CFXM: $20,4 \pm 5,5$ horas; grupo controle: $20,3 \pm 4,9$ horas; $p = 0,342$). As tipagens HLA-A, -B, e -DRB1 estavam disponíveis para todos os doadores, enquanto as HLA-C e -DQB1

TABELA 1 CARACTERÍSTICAS BASAIS DOS TRANSPLANTES RENAIIS NOS GRUPOS ESTUDADOS

Variáveis	Número total de pacientes	Grupo CFXM (n=97)	Grupo controle (n=98)	p
Doadores	195			
Homens – n (%)		46 (47,4)	70 (71,4)	<0,001
Mulheres – n (%)		51 (52,6)	28 (28,6)	
Idade - anos; média (DP)	195	41 (18,8)	40 (21,4)	0,124
Incompatibilidade HLA- A, HLA-B, HLA-DR- média (DP)	195	4 (1,2)	4 (1,2)	0,542
Receptores				
Homens – n (%)	195	60 (61,9)	52 (53,1)	0,273
Mulheres – n (%)		37 (38,1)	46 (46,9)	
Idade no transplante - anos; média (DP)	195	44 (18,3)	45 (19,7)	0,653
Doença renal primária – n (%)	195			0,09
Desconhecido		46 (47,4)	35 (35,7)	
Hipertensão		10 (10,3)	26 (26,5)	
Diabetes		15 (15,5)	15 (15,3)	
Doença renal policística		9 (9,3)	5 (5,1)	
Outros		17 (17,5)	17 (17,3)	
Número de transplantes renais – n (%)	195			0,833
Primeiro		80 (82,5)	79 (80,7)	
Segundo ou terceiro		17 (17,5)	19 (19,3)	
DSA Classe I – n (%)	195			0,803
Ausente		83 (85,6)	83 (84,7)	
1		9 (9,3)	12 (12,2)	
2		4 (4,1)	3 (3,1)	
3		1 (1,0)	-	
DSA Classe II – n (%)	195			0,277
Ausente		84 (86,6)	92 (93,9)	
1		9 (9,3)	5 (5,1)	
2		3 (3,1)	1 (1,0)	
3		1 (1,0)	-	
Soma - MIF DSA - mediana (IIQ)				
Classe I (grupo CFXM n=14; grupo controle n=15)	29	2.342 (1.203-3.408)	2.669 (1.794-3.845)	0,270
Classe II (grupo CFXM n=13; grupo controle n=06)	19	3.359 (1.462-8.436)	1.838 (1.212-6.553)	0,467
DCE - n (%)	77	38 (40%)	39(39,8)	0,977
TIF – tempo em horas; média (DP)	185	20,4 (5,5)	20,3 (4,9)	0,342

foram tipadas em 60,5% (n = 118) e 63,5% (n = 124) dos doadores, respectivamente. Nenhum doador foi genotipado para HLA-DPB1.

Não houve diferenças significativas entre os escores médios de PRA para anticorpos anti-HLA classe I (grupo CFXM: 21,0%±31,0; grupo controle: 17,2%±29,3; p = 0,427) e anticorpos anti-HLA classe II (grupo CFXM: 13,9%±22,6; grupo controle: 15,1%±24,4; p = 0,315). DSA, tanto classe I quanto II, estavam ausentes em 86% dos pacientes antes do transplante. Os escores de PRA pré-transplante são mostrados na Tabela 1. O número médio de incompatibilidades para os loci HLA-A, -B, e -DRB1 foi de 4 ±1 (p = 0,542) em ambos os grupos.

DESFECHOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS

Cento e quinze receptores (59%) apresentaram FRE, sem diferença significativa entre os grupos (Tabela 2). A TFG estimada e a excreção de proteína urinária (proteína total/creatinina em uma amostra de urina) foram avaliadas aos 3, 6 e 12 meses após o transplante. As RPCs urinárias estavam disponíveis em 128 pacientes aos 3 e 6 meses pós-transplante e em 127 pacientes, 12 meses pós-transplante. A análise da TFGe foi feita separadamente para pacientes com menos de 18 anos e pacientes com 18 anos ou mais. Não foram observadas diferenças na TFGe ao longo do tempo no grupo de receptores com menos de 18 anos de idade. Em receptores adultos, foi observada uma TFGe significativamente mais alta no grupo CFXM, 12 meses após o transplante (Tabela 2).

Todas as provas cruzadas de células T e B foram negativas no grupo controle. No grupo CFXM, um paciente apresentou uma CFXM de célula B positiva com uma alteração de 193 canais. O achado positivo foi atribuído a um DSA anti-HLA-DQ6. O receptor foi submetido a um transplante renal anterior, teve rejeição aguda celular Banff tipo IB, e manteve um enxerto funcional no final do período de acompanhamento.

Dezesseis pacientes do grupo CFXM foram submetidos a um teste SAB clinicamente indicado em um tempo médio pós-transplante de 82,0±22,9 dias, enquanto 18 controles foram submetidos ao mesmo teste em um tempo médio pós-transplante de 87,0±19,5 dias (p = 0,852). No grupo CFXM, 4 pacientes tinham DSA classe I e 3 tinham DSA classe II, enquanto no grupo controle, 7 pacientes tinham DSA classe I e 4 tinham DSA classe II (Tabela 3).

ANÁLISE DE SOBREVIDA

Um ano após o transplante, não houve diferenças significativas na sobrevida do paciente (grupo CFXM: 92,8%; grupo controle: 90,8%; p = 0,591) e na sobrevida do enxerto (grupo CFXM: 84,5%; grupo controle: 82,7%; p = 0,692) (Figuras 1 e 2). Dezesseis pacientes foram a óbito no período de acompanhamento, 7 no grupo CFXM e 9 no grupo controle (p = 0,811), a maioria deles (n = 11) devido a infecções. Houve 15 (15,5%) perdas de enxerto no grupo CFXM e 17 (17,3%) no grupo controle, sem diferença significativa entre os grupos (p = 0,872). Duas falhas ocorreram devido à rejeição mediada por anticorpos no grupo controle, enquanto não houve perda de enxerto devido a causas imunológicas no grupo CFXM.

TABELA 2 DESFECHOS DA FUNÇÃO DO ENXERTO

Variáveis	Número de pacientes avaliados	Grupo CFXM	Grupo controle	p
FRE – n (%)	195	59 (60,8)	56 (57,7)	0,770
FRE, dias - média (DP)		5,5 (4,0)	4,58 (3,5)	0,280
RPC, mediana (IIQ)				
3 meses	128	0,30 (0,2-0,5)	0,37 (0,2-0,5)	0,120
6 meses	128	0,28 (0,2-0,5)	0,36 (0,2-0,7)	0,240
12 meses	127	0,23 (0,2-0,5)	0,33 (0,2-0,6)	0,150
TFGe < 18 anos (mL/min/1,73m ²), mediana (IIQ)				
3 meses	21	65 (53-72)	70 (65-75)	0,223
6 meses	21	65 (57-68)	65 (60-75)	0,605
12 meses	20	81 (54-103)	65 (55-71)	0,412
TFGe > 18 anos (mL/min/1,73m ²), mediana (IIQ)				
3 meses	157	38,0 (29,5-49,0)	37,5 (17,0-51,0)	0,267
6 meses	146	43,5 (29,0-54,3)	40,0 (15,0-50,8)	0,090
12 meses	128	46,0 (33,0-57,0)	39,0 (22,5-49,0)	0,009

FRE: função retardada do enxerto; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; CFXM: prova cruzada por citometria de fluxo; RPC: relação proteína/creatinina.

TABELA 3 PRESENÇA DE DSA APÓS O TRANSPLANTE

DSA	Grupo CFXM (n = 16)	Grupo controle (n = 18)	p
Classe I – n (%)			0,558
Ausente	12 (75)	10 (55,6)	
1	2 (12,5)	3 (16,7)	
2	1 (6,3)	1 (5,6)	
3	1 (6,3)	4 (22,2)	
Classe II – n (%)			0,942
Ausente	13 (81,3)	14 (77,8)	
1	2 (12,5)	3 (16,7)	
2	1 (6,3)	1 (5,6)	
DSA de novo – n (%)	5 (5,2)	8 (8,2)	0,400

DSA: anticorpos específicos contra o doador; CFXM: prova cruzada por citometria de fluxo.

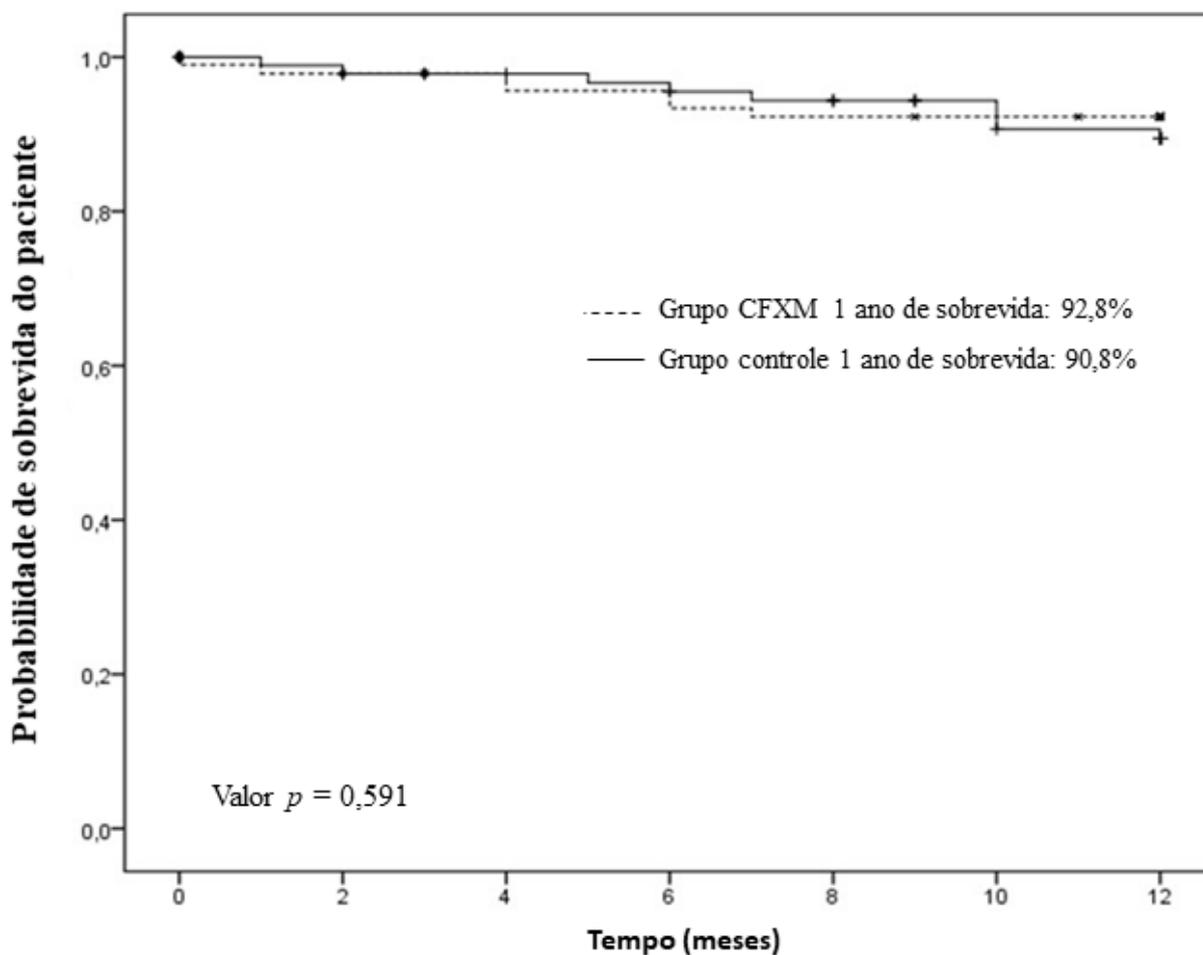


Figura 1. Probabilidade de sobrevivência do paciente.

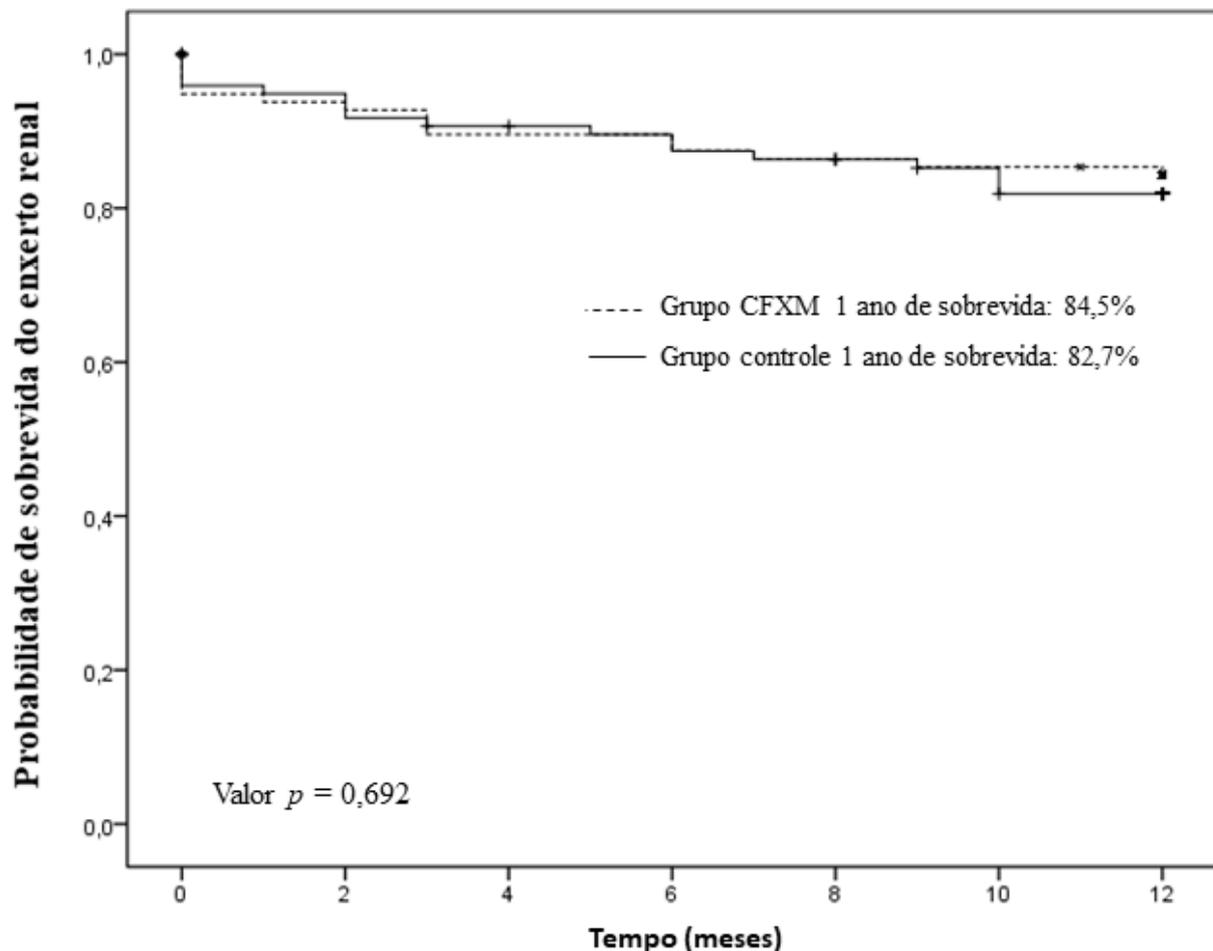


Figura 2. Probabilidade de sobrevivência do enxerto.

DADOS DA BIÓPSIA DO ENXERTO

Sessenta e três (48%) pacientes no grupo CFXM e 68 (52%) controles foram submetidos a uma biópsia de enxerto renal. Como mostrado na Tabela 4, nenhuma diferença significativa foi encontrada na incidência de rejeição aguda celular igual ou maior que 1A [16] ($p = 0,289$). No entanto, RAMA ocorreu em 3 pacientes no grupo controle e nenhuma no grupo CFXM ($p = 0,04$). Nos 3 pacientes com RAMA, nenhum teve DSA pré-transplante, todos receberam enxertos de doadores considerados DCE, tiveram FRE e formaram DSAs *de novo*, dois perderam o enxerto, e nenhum veio à óbito. Depósitos de C4d ao longo dos capilares peritubulares estavam ausentes em 47 (85,5%) e 30 (49,2%) pacientes no grupo CFXM e no grupo controle, respectivamente. Qualquer nível de intensidade de C4d foi detectado em 8 (14,5%) e 31 (50,8%) pacientes no grupo CFXM e no grupo controle, respectivamente ($p < 0,001$).

DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos a CFXM como o único ensaio de prova cruzada em pacientes submetidos a um transplante renal de doador falecido. Não foram encontradas diferenças significativas nos principais desfechos clínicos do grupo submetido apenas à CFXM em comparação com o grupo submetido à AHG-CDCXM (controles).

Não houve diferenças estatisticamente significativas na incidência da FRE e da RPC urinária um ano após o transplante. A TFGe foi mais alta no grupo CFXM do que no grupo controle. Entre aqueles receptores que foram submetidos ao teste SAB clinicamente indicado, a maioria dos pacientes de ambos os grupos não desenvolveu DSA um ano após o transplante. É importante ressaltar que a sobrevivência de pacientes e enxertos não foi significativamente diferente entre os grupos. A incidência de rejeição aguda celular não foi diferente entre os grupos. Entretanto, três casos

TABELA 4 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS NA BIÓPSIA DO ENXERTO

Resultados do teste de patologia – n (%)	Grupo CFXM (n = 63)	Grupo controle (n = 68)	p
Sem rejeição	16 (25,4)	20 (29,4)	0,750
Rejeição limítrofe	10 (15,9)	13 (19,1)	0,638
Rejeição aguda celular \geq 1A	27 (42,9)	21 (30,8)	0,293
Rejeição aguda mediada por anticorpos	-	3 (4,5)	0,028
Fibrose intersticial e atrofia tubular	1 (1,6)	5 (7,4)	0,246
Outros achados	9 (14,3)	6 (8,8)	0,667

CFXM: prova cruzada por citometria de fluxo.

de RAMA foram observados no grupo controle em comparação com nenhum caso no grupo CFXM.

Os grupos estudados foram homogêneos em termos de preditores de risco (idade do doador, doença subjacente, TIF, número de incompatibilidades de HLA, escore PRA pré-transplante e triagem DSA), o que contribuiu para reduzir os vieses nas análises. A fim de reduzir a variabilidade na qualidade dos órgãos, não foram incluídos os transplantes de órgãos provenientes de outros estados brasileiros. Em ambos os grupos, a presença de DSA foi avaliada por meio do ensaio SAB antes do transplante.

Em um estudo de 2008 com 354 pacientes de transplante renal, Ho et al.¹⁹ avaliaram a sensibilidade e a especificidade dos ensaios CDCXM, CFXM e EFS, utilizando a perda do enxerto como o desfecho principal. Estes três testes foram realizados em todos os pacientes para avaliar a presença de DSA. Não houve diferença significativa na sobrevida do enxerto entre estes métodos em um acompanhamento de 3 anos tanto para pacientes de primeiro transplante quanto para pacientes de retransplante. Os autores relataram a importância dos ensaios CDCXM e CFXM de acordo com a sensibilidade de cada método. Seus resultados são consistentes com nossos achados, embora os dois estudos tenham sido concebidos de forma diferente, já que o ensaio CFXM foi utilizado como o método único de prova cruzada em nosso estudo. Em consonância com nossos achados, um antigo estudo retrospectivo dos EUA examinou a sobrevida e os desfechos clínicos em 624 pacientes de transplante renal, a maioria de doadores falecidos, testado apenas com o ensaio CFXM e dividido em três grupos (CFXM T⁻ B⁻, CFXM T⁻ B⁺, e CFXM T⁺ B⁺), e relatou uma sobrevida de 90% do enxerto de um ano no grupo CFXM T⁻ B⁻.²⁰⁻²²

Ao contrário do ensaio AHG-CDCXM, o ensaio CFXM estratifica o risco e pode não necessariamente contraindicar o transplante quando o resultado for positivo. Graff et al. (2009) estudaram

retrospectivamente as implicações dos desfechos de resultados positivos da CFXM, utilizando dados de uma coorte nacional de receptores de transplante inscritos nos dados de registro da Rede de Regulação e Transplante de Órgãos. Eles observaram um efeito prejudicial contínuo de um resultado positivo da CFXM após o primeiro ano de transplante²³. Tivemos um receptor transplantado após CFXM B⁺ no grupo controle e o mesmo ficou livre de diálise três anos depois do transplante.

Nosso laboratório costumava realizar ambos os ensaios AHG-CDCXM e CFXM pelo protocolo padrão ASHI. O protocolo Halifax nos encorajou a adotar os ensaios CFXM como a única avaliação de prova cruzada. Esta estratégia permitiu uma redução no tempo necessário para a realização do teste. Da mesma forma, de Moraes et al.²⁴ concluíram em seu estudo que o uso exclusivo da CFXM como um teste celular para avaliação pré-transplante de anticorpos anti-doador é viável dada a segurança em termos de predição de resultados negativos de CDC e pela avaliação do risco de um DSA pré-formado. Entretanto, contrário à nossa expectativa, o TIF não diminuiu. Isto pode ser explicado pelo fato de que o processo de doação de órgãos envolve múltiplas equipes e fatores que são independentes do ensaio de prova cruzada.

Este estudo teve algumas limitações. Primeiro, foi um estudo de um único centro, não randomizado, com um grupo controle retrospectivo. Acreditamos que esta limitação não teve impacto nos resultados, pois a prática médica geral, incluindo os regimes imunossupressores, foi essencialmente a mesma durante todo o período de estudo. Em segundo lugar, os resultados de DSA pós-transplante não estavam disponíveis para todos os receptores, e os loci HLA-C e DQB1 não foram tipados para todos os receptores. No entanto, o número de receptores com testes SAB pós-transplante foi semelhante entre os grupos sugerindo uma necessidade clínica semelhante para tais testes na prática clínica. Por fim,

não realizamos uma análise formal de custo-benefício, comparando as duas técnicas.

CONCLUSÕES

A sensibilidade dos métodos usados para detectar anticorpos HLA classes I e II tem aumentado constantemente como resultado dos avanços em testes tais como os ensaios CFXM e EFS. O objetivo principal do presente estudo foi demonstrar que a interrupção do uso do ensaio AHG-CDCXM não modifica o desfecho clínico dos transplantes renais. Uma avaliação combinada usando o teste SAB e o ensaio CFXM deve ser realizada para avaliar os riscos e ajudar no processo de tomada de decisão¹. Apesar de a sensibilidade mais elevada da CFXM ser bem reconhecida, este método é raramente utilizado sozinho fora da América do Norte. Portanto, acreditamos que validar sua aplicação clínica relatando nossa experiência poderia ser uma contribuição para o campo. Também importante, o ensaio CFXM está longe de ser padronizado. Apenas recentemente um protocolo padrão proposto, o protocolo Halifax, foi publicado¹². Finalmente, é importante que os centros validem seus próprios resultados da CFXM com respeito a riscos clínicos aceitáveis¹.

Estamos confiantes de que os resultados aqui descritos apoiam fortemente a segurança do uso da CFXM Halifax como o único teste de prova cruzada pré-transplante. É importante ressaltar que a falta de informações sobre anticorpos fixadores de complementos, como nos ensaios CDCXM, não tem um impacto prejudicial sobre a qualidade do transplante renal em nossa prática.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à equipe do Laboratório de Imunologia de Transplantes pelo esforço para realizar todos os ensaios imunológicos do HLA e à equipe de Transplante Renal da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre por disponibilizar os dados do transplante.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Concepção e desenho: Jamile Abud, Jorge Neumann.

Análise e interpretação: Jamile Abud, Cynthia da Silva, Elizete Keitel, Valter Duro Garcia, Roberto Ceratti Manfro, Jorge Neumann.

Coleta de dados: Jamile Abud, Bruna Brasil Dal Pupo.

Redação do artigo: Jamile Abud, Valter Duro Garcia, Roberto Ceratti Manfro, Jorge Neumann.

Revisão crítica do artigo: Roberto Ceratti Manfro, Jorge Neumann.

Aprovação final do artigo: Jamile Abud, Bruna Brasil Dal Pupo, Cynthia da Silva, Elizete Keitel, Valter Duro Garcia, Roberto Ceratti Manfro, Jorge Neumann.

Análise estatística: Jamile Abud.

Responsabilidade geral: Jamile Abud, Jorge Neumann.

Todos os autores leram e aprovaram a versão final do artigo.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FHI, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and Non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*. 2013 Jan;95(1):19-47.
2. Tinckam K. Histocompatibility methods. *Transplant Rev [Internet]*. 2009 Apr; 23(2):80-93. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955470X09000020>
3. Terasaki PI. A personal perspective. *Transplantation [Internet]*. 2012 Apr; 93(8):751-6. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00007890-201204270-00001>
4. Patel R, Teraski PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969 Apr;280(14):735-9.
5. Graff RJ, Buchanan PM, Dzebisashvili N, Schnitzler MA, Tuttle-Newhall J, Xiao H, et al. The clinical importance of flow cytometry crossmatch in the context of CDC crossmatch results. *Transplant Proc [Internet]*. 2010 Nov; 42(9):3471-4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004113451001290X>
6. Gebel HM, Bray RA. Laboratory assessment of HLA antibodies circa 2006: making sense of sensitivity. *Transplant Rev [Internet]*. 2006 Oct; 20(4):189-94. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955470X06000917>
7. Bray RA, Lebeck LK, Gebel HM. The flow cytometric crossmatch. Dual-color analysis of T cell and B cell reactivities. *Transplantation [Internet]*. 1989 Nov; 48(5):834-40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2815255>
8. Liwski RS, Greenshields AL, Bray RA, Gebel HM. Becoming a chef in the human leukocyte antigen kitchen: Interpretation and modification of human leukocyte antigen-antibody assays. *Curr Opin Organ Transplant*. 2017 Jul;22(4):407-14.
9. Jaramillo A, Ramon DS, Stoll ST. Technical aspects of crossmatching in transplantation. *Clin Lab Med*. 2018 Dec;38(4):579-93.
10. Wong G, Teixeira-Pinto A, Chapman J, Craig JC, Pleass H, McDonald S, et al. The impact of total ischemic time, donor age and the pathway of donor death on graft outcomes after deceased donor kidney transplantation. *Transplantation [Internet]*. 2017 Jun; 101(6):1152-8. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00007890-201706000-00006>
11. Liwski R, Adams G, Peladeau G, Eckels D, Bray R, Gebel H. 45-P an optimized flow cytometric crossmatch assay expedites pre-transplant immunologic risk assessment. *Hum Immunol [Internet]*. 2011 Oct; 72(Suppl 1):S48. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885911002400> DOI: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2011.07.070>

12. 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 Jan; 79(1):28-38. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885917305293>
13. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI); Hahn AB, Land GA. ASHI laboratory manual: American Society for histocompatibility and immunogenetics. Canberra: ASHI/National Library of Australia; 2000. v. 2.
14. Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, et al. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* [Internet]. 2006 Aug; 145(4):247-54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16908915/>
15. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* [Internet]. 2009 May; 150(9):604. Available from: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006>
16. Schwartz GJ, Munoz A, Schneider MF, Mak RH, Kaskel F, Warady BA, et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2009 Feb; 20(3):629-37. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2008030287>
17. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*. 2008 Apr;8(4):753-60.
18. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant*. 2014 Feb;14(2):272-83.
19. Ho EK, Vasilescu ER, Colovai AI, Stokes MB, Hallar M, Markowitz GS, et al. Sensitivity, specificity and clinical relevance of different cross-matching assays in deceased-donor renal transplantation. *Transpl Immunol* [Internet]. 2008 Nov; 20(1-2):61-7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966327408000877>
20. Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Stewart DE, Cherikh WS, et al. OPTN/SRTR 2015 annual data report: kidney. *Am J Transplant*. 2017 Jan;17(Suppl 1):21-116.
21. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO). Registro brasileiro de transplantes. Dimensionamento dos transplantes no Brasil e em cada estado (2010-2017) [Internet]. São Paulo: ABTO; 2017; [access in 2018 May 31]. Available from: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2017/rbt-imprensa-leitura-compressed.pdf>
22. Norin AJ, Mondragon-Escorpizo MO, Brar A, Hochman D, Sumrani N, Distant DA, et al. Poor kidney allograft survival associated with positive B cell – Only flow cytometry cross matches: a ten year single center study. *Hum Immunol* [Internet]. 2013 Oct; 74(10):1304-12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885913001845>
23. Graff RJ, Xiao H, Schnitzler MA, Ercole P, Solomon H, Pessin T, et al. The role of positive flow cytometry crossmatch in late renal allograft loss. *Hum Immunol* [Internet]. 2009 Jul; 70(7):502-5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885909000901>
24. Moraes P, Fagundes I, Cardone JM, Gil BC, Kulzer ASS, Hadi RA, et al. Accuracy of the median channel shift in the flow cytometry for predicting complement dependent cytotoxicity crossmatching in kidney transplant candidates. *Transpl Immunol*. 2019 Feb;52:27-31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trim.2018.10.005>