



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

HELENA BIANCHI CAZAROTE

**AVALIAÇÃO DA RELEVÂNCIA CLÍNICA DE ALOANTICORPOS FIXADORES DE
COMPLEMENTO EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS**

CURITIBA
2017



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

HELENA BIANCHI CAZAROTE

**AVALIAÇÃO DA RELEVÂNCIA CLÍNICA DE ALOANTICORPOS FIXADORES DE
COMPLEMENTO EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde, da Escola de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Vanessa Santos
Sotomaior

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Maiora Aita

CURITIBA
2017

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais essa oportunidade de realização pessoal e profissional.

À diretora do laboratório de Imunogenética Cristina von Glehn pelo exemplo de vida, pelo incentivo financeiro para execução deste projeto e por sempre acreditar em mim.

À minha orientadora, Professora Vanessa Santos Sotomaior pela paciência em entender minhas limitações e pelo apoio principalmente nas etapas finais deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Carlos M. Aita por toda a orientação e pela valorosa parceria.

À Renata von Glehn Ponsirenas por sua grandiosa ajuda em todos os momentos, pela amizade, companheirismo, pelo auxílio na elaboração dos artigos e revisão da língua inglesa e por contribuir tão imensamente em todo o desenvolvimento deste estudo. Muito obrigada pela parceria de todos esses anos.

À Michelle Susin e Joana Valdameri pelo auxílio no desenvolvimento do estudo.

À Ana Luísa Ponsirenas e Carlos Fernandes Alves, pela ajuda na aquisição de material e todo suporte financeiro do estudo.

À Doutora Fabiana Contieri por contribuir com o grupo de estudo e toda sua equipe, Vera Lúcia Bertoldi, Patrícia Soldera, Michele Cavalheiro e Denise Dener, pelo auxílio na coleta de dados e manutenção da comunicação com os pacientes.

À Professora Silvia Shimakura pelo desenvolvimento da análise estatística.

A todos os amigos do Laboratório de Imunogenética, em especial a Liliane Machado do Nascimento, Karina Omairi e Alessandra Antunes, por toda a ajuda prestada, por fazerem parte desse momento e por todas as palavras de incentivo.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo constantes.

RESUMO

A descoberta do Complexo Principal de Histocompatibilidade ocorreu na década de 50 e deu início à área clínica de transplantes de órgãos e tecidos. Em humanos, os genes HLA, codificam proteínas que auxiliam no processo de imunomodulação da resposta imunológica, e no reconhecimento do próprio e do não próprio por células do sistema imunológico. Nos transplantes de órgãos sólidos, o *mismatch* HLA entre paciente e doador tem um efeito variável, porém deletério na sobrevida do enxerto a longo prazo. Esse aloreconhecimento pode ser direto ou indireto, porém ambos resultam no ataque ao órgão transplantado onde a maior consequência é a produção de anticorpos contra antígenos HLA não próprios, podendo resultar em processos de rejeição causando dano ao enxerto. Visto que os testes de histocompatibilidade praticamente eliminaram a ocorrência de rejeição hiperaguda, a contribuição dos anticorpos e do sistema complemento nas formas aguda e crônica de perda do enxerto se tornou uma área ativa de investigação nos dias de hoje. Uma vez que as técnicas atuais para determinação de anticorpos anti-HLA não permitem a definição de quais anticorpos irão predizer resultados clínicos, torna-se cada vez mais necessário o uso de novas metodologias que sejam eficazes em determinar quais anticorpos são realmente deletérios ao transplante, e as metodologias capazes de detectar anticorpos fixadores de complemento parecem ser uma estratégia promissora em definir a patogenicidade desses anticorpos. Neste estudo foi avaliado o impacto clínico dos anticorpos anti doador (DSA) e sua capacidade em fixar C1q. Foram monitorados prospectivamente 42 pacientes transplantados renais em períodos específicos até 5 anos após o transplante para a presença de anticorpos anti doador e sua capacidade em fixar complemento. Vinte e quatro pacientes apresentaram DSA, destes, 29% (7) produziram anticorpos DSA fixadores de complemento. Pacientes com presença de DSA fixadores de complemento no pós transplante apresentaram a menor sobrevida do enxerto em 5 anos ($p=0,0042$) e taxas de filtração glomerular inferiores ao longo dos anos de transplante quando comparados com os pacientes com DSAs não fixadores de complemento e pacientes não-sensibilizados ($p=0,001$). Além disso não é possível prever o tempo de aparecimento desses anticorpos, nos pacientes transplantados. O monitoramento pós transplante para anticorpos DSA fixadores de complemento pode ser uma ferramenta útil para determinar os pacientes que apresentam maior risco de falha no enxerto e auxiliar médicos na determinação de regimes de imunossupressão adequados numa tentativa de diminuir as taxas de infecção dos pacientes em baixo risco.

Palavras-chave: anticorpos anti doador (DSA), anticorpos DSA fixadores de complemento, disfunção do enxerto, perda do enxerto, transplante renal.

ABSTRACT

The discovery of the Major Histocompatibility Complex occurred in the 50s and after that the clinical field of transplantation of organs and tissues began. In humans, the HLA genes encode proteins that have a role in immunomodulation of the immune response process, and the recognition of self and non-self by the immune system cells. In solid organ transplantation, HLA mismatch between patient and donor have a variable effect, but harmful in the long-term graft survival. This allorecognition can be direct or indirect, but both result in attack on the transplanted organ, where the major result is the production of antibodies against non-self HLA antigens leading to rejection processes which causing damage to the graft. Since the histocompatibility tests have almost eliminated the occurrence of hyper acute rejection, the contribution of antibodies and the complement system in acute and chronic forms of graft loss became an active area of research nowadays. Once the current techniques for the determination of anti-HLA antibodies did not allow the definition of antibodies which will predict clinical outcomes, it becomes necessary to use new methods that are effective in determining which antibodies are deleterious to transplantation, and the methodologies which are able to detect complement-fixing antibodies appear to be a promising strategy to define the pathogenicity of these antibodies. Here we evaluated the clinical impact of donor specific antibodies (DSA) and their ability to fix C1q. We prospectively monitored 42 kidney allograft recipients at multiple time points up to 5 years after transplantation for the presence of anti-HLA DSA and complement binding. Thirty patients presented DSA, of these, 29% (7) produced complement-binding DSA. Patients with C1q-binding DSA after transplantation had the lowest allograft survival at 5 years ($p=0,0042$) and lower $eGFR_{MDRD}$ over the years of transplant compared with non-C1q-binding DSA and non-sensitized patients ($p=0.001$). Additionally time to the appearance of C1q positivity after transplantation was not predictable. Post-transplant monitoring for complement binding DSA is a useful tool for predicting those at most risk for allograft failure and might be beneficial for evaluation of immunosuppression regimens in an attempt to lower infection rates.

Key words: Donor specific antibodies (DSA), C1q-binding, allograft dysfunction, allograft loss, kidney transplantation.

LISTA DE ABREVIATURAS

MHC – Complexo principal de Histocompatibilidade

HLA – Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leucocyte Antigens*)

AMR – Rejeição Mediada por Anticorpos (*Antibody Mediated Rejection*)

Células NK – Células Natural Killer

MAC- Complexo terminal de ataque a membrana (*Membrane Attack Complex*)

IgM – Imunoglobulina M

IgG – Imunoglobulina G

AGH – Anti-globulina Humana

CDC – Citotoxicidade dependente de complemento

DSA – Anticorpos anti-doador (*Donor-Specific Antibodies*)

de novo DSA – Anticorpos anti-doador formados após o transplante (*de novo Donor-Specific Antibodies*)

eGFR – Taxa de filtração glomerular estimada (*Estimated glomerular filtration rate*)

MDRD - Modificação da dieta em doença renal (*Modification of Diet in Renal Disease*)

TFG – Taxa de Filtração glomerular

MFI – Intensidade média de fluorescência (*Mean Fluorescence Intensity*)

APC- Célula apresentadora de antígeno

SAB – Antígenos únicos ligados a microesferas (*Single Antigen Beads*)

SAB-C1q – Antígenos únicos ligados a microesferas cujos anticorpos são capazes de fixar C1q (*Single Antigen Beads C1q*)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Período de soros analisados.....	12
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura gênica do Complexo Principal de Histocompatibilidade humano (MHC) localizada no braço curto do cromossomo 6. Os genes clássicos desse complexo estão localizados na região de Classe I (*loci* A, B e C) e de Classe II (*loci* DR e DQ) (DONADI, 2000)...... 2

Figura 2 – Vias de alorreconhecimento direto, indireto e semi-direto. No alorreconhecimento direto as células T do receptor interagem com as células apresentadoras de antígenos do doador reconhecendo o complexo MHC-peptídeo alogênico intacto. No alorreconhecimento indireto ocorre o processamento de peptídeos derivados do MHC do doador pelas APCs do receptor. No alloreconhecimento semi-direto o complexo MHC-peptídeo do doador é capturado pelas células APCs do receptor. (WOOD; GOTO, 2012)..... 3

Figura 3: A ativação da via clássica do sistema complemento é mediada pela ligação de C1q nas regiões Fc das IgGs. Através de subsequentes séries de clivagem enzimática a via do complemento produz as anafilotoxinas solúveis C3a e C5a, consideradas potentes quimiotráticos e estimuladores da resposta imunológica. C4d é covalentemente ligado a superfície celular sendo considerado um marcador bem definido da rejeição mediada por anticorpos (RMA) no transplante renal. Adicionalmente, o complexo terminal de ataque a membrana sublítico (sIMAC) é considerado um importante mediador da ativação de células endoteliais (CE). Diferenças nas especificidades dos anticorpos (na figura demonstradas em vermelho e azul) permitem ainda uma maior ligação antígeno-anticorpo, e consequentemente uma maior ligação de C1q. Adaptado de (THOMAS; VALENZUELA; REED, 2015)..... 7

Figura 4 - Passo a passo do teste SAB-IgG total. 1- As microesferas conjugadas com antígenos HLA únicos são adicionadas ao soro do paciente. 2 – Lavagens são realizadas para retirar o que não foi ligado. 3 - anti IgG total humana conjugada com PE é adicionada ao soro do paciente. 4- Lavagens são realizadas

para retirar o que não foi ligado. 5 – Leitura é realizada no analisador de fluxo LABScan 100. 14

Figura 5 - Passo a passo do teste SAB-C1q. 1- C1q é adicionado ao soro do paciente. 2- As microesferas conjugadas com antígenos HLA únicos são adicionadas ao soro do paciente. 3 - anti C1q humano conjugado com PE é adicionado ao soro do paciente. 4- Lavagens são realizadas para retirar o que não foi ligado. 5 – Leitura é realizada no analisador de fluxo LABScan 100. 15

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	10
3. OBJETIVOS.....	11
4. DESENVOLVIMENTO.....	12
5. ARTIGO.....	16
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
7. CONCLUSÃO.....	30
8. REFERÊNCIAS.....	31
9. ANEXO.....	35
TERMO DE CONSENTIMENTO	36

1. INTRODUÇÃO

A identificação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) na espécie humana ocorreu na década de 50, por DAUSSET, PAYNE e VAN ROOD. Os mesmos verificaram que alguns anticorpos, presentes no soro de indivíduos politransfundidos e mulheres múltiplas, eram reativos a antígenos presentes em leucócitos. Estudos genéticos relacionados a esses aloantígenos, bem como estudos sorológicos e moleculares realizados em *workshops* internacionais de histocompatibilidade, permitiram a identificação de vários locos gênicos polimórficos e polialélicos situados em uma região do braço curto do cromossomo 6 humano (região 6p21.31). Essa região do genoma foi subdividida em regiões de classe I, II e III de acordo com a estrutura e função dos produtos dos genes nela situados (figura 1). Estes genes codificam aloantígenos expressos na superfície de leucócitos, os quais receberam a designação de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) (THORSBY, 2009).

A descoberta deste sistema de histocompatibilidade deu início à área clínica em crescente expansão de transplante de órgãos e tecidos. Em humanos, os genes HLA, codificam proteínas que auxiliam no processo de imunomodulação da resposta imunológica, e no reconhecimento do próprio e do não próprio (células e tecidos) por células do sistema imunológico, e sua principal função é apresentar antígenos estranhos a linfócitos T. Como consequência de seu papel na regulação imunológica, o sistema HLA também constitui uma barreira imunológica na clínica dos transplantes visto que, a menos que doador e receptor sejam geneticamente idênticos, os antígenos do enxerto são capazes de provocar uma resposta de rejeição imunológica contra o mesmo. (HOWELL; CARTER; CLARK, 2010)

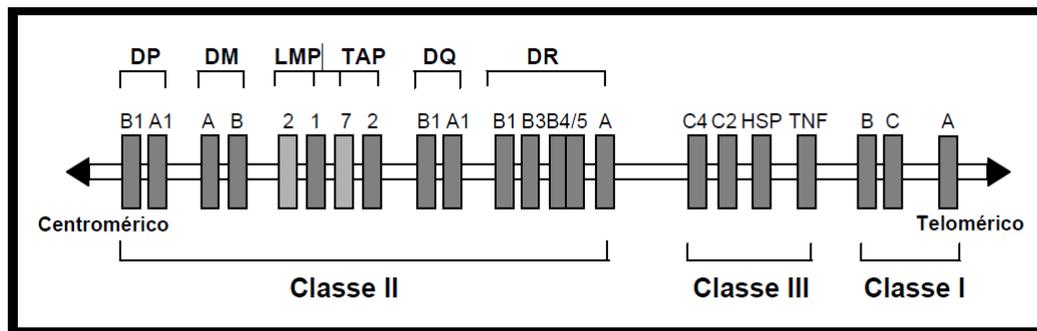


Figura 1 - Estrutura gênica do Complexo Principal de Histocompatibilidade humano (MHC) localizada no braço curto do cromossomo 6. Os genes clássicos desse complexo estão localizados na região de Classe I (*loci* A, B e C) e de Classe II (*loci* DR e DQ) (DONADI, 2000).

Nos transplantes de órgãos sólidos, o *mismatch* HLA entre paciente e doador tem um efeito variável, porém deletério na sobrevivência do enxerto a longo prazo, devido ao reconhecimento das moléculas HLA não próprias pelas células T do receptor (HOWELL; CARTER; CLARK, 2010). Esse alo-reconhecimento pode ser direto, onde ocorre o reconhecimento das moléculas HLA expressas do doador como não próprias, pelo repertório de células T do receptor; ou indireto onde as moléculas HLA do doador são processadas e seus peptídeos antigênicos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos do receptor, e reconhecidos como não próprios pelas células T do receptor (HORNICK, 2006). Uma terceira via, conhecida como via de alo-reconhecimento semi-indireto, foi descrita mais recentemente e envolve a aquisição das moléculas HLA intactas do doador pelas células dendríticas do receptor, as quais se encarregam da apresentação às células T do receptor (figura 2). A significância *in vivo* desta via no contexto da rejeição, ainda não é bem elucidada (HERRERA *et al.*, 2004; WOOD; GOTO, 2012).

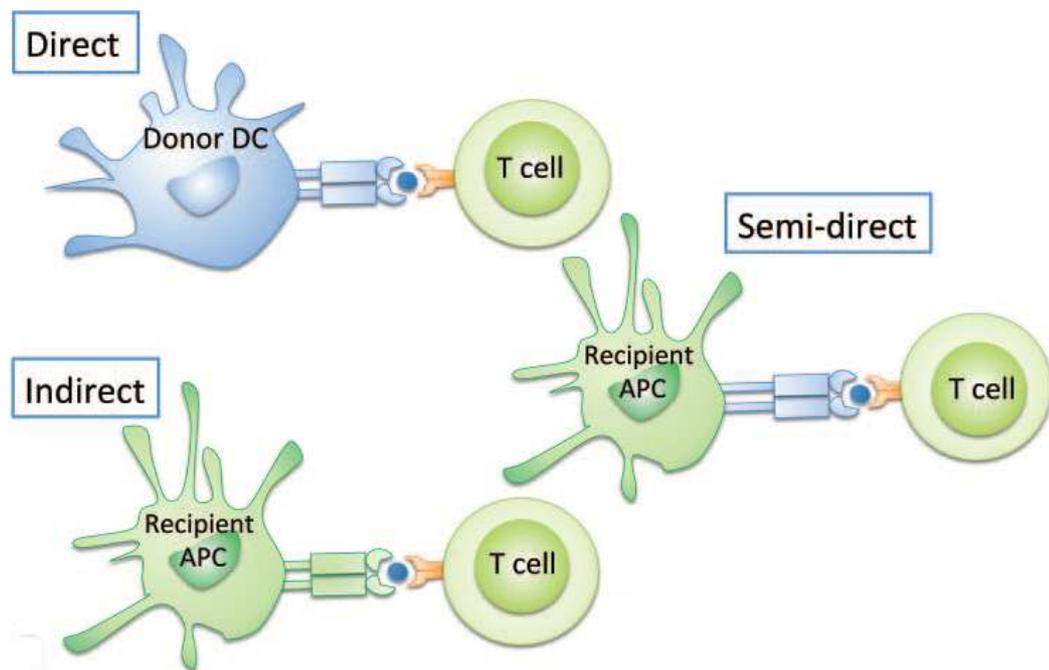


Figura 2 – Vias de alorreconhecimento direto, indireto e semi-direto. No alorreconhecimento direto as células T do receptor interagem com as células apresentadoras de antígenos do doador reconhecendo o complexo MHC-peptídeo alogênico intacto. No alorreconhecimento indireto ocorre o processamento de peptídeos derivados do MHC do doador pelas APCs do receptor. No alloreconhecimento semi-direto o complexo MHC-peptídeo do doador é capturador pelas células APCs do receptor. (WOOD; GOTO, 2012)

PATEL *et al.* 1969, WORTHINGTON *et al.* 2007, verificaram a associação dos antígenos HLA com rejeição mediada por anticorpos, detectada por histologia, depósito de C4d, glomerulopatia e falha do enxerto.

Respostas de anticorpos contra antígenos HLA não próprios podem resultar em processos de rejeição hiperaguda, aguda acelerada e aguda, e também podem ter um papel na rejeição crônica causando dano ao enxerto (GLOOR *et al.*, 2008). A rejeição hiperaguda ocorre em até 24 horas após a reperusão do órgão transplantado e é caracterizada por perda de função imediata do mesmo, seguida de hemorragia, microtrombose e inflamação. Ela é iniciada pela presença de anticorpos anti-doador pré-formados, predominantemente anticorpos anti-HLA, que se ligam aos vasos sanguíneos e ativam o sistema complemento. A rejeição

mediada por anticorpos (AMR), previamente conhecida como rejeição humoral ou rejeição vascular aguda, não é determinada pela presença de anticorpos contra os antígenos HLA do doador no momento do transplante, porém pela formação desses anticorpos após o transplante, sendo caracterizada por isquemia focal, injúria severa do endotélio e coagulação intravascular difusa. O tempo de ocorrência dessa rejeição está intimamente ligado ao tempo de produção desses anticorpos, podendo ser de 24 horas até dias, em pacientes sem uso de imunossupressão, ou de semanas a meses, em pacientes imunossuprimidos (CHANG; PLATT, 2009). E por fim a rejeição crônica, conhecida por limitar a sobrevida do enxerto a longo prazo, é determinada particularmente por inflamações repetitivas e injúria mediada por causas imunológicas ou não; sendo caracterizada por vasculopatia obliterante, infiltração de leucócitos, oclusão luminal e uma acentuada fibrose tecidual (CHANG; PLATT, 2009). Sabe-se hoje que além de mecanismos celulares, mecanismos humorais também estão envolvidos na rejeição crônica do enxerto, e que a rejeição mediada por anticorpos (RMA) pode iniciar dias após o transplante, mas também pode atuar na a perda crônica do enxerto (TERASAKI; CAI, 2008).

Sabe-se que as células endoteliais são o alvo principal na AMR (JIN *et al.*, 2005; MINAMI *et al.*, 2006; REGELE; BÖHMIG, 2003; RODRIGUEZ *et al.*, 2005). A ligação do anticorpo aos antígenos HLA ou sanguíneos expressos no endotélio pode iniciar a ativação do sistema complemento, recrutamento de leucócitos (causadores de inflamação vascular), e facilitação de citotoxicidade mediada por células natural killer (NK) ou por monócitos e macrófagos. Juntas essas reações aos aloanticorpos podem resultar em dano endotelial, perda da integridade vascular e aumento da coagulação (BALDWIN *et al.*, 2004; BALDWIN; LARSEN; FAIRCHILD, 2001; COLVIN; SMITH, 2005; MORRELL *et al.*, 2008; VALUJSKIKH; HEEGER, 2003). Além disso, anticorpos e os componentes do sistema complemento através dos receptores Fc e receptores do complemento podem alterar a expressão gênica em células endoteliais ou células inflamatórias, os quais promovem um remodelamento das lesões mediadas por anticorpos que comprometem a função do enxerto (SIS; HALLORAN, 2010).

Visto que os testes de histocompatibilidade praticamente eliminaram a ocorrência de rejeição hiperaguda, a contribuição dos anticorpos e do sistema complemento nas formas aguda e crônica de perda do enxerto se tornaram uma área ativa de investigação nos dias de hoje (SMITH *et al.*, 2005, 2006; UEHARA *et al.*, 2007; WEHNER *et al.*, 2007).

O sistema complemento, tradicionalmente conhecido como sendo um componente do sistema imunológico inato, foi designado, a mais de 100 anos atrás, como sendo uma “força complementar” da resposta mediada por anticorpos e a base das propriedades antibacterianas do sangue/soro BORDET e GENGOU 1901 *apud* (HEEGER; KEMPER, 2012).

É conhecido que o sistema complemento compreende mais de 30 proteínas de fase fluída e ligadas a membrana celular, que são ativadas em cascata por três vias distintas: a via clássica, que é iniciada pela ligação de anticorpos fixadores de complemento ao antígeno; a via da lectina, que reconhece padrões de carboidratos patógeno-específicos; e a via alternativa, que é continuamente ativada a níveis muito baixos através de hidrólise espontânea do componente C3 do complemento no plasma. Todas as três vias culminam na geração de moléculas efetoras chaves do sistema complemento: a opsonina C3b, as anafilotoxinas C3a e C5a e o complexo terminal de ataque à membrana (MAC) (WALPORT, 2001a, 2001b).

Sabe-se que a molécula C1q inicia a ativação da via clássica do complemento através da formação de imunocomplexos compostos por um antígeno e um anticorpo, podendo este ser da classe IgM ou IgG; sendo essa a função melhor conhecida dessa molécula (figura 3) (BALDWIN; OTA; RODRIGUEZ, 2003).

Embora os domínios da região constante das quatro subclasses de IgG humanas compartilhem sequências de aminoácidos virtualmente idênticas, elas diferem significativamente em sua habilidade em ativar o sistema complemento. Estudos com anticorpos quiméricos de cobaias e humanos demonstraram que as subclasses IgG3 e IgG1 são efetivas na ativação do complemento, já IgG2 fixa pobremente e IgG4 parece ser totalmente ineficaz nesta função (BRÜGGEMANN

et al., 1987; DANGL *et al.*, 1988). Tal fato hoje é melhor discutido por (THOMAS; VALENZUELA; REED, 2015) que coloca que, sob determinadas condições, tais como alta densidade de antígenos/epítopes ou aumento das concentrações das proteínas do sistema complemento e das IgGs, todas as subclasses, incluindo IgG2 e IgG4, podem ativar a cascata do complemento com eficiência. von Glehn-Ponsirenas (dados não publicados) também afirma que, a resposta imunológica é mais intensa e com um pior prognóstico na sobrevida do enxerto quando em títulos altos de anticorpos com a presença das 4 subclasses de IgGs atuando em conjunto.

Com relação à ligação com C1q, análises quantitativas mostraram que anticorpos da subclasse IgG3 se ligam duas vezes mais a esta molécula quando comparados com anticorpos da subclasse IgG1, entretanto a eficiência lítica extremamente superior de IgG1 não pode ser explicada pela sua habilidade em se ligar ou ativar C1. Após a ativação de C1, o próximo passo na via clássica do complemento é a ativação de C4 depois de sua clivagem proteolítica por C1s. O maior fragmento, C4b pode se ligar covalentemente à superfície da célula alvo, podendo essa quantidade ser posteriormente mensurada. Nesta situação anticorpos da subclasse IgG1 causam um número consideravelmente maior de ligação de C4b quando comparados aos anticorpos IgG3, correspondendo com os resultados de lise celular superiores desta subclasse (BINDON *et al.*, 1988).

A ativação do complemento tem sido associada a efeitos deletérios em transplantes de órgãos, visto que C3, C3d e C4d são depositados nos mesmos durante episódios de rejeição (BALDWIN *et al.*, 2004; SERINSOZ *et al.*, 2005). Essas observações indicam que as proteínas do sistema complemento a jusante de C1q são consideradas deletérias no contexto de transplantes de órgãos. Sendo assim, as múltiplas facetas das implicações fisiológicas e patológicas da via clássica do sistema complemento, vem gerando um aumento de interesse no estudo do complexo C1q, uma protease multimolecular responsável pelo início da ativação desta via.

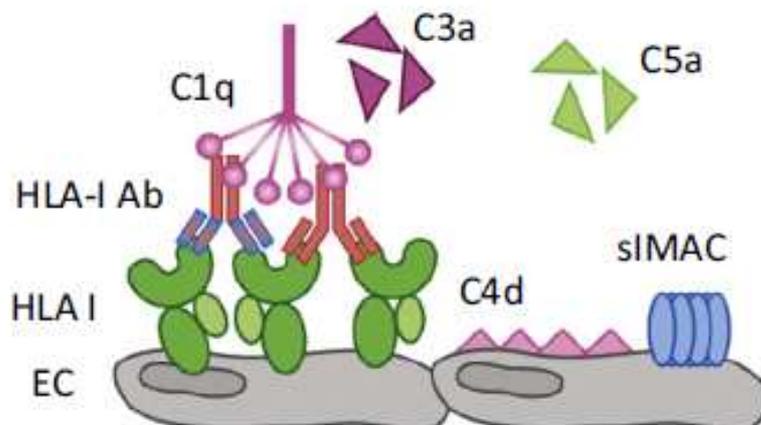


Figura 3: A ativação da via clássica do sistema complemento é mediada pela ligação de C1q nas regiões Fc das IgGs. Através de subsequentes séries de clivagem enzimática a via do complemento produz as anafilatoxinas solúveis C3a e C5a, consideradas potentes quimiotráticos e estimuladores da resposta imunológica. C4d é covalentemente ligado a superfície celular sendo considerado um marcador bem definido da rejeição mediada por anticorpos (RMA) no transplante renal. Adicionalmente, o complexo terminal de ataque a membrana sublítico (sIMAC) é considerado um importante mediador da ativação de células endoteliais (CE). Diferenças nas especificidades dos anticorpos (na figura demonstradas em vermelho e azul) permitem ainda uma maior ligação antígeno-anticorpo, e consequentemente uma maior ligação de C1q. Adaptado de (THOMAS; VALENZUELA; REED, 2015)

Os ensaios baseados em células, mais conhecidos como testes de citotoxicidade mediada por complemento, são considerados os testes padrão para detecção de anticorpos anti-HLA clinicamente relevantes nos soros pré-transplante de pacientes, entretanto a baixa sensibilidade e especificidade destes testes são suas maiores desvantagens, e por esse motivo nem sempre é possível determinar com acurácia esses anticorpos (BRAY; LEBECK; GEBEL, 1989; PEI *et al.*, 1998; WORTHINGTON *et al.*, 1998). Os avanços recentes em testes de fase sólida, considerados mais sensíveis e específicos, tais como os que contêm antígenos HLA únicos ligados a microesferas (SAB – *Single Antigen Beads technology*), permitiram a detecção de anticorpos anti-HLA específicos contra antígenos do doador (GIBNEY *et al.*, 2006; PEI *et al.*, 1999). Contudo ainda não é possível distinguir quais desses anticorpos podem vir a causar dano ao enxerto, especialmente àqueles detectados em baixos níveis, que podem se ligar mas não ativar a cascata do complemento (YABU *et al.*, 2011).

Sendo assim, as técnicas atuais possuem limitações na definição de anticorpos anti HLA que irão predizer resultados clínicos em transplantes de órgãos, uma vez que não discriminam as subclasses IgG presentes na resposta ao enxerto. Sem a determinação dessas subclasses, bem como de suas propriedades em fixar, e conseqüentemente iniciar a cascata do complemento, se torna difícil determinar se tais anticorpos serão capazes de causar injúria ao órgão transplantado (SMITH *et al.*, 2007).

Uma maneira de distinguir quais anticorpos anti-HLA são prejudiciais é determinar quais desses podem vir a ativar a via clássica do complemento (YABU *et al.*, 2011).

Considerando o importante papel de fixação do complemento em definir rejeição mediada por anticorpos HONGER *et al.* (2010) utilizou um teste por citometria de fluxo, previamente estabelecido por WAHRMANN *et al.* (2003), para detecção e identificação de depósitos de C4d induzidos por anticorpos anti-doador, na tentativa de correlacionar esses depósitos com AMR. Entretanto este teste apresentou pouca sensibilidade não permitindo essa correlação com a amostragem estudada (pacientes com anticorpos em baixo título contra o doador, positivos em testes de fase sólida, porém negativos em prova cruzada por CDC) (HÖNGER *et al.*, 2010; WAHRMANN *et al.*, 2003).

Em contrapartida WAHRMANN *et al.* (2006) e BARTEL *et al.* (2008) encontraram forte associação de C4d positivo com AMR e sobrevida reduzida do enxerto em pacientes renais.

Posteriormente, CHIN *et al.* 2011 e YABU *et al.* 2011 desenvolveram um teste SAB-C1q (*single antigen beads technology*) que permitiu a identificação de anticorpos anti-HLA fixadores de complemento com alta sensibilidade e especificidade. E devido ao fato do teste ter sido capaz de detectar níveis mais baixos de anticorpos, não detectáveis tanto pela técnica de citotoxicidade dependente de complemento (CDC) quanto pelo depósito de C4d, ele foi considerado um teste mais sensível que os demais. Além disso, o teste de C1q pode detectar anticorpos da classe IgM fixadores de complemento que, em alguns

estudos, também foram associados a rejeição (MIZUTANI *et al.*, 2005; STASTNY *et al.*, 2009).

Adicionalmente, CHEN *et al.* 2011, demonstraram que anticorpos detectados pela metodologia de SAB-C1q têm uma maior associação com rejeição mediada por anticorpos (AMR) quando comparados com os anticorpos detectados pela metodologia SAB original. Fato corroborado por ZEEVI *et al.* 2013 que observou associação entre positividade para anticorpos contra o doador (DSA) no teste SAB-C1q, principalmente quando estes apresentavam um título superior a 1:16, com presença de rejeição mediada por anticorpos no pós-transplante recente em 13 receptores transplantados cardíacos.

Pelo fato do teste C1q ser mais específico tem sido possível avaliar o efeito de anticorpos fixadores de complemento, presentes tanto no pré como no pós-transplante na sobrevida do enxerto. Neste contexto OTTEN *et al.*, 2012; e CRESPO *et al.*, 2013 observaram que a presença desses anticorpos, detectados no pré transplante, parece não diminuir a sobrevida do enxerto a longo prazo. Em contrapartida, observou-se que quando os mesmos são detectados no período pós transplante estes estão associados com uma sobrevida do enxerto reduzida (FREITAS *et al.*, 2013; LOUPY *et al.*, 2013; ROELEN; DOXIADIS; CLAAS, 2012).

LOUPY e colaboradores (2013) também demonstraram em uma população de 1016 transplantados renais, testados para a presença de anticorpos fixadores de complemento um ano após o transplante ou no período da rejeição, que os mesmos quando detectados aumentam o risco de perda do enxerto em 4 vezes, quando comparados com anticorpos contra o doador não fixadores de complemento e com receptores não sensibilizados.

Mais recentemente VIGLIETTI e colaboradores (2017) em um estudo prospectivo com uma extenso monitoramento e caracterização da presença de anticorpos fixadores de C1q e positivos para IgG 3 no pré e pós-transplante, verificou que a precisa caracterização do anticorpo (C1q e/ou IgG3) melhora em 60% dos pacientes a predição do risco individual de perda do enxerto, quando comparado com a abordagem SAB original. (VIGLIETTI *et al.*, 2017)

Visto que o número de pacientes sensibilizados cresce a cada ano nas listas de espera por um transplante, assim como o monitoramento dos DSAs no período pós-transplante tem sido considerado importante na prevenção da rejeição mediada por anticorpos, torna-se cada vez mais necessário o uso de novas metodologias que sejam eficazes em determinar quais anticorpos são realmente deletérios ao transplante e as metodologias capazes de detectar anticorpos fixadores de complemento tem se mostrado uma estratégia valorosa em definir a patogenicidade desses anticorpos.

2. JUSTIFICATIVA

A presença de anticorpos anti-HLA fixadores de complemento específicos contra o enxerto em pacientes renais é fator de restrição ao transplante, uma vez que aumenta a probabilidade da rejeição ao órgão transplantado.

Sabe-se que o teste de citotoxicidade mediada por complemento possui baixa sensibilidade e especificidade, não permitindo uma definição acurada desses anticorpos uma vez que pacientes que são considerados não sensibilizados por este teste apresentam prova cruzada positiva contra doadores falecidos quando testados em metodologias mais sensíveis. (BRAY; LEBECK; GEBEL, 1989; PEI *et al.*, 1998; WORTHINGTON *et al.*, 1998). Em contrapartida as técnicas consideradas mais sensíveis utilizadas atualmente não permitem a definição de anticorpos anti-HLA que irão predizer resultados clínicos em transplantes de órgãos, uma vez que não discrimina as subclasses IgG fixadoras ou não de complemento. (SMITH *et al.*, 2007). Além disso, a técnica por SAB é qualitativa permitindo apenas a descrição de anticorpos positivos, porém não sendo possível inferir o título dos mesmos pela média de fluorescência apresentada no resultado. (TAIT *et al.*, 2012).

Estudos demonstraram que enquanto alguns pacientes com anticorpos detectados apenas pela técnica de SAB apresentaram maior incidência de rejeição aguda (GUPTA; SINNOTT, 2009; VAN DEN BERG-LOONEN *et al.*, 2008; VLAD *et al.*, 2009), outros reportaram que esses anticorpos são clinicamente

irrelevantes, não apresentando nenhum dano ao enxerto (AUBERT *et al.*, 2009; PHELAN *et al.*, 2009).

Esta variação entre pacientes em resposta ao transplante vem sendo atribuída às diferenças entre as propriedades biológicas das subclasses de IgG, em sua habilidade de ativar o sistema complemento pela via clássica e também à quantidade de anticorpo presente no soro do paciente (HEINEMANN *et al.*, 2007; LOBASHEVSKY *et al.*, 2010).

Sendo assim, através deste estudo pretende-se avaliar a utilização da metodologia SAB-C1q na discriminação de quais anticorpos anti-HLA, contra os antígenos HLA do doador, são capazes de fixar complemento pela função do anticorpo, assim como pela quantidade disponível no soro, e então correlacionar o surgimento desses anticorpos com a sobrevida do enxerto e com a função renal desses pacientes.

Esta nova abordagem para detecção de anticorpos contra antígenos HLA do doador (DSA) deverá contribuir para a melhora do acompanhamento clínico dos pacientes ao longo do tempo do transplante.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar se a detecção de anticorpos anti-HLA específicos ao doador (DSA) fixadores de complemento têm um valor adicional na avaliação de risco de falha do enxerto renal ao longo do tempo do transplante.

3.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar os anticorpos específicos contra o doador quanto a fixação ou não da molécula C1q.
2. Comparar as diferenças na sobrevida do enxerto, de acordo com a capacidade dos anticorpos em fixar ou não C1q.
3. Correlacionar a presença de anticorpos fixadores de C1q com a função do enxerto ao longo do tempo.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1 Pacientes e Doadores

42 Pacientes renais provenientes do Hospital Evangélico de Curitiba, transplantados com doador vivo, que foram transplantados no período de 2007 a 2010, e monitorados para a presença de anticorpos anti-HLA até 2013 no Laboratório de Imunogenética da PUCPR e que não apresentam HLA idêntico ao do doador foram recrutados para o estudo da avaliação da relevância clínica das diferentes subclasses de aloanticorpos detectados por citometria de fluxo em fase sólida usando micro-esferas ligadas a um único antígeno HLA em plataforma multiplex (SAB) (von Glehn Ponsirenas, dados não publicados). Para tanto, pacientes e doadores assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 1).

Os resultados dos testes pré-transplante destes pacientes – genotipagem HLA, PC-CDC-AGH e detecção de anticorpos anti-HLA por SAB foram analisados. Igualmente, foram avaliados os resultados da detecção de anticorpos anti-HLA por SAB durante o período pré e pós-transplante, que compreendeu desde os primeiros dias pré transplante até 60 meses após este procedimento (von Glehn Ponsirenas e Susin *et al.*, dados não publicados).

Assim, considerando todos os resultados, estes pacientes foram agrupados em dois grupos, sendo o primeiro deles formado pelos pacientes que apresentaram anticorpos detectados por SAB, anti-HLA específicos para antígenos do doador no pré transplante (17) e o segundo formado pelos pacientes que não apresentaram anticorpos detectados por SAB no pré-transplante (25).

Foram realizados 333 testes utilizando a metodologia SAB original (anticorpo secundário IgG total) para os pacientes incluídos no estudo, sendo que pelo menos um soro dentro de cada período descrito na tabela 1, foi testado.

Tabela 1: Período de soros analisados

Períodos	Pó- transplante
1º período	1 a 4 dias
2º período	5 a 10 dias

3º período	11 a 16 dias
4º período	17 a 20 dias
5º período	21 a 30 dias
6º período	31 a 60 dias
7º período	61 a 90 dias
8º período	91 a 180 dias
9º período	1 ano
10º período	2 anos
11º período	3 anos
12º período	4 anos
13º período	5 anos

Os soros que apresentaram presença anticorpos anti-HLA detectados no teste SAB original, foram analisados pela metodologia SAB-C1q (157 amostras testadas).

Os resultados das amostras com presença de anticorpos anti-HLA detectados na metodologia SAB C1q foram comparados com os resultados das amostras com presença de anticorpos anti-HLA detectados no teste SAB original e, posteriormente a essa comparação, o grupo contendo os pacientes com presença de anticorpos anti-HLA específicos para antígenos do doador foi subdividido em pacientes com presença ou ausência de anticorpos anti-HLA específicos para antígenos do doador fixadores de complemento.

4.2 Métodos

4.2.1. Detecção de anticorpos anti-HLA por SAB

A detecção de anticorpos anti-HLA por SAB foi realizada com o *kit LABScreen®Single Antigen (One Lambda)*, de acordo com as instruções do fabricante. O objetivo do teste é determinar as especificidades de anticorpos anti-HLA IgGs reativos no soro do paciente.

As análises foram realizadas pelo software HLA FUSION™ (One Lambda, Inc.). Um resultado positivo foi definido arbitrariamente como um valor médio de

intensidade de fluorescência (MFI) maior que 500 após normalização pelos controles internos do software de análise. A especificidade contra os antígenos do doador foi determinada através da comparação entre os anticorpos com reação positiva e o HLA do doador para os *loci* HLA-A, -B, -DR, -DQ.

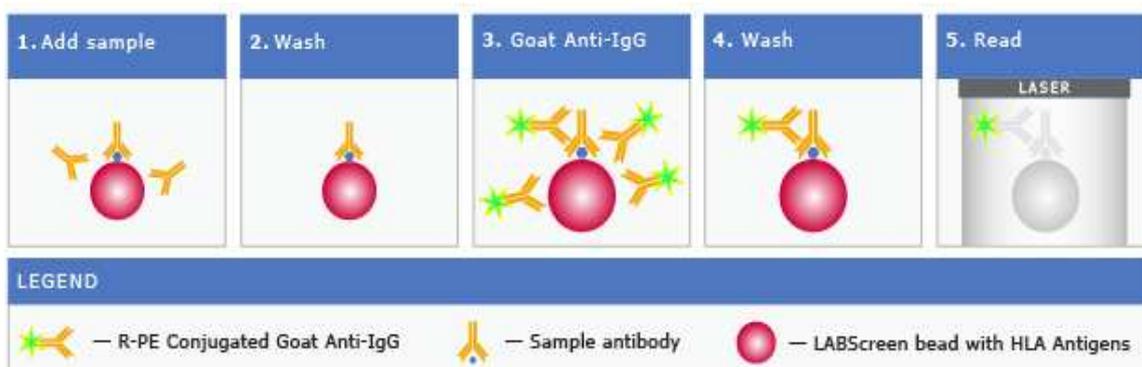


Figura 4 - Passo a passo do teste SAB-IgG total. 1- As microesferas conjugadas com antígenos HLA únicos são adicionadas ao soro do paciente. 2 – Lavagens são realizadas para retirar o que não foi ligado. 3 - anti IgG total humana conjugada com PE é adicionada ao soro do paciente. 4- Lavagens são realizadas para retirar o que não foi ligado. 5 – Leitura é realizada no analisador de fluxo LABScan 100.

Fonte: <http://www.onelambda.com/content/dam/onelambda/en/TDX/Documents/Product%20Sheets/ProdSheet-LABScreen.pdf>

4.2.2. Determinação de anticorpos fixadores de complemento por SAB-C1q

O kit *C1q-ScreenTM* (One Lambda), foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante a fim de determinar quais dos anticorpos detectados pelo kit *LABScreen®Single Antigen* (One Lambda) são capazes de fixar complemento. Este teste difere do teste padrão (SAB) pois a marcação com IgG anti-humana conjugada com PE (ficoeritrina) é substituída pela marcação com anti C1q humana conjugada com PE, sendo o componente do complemento C1q ligado ao complexo antígeno-anticorpo detectado após essa marcação. Além disso os soros são aquecidos a 56°C por 30 minutos para desnaturar as proteínas do complemento endógenas. A emissão de fluorescência de cada esfera é detectada por um analisador de fluxo, o *LABScanTM 100*, que realiza a aquisição de dados. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Stanford (TYAN; CHEN, 2013). Brevemente, o MFI foi arranjado do valor mais

alto para o mais baixo e então buscou-se um valor de delta de 300 entre duas microesferas adjacentes. Todas as reações abaixo do valor mais baixo deste delta foram consideradas negativas. Ao valor mais alto neste ponto foi adicionado 1000, obtendo assim um ponto de corte no qual os valores mais altos que o valor $x + 1000$, foram considerados positivos. Os valores entre o corte positivo e negativo foram analisados conforme histórico do paciente.

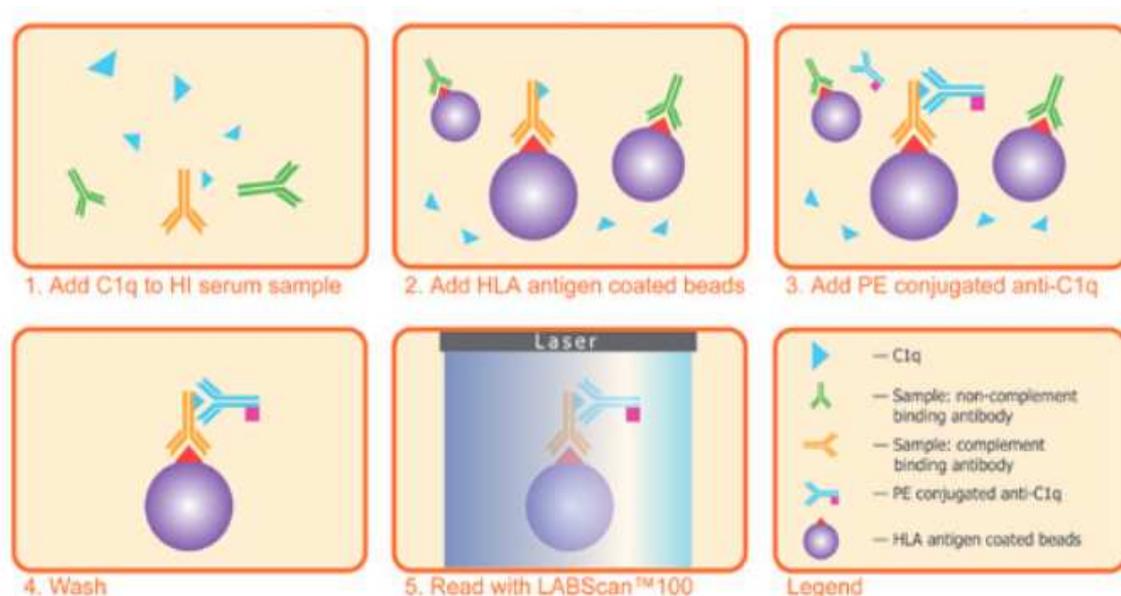


Figura 5 - Passo a passo do teste SAB-C1q. 1- C1q é adicionado ao soro do paciente. 2- As microesferas conjugadas com antígenos HLA únicos são adicionadas ao soro do paciente. 3 - anti C1q humano conjugado com PE é adicionado ao soro do paciente. 4- Lavagens são realizadas para retirar o que não foi ligado. 5 – Leitura é realizada no analisador de fluxo LABScan 100.

Fonte: <http://www.onelambda.com/content/dam/onelambda/en/TDX/Documents/Product%20Sheets/ProdSheet-C1qScreen.pdf>

4.2.3. Análise estatística

Para a análise descritiva da população estudada os pacientes foram redistribuídos em dois grupos, sendo o primeiro com presença/ausência de anticorpos anti-HLA específicos para antígenos do doador no pré-transplante (17/25) e o segundo com presença/ausência de anticorpos anti-HLA específicos para antígenos do doador no pós-transplante (24/18). Para os grupos com presença de DSA, os mesmos foram subdivididos em presença/ausência de

anticorpos anti-HLA fixadores de C1q específicos para antígenos do doador no pré- (3/14) e pós-transplante (6/18).

A análise foi realizada através do programa IBM-SPSS *Statistics* (versão 20). As características epidemiológicas dos pacientes e doadores para os grupos foram comparadas pelos testes Qui-quadrado, para variáveis discretas, e ANOVA ou Kruskal-Wallis, para as variáveis contínuas, dependendo da análise de normalidade.

A sobrevida foi analisada até 5 anos pós-transplante considerando perda do enxerto como o evento de interesse. As taxas de sobrevida foram plotadas em curvas de Kaplan-Meier e comparadas de acordo com a presença de anticorpos DSA e sua capacidade de fixar complemento usando o teste log-rank.

Com o intuito de avaliar a evolução da função renal durante o tempo de estudo relacionada aos anticorpos DSA fixadores de complemento, foi aplicado um modelo de medidas repetidas (ANOVA), considerando múltiplas medidas de cada paciente. A função renal foi avaliada através da taxa estimada de função glomerular (eTFG) pela fórmula MDRD (*Modified Diet in Renal Disease*), calculada através do valor de creatinina, considerando sexo, idade e raça por 1,73m²/ml/minuto.

As análises estatísticas foram realizadas usando o software MedCal para Windows, versão 13.0. Valores de p menores que 0.05 foram considerados estatisticamente significantes.

5. ARTIGO

REVISTA: Transplant Immunology

Complement-Fixing Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Failure

Helena B. Cazarote^{1,2}, Silvia Shimakura³, Joana S. Valdameri¹, Fabiana L. C. Contieri⁴, Cristina Q. C. von Glehn¹, Carlos M. Aita⁵, Michelle F. Susin², Vanessa Santos Sotomaior², Renata Glehn-Ponsirenas^{1,*}

¹Transplant Immunology Laboratory, Hospital Universitário Cajuru, Curitiba, PR, Brazil

²School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

³Department of Statistics, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

⁴Kidney Transplant Unit, Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Curitiba, PR, Brazil

⁵Diagnósticos do Brasil, São José dos Pinhais, PR, Brazil

Short title: Monitoring C1q-binding DSA

***Correspondence:**

Renata Glehn-Ponsirenas, Transplant Immunology Laboratory, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Guabirota, s/n, portão 3, bl IV, 2º andar, Curitiba PR 80215200, Brazil

Email: renata.ponsirenas@gmail.com

Phone/FAX: 55 41 33341139

DISCLOSURES

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose, Renata Glehn-Ponsirenas provides consultation for HLA scientific data for One Lambda, Inc. The other authors have no conflict of interest to disclose.

ABSTRACT

Detection of donor-specific antibodies (DSA) has improved the risk classification and post-transplant evaluation of kidney recipients. Moreover, assessment of DSA C1q-binding ability has been shown to improve the individual risk classification of transplant patients for allograft loss, especially when detected after transplantation. The aim of this study was to evaluate the additional clinical impact of C1q-binding DSA detection in a population that was extensively monitored for DSA and MFI alterations. Forty-two kidney allograft recipients were followed-up at multiple time points for up to 5 years after transplantation for the presence of anti-HLA DSA-IgG total. The samples that were positive for these antibodies were retrospectively tested for the presence of complement-binding antibodies. Overall, 24 patients presented DSA, 29% (7) of which also produced complement-binding DSA. Compared to patients with non-C1q-binding DSA and non-sensitized patients, patients with C1q-binding DSA after transplantation had the lowest allograft survival rate at 5 years ($p = 0.042$) and showed a lower estimated glomerular filtration rate (based on the Modification of Diet in Renal Disease formula) during the post-transplant follow-up period ($p = 0.01$). Thus, post-transplant monitoring for complement-binding DSA is a useful tool for predicting individuals most at risk for allograft failure, and might also be beneficial for evaluation of immunosuppression regimens.

Highlights

- Positivity for C1q-binding DSA in pre-transplant serum was not a significant predictor for reduction in allograft survival;
- The presence of C1q-binding DSA post-transplantation correlated with diminished allograft function and lower allograft survival;
- Heterogeneity was evident in the pattern of the appearance of C1q-positivity among the patients included in this study;

Key words: Donor-specific antibodies (DSA), C1q-binding, allograft dysfunction, allograft loss, antibody-mediated rejection (ABMR), kidney transplantation

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Transplant Immunology Laboratory of Hospital Universitário Cajuru for financial support.

1. INTRODUCTION

The evolution of technologies for the detection of antibodies in solid phase has now allowed for the convenient identification of donor-specific antibodies (DSA) and has thus improved the risk classification of patients with respect to allograft loss through pre- and post-transplantation testing [1, 2, 3]. However, despite improvements in immunosuppressive therapies and immunological evaluation of transplant candidates, acute and chronic rejections remain the main cause of allograft failure, and there is ample evidence to suggest that antibodies play a substantial role in contributing to such rejection [4, 5]. Moreover, the lack of human leukocyte antigen (HLA)-compatible donors and the need for desensitization further exacerbate this problem [6].

The lymphocytotoxicity methodology presented by Patel and Terasaki in 1969 [7] demonstrated that complement fixing is a key element of antibody-mediated rejection (ABMR), and the use of this methodology in renal transplantation has contributed to a substantial reduction in the occurrence of hyperacute and acute rejection. In the 1990s, the discovery of C4d deposition in the allograft microvasculature, which was subsequently correlated with the presence of DSA, further reinforced the relationship between the presence of antibodies and allograft rejection [8, 9].

Structural and functional differences of the immunoglobulin G (IgG) subclasses with respect to their ability to bind C1q—the first component of the classical complement cascade—has long been a subject of interest in the field of transplant immunology [10, 11]. C1q binds to the antigen bound antibody eliciting a sequence of soluble peptides and bound molecules that culminates in the formation of the membrane attack complex, which causes cell lysis generating the features of acute allograft rejection [4]. The globular domains of C1q bind to at least two conformationally altered Fc portions of antibody bound to antigen, implying that there is a minimal concentration of antibodies needed to activate the complement system [4, 12]. Modifications to the classical DSA testing method with further detection of specific characteristics of antibodies, such as the IgG subclass and ability to bind to C1q, have been intensively studied to determine the possibility of improving the diagnosis of ABMR and achieve better prediction of the individual risk of

allograft loss. The presence of complement-fixing DSA, especially after transplantation, has been shown to be related with a higher risk of rejection and allograft loss in renal transplantation [2, 3, 13]. According to Viglietti et al. [2], the precise monitoring and characterization of anti-HLA DSAs, including the C1q-binding status, improved the evaluation of individual risk for allograft loss.

In our center we perform an extensive post-transplant protocol for the evaluation of DSA and MFI as routine for kidney transplanted recipients. The aim of this study was to evaluate the clinical impact of adding the information of C1q-binding to our post-transplant protocol. Furthermore, we compared the risk impact of C1q detection for pre- and post-transplant clinical evaluation in our population.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Study Population

All consecutive living donor kidney recipients ($n = 158$) that received a transplant at Hospital Evangélico de Curitiba, Paraná, Brazil between 2007 and 2010 were eligible for inclusion in the study. Among these, 42 patients who were prospectively monitored for the presence of anti-HLA DSA were ultimately enrolled. The remaining patients ($n = 116$) were excluded owing to lack of complete follow-up or available serum for new tests. All patients received a transplant with a negative complement-dependent cytotoxicity cross-match for IgG T and B cells, and ABO blood group compatibility. The standard immunosuppressive regimen was administered comprising cyclosporine, mycophenolate mofetil, and prednisone. Rejection treatment was based on the corticosteroid pulse, anti-thymocyte globulin, or intravenous Ig. Graft function was estimated by the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) equation and reported as the estimated glomerular filtration rate ($eGFR_{MDRD}$) in $mL \cdot min^{-1} \cdot 1.73 m^{-2}$. Biopsies were only performed in the case of allograft dysfunction. This study was approved by the Ethics Committee on Research at Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

At least one serum sample pre-transplant was available for all patients, and at least one sample was collected per month in the first three months post-transplant, followed by one sample at 6 months post-transplant, and then one sample per year until a maximum of 5 years post-transplantation. DSA-positive serum samples were then retrospectively tested using the SAB-C1q kit (C1qScreen™, One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA) according to the manufacturer's protocol.

2.2. Characterization of donor-specific anti-HLA antibodies

2.2.1. Transplant monitoring

All enrolled patients were prospectively tested for donor-specific anti-HLA antibodies using the commercially available Luminex®-based Single Antigen Beads (SAB) kit (LABScreen®, One Lambda, Inc.) per the manufacturer's protocol, and analyzed with HLA Fusion™ software (One Lambda Inc.). The cut-off for positive reactions was determined by a normalized mean fluorescence intensity (MFI) value greater than 500 [14].

2.2.2. Detection of C1q-binding antibodies

Samples that were deemed to be positive for DSA with the SAB-IgG kit were then retrospectively tested using the commercially available SAB-C1q kit (C1qScreen™, One Lambda, Inc.). Data were analyzed using the normalized MFI values, and the positivity was determined as described by Tyan et al. [15].

2.3. Statistical analysis

For statistical analysis, the patients were divided into groups according to the presence or absence of DSA in the pre- versus post-transplant period, and those with a DSA-positive result were further subdivided according to the presence and absence of C1q-positive DSA in the pre- and post-transplant period. Information of *de novo* DSA generation was not considered in the present analysis.

Comparison of patient and donor characteristics between groups according to sensitization status was performed with the chi-squared test for discrete variables and with analysis of variance (ANOVA) or the Kruskal-Wallis test, as applicable, for quantitative variables. Survival was analyzed from the time of transplantation to a maximum of 5 years using kidney allograft loss as the event of interest. Survival rates were plotted on Kaplan-Meier curves and compared according to the presence of anti-HLA DSA and C1q-binding status in the pre- and post-transplantation period using the log-rank test. We applied repeated-measures ANOVA to evaluate the variance in eGFR_{MDRD} over time post-transplant according to the presence of DSA and C1q-binding DSA. All statistical analyses were performed using MedCalc for Windows, version 13.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Clinical and demographic characteristics of the study population

We identified DSA in 24 (57%) of the 42 living donor kidney transplant recipients evaluated. Among those patients, 17 (40%) had pre-formed DSA and 8 (19%) formed DSA after the transplantation. We prospectively tested 333 samples for the presence of DSA, 157 of which were reactive and thus further retrospectively tested for C1q (17 pre- and 140 post-transplantation). Among the 24 patients with DSA, C1q-binding was detected in seven patients. In three patients, C1q-binding DSA was detected pre-transplant, two of which showed persistent DSA post-transplant. Four patients showed C1q-binding DSA post-transplant only, two of which had pre-existing DSA with negative C1q, and the other two developed *de novo* DSA and *de novo* C1q (Figure 1).

Clinical, immunological, and histological characteristics were evaluated according to the sensitization status and ability to bind C1q at the pre- and post-transplant period for each patient. There were no significant differences between the groups with respect to gender, age, previous sensitization, pre-transplant induction, and comorbidities such as diabetes and hypertension. ABMR and allograft loss were more frequent in patients with C1q-binding DSA compared to the non-complement-binding DSA group and no-DSA group ($p < 0.0001$, Table 1).

3.2. Allograft survival

To assess differences in kidney allograft survival, we evaluated the presence of DSA pre- and post-transplantation among the groups according to their capacity to bind to C1q. There was no significant difference in kidney allograft survival between patients with and without DSA in either the pre- or post-transplant period (pre-transplant $p = 0.58$; post-transplant $p = 0.83$). There was no impact of the presence of C1q-binding antibodies in the pre-transplant on allograft survival ($p = 0.80$), whereas patients that developed C1q-binding antibodies after transplantation showed a significantly worse allograft survival rate ($p = 0.042$, Figure 2).

3.3. Correlation of DSA C1q reactivity with kidney allograft function over time

The presence of non-complement-binding DSA did not significantly affect the $eGFR_{MDRD}$ over time post-transplant for patients without DSA. Conversely, patients with C1q-binding DSA showed a significant reduction in the $eGFR_{MDRD}$ over time (Table 1).

4. DISCUSSION

In this study, we evaluated the impact of monitoring C1q-binding DSA on allograft function and survival after living donor kidney transplantation. Our key findings were as follows: (i) positivity for C1q-binding DSA in pre-transplant serum was not a significant predictor for reduction in allograft survival; (ii) the presence of C1q-binding DSA post-transplantation correlated with diminished allograft function and lower allograft survival; (iii) heterogeneity was evident in the pattern of the appearance of C1q-positivity among the patients included in this study.

Cell-based complement-dependent cytotoxicity assays have been successfully used for almost 50 years to avoid hyperacute allograft rejection[7]; however, acute rejection due to anti-HLA antibodies remains one of the main causes of allograft loss [5, 16, 17]. In our cohort, all patients were transplanted with a live donor kidney allograft, and a negative T and B cell CDC-AHG cross-match was required. Only three patients presented C1q-binding DSA prior to transplant, although the presence of these antibodies was not correlated with a decrease in allograft survival post-transplant. Our findings are in accordance with previous studies showing that the presence of C1q-binding DSA in pre-transplant sera was not a predictor of allograft loss [13, 18, 19]. However, Yabu et al. [20] reported that kidney recipients with reactive C1q-fixing DSA pre-transplantation experienced more frequent acute rejection and transplant glomerulopathy. Moreover, Malheiro et al. [21] demonstrated that preformed DSA C1q-binding was a risk factor for ABMR, thereby providing valuable information in the pre-transplant setting.

We further demonstrated that development of the ability to bind to C1q detected at any point in time after transplantation compared to non-complement-binding DSA was highly informative for predicting the risk of allograft dysfunction and allograft loss. Patients with C1q-binding DSA presented a significantly lower $eGFR_{MDRD}$ over time after transplantation, which was most likely related to the higher rate of rejection in this group. Similarly, Loupy et al. [13] followed up 1,016 kidney allograft recipients by testing for C1q-binding DSA prior to transplantation and at one year after the transplant or at the time of

rejection. They found that patients with C1q-binding DSA presented a significantly lower 5-year graft survival rate when compared to those with non-C1q-binding DSA and non-sensitized patients. Moreover, in a related study, pediatric kidney recipients with *de novo* C1q-binding DSA reactivity had higher rates of rejection and an increased risk of allograft loss [22].

In our cohort, seven patients presented C1q-binding antibodies, and four of these patients exhibited biopsy-proven rejection. Thus, the detrimental antibodies appeared prior to the biopsy. In addition, the ability to bind to a complement may change at any point after transplantation due to a switch of the antibody isotype. Because of this dynamic property, we believe that only a test of sequential samples can precisely identify patients that are at high risk for allograft loss, thereby providing physicians with a more accurate perspective of the reality of the transplant outcome. In a review of the literature, Lefaucheur et al. [1] highlighted relevant associations between the DSA subclass and ability to bind C1q to histologic phenotypes of antibody-mediated injury in kidney transplant. In a population study, Viglietti et al. [2] demonstrated that standardized monitoring of circulating DSA improves the risk stratification for allograft loss, and when information of IgG3 status or C1q-binding status was included, the individual risk evaluation for allograft loss increased for 60% of the patients included in the study. Moreover, using a similar study design, Calp-Inal et al. [23] found that complement-binding DSA could be detected in the sera of renal transplant recipients many years after transplantation and was strongly associated with both acute and chronic ABMR as well as transplant glomerulopathy. The authors thus concluded that long-term monitoring is necessary to accurately identify patients at risk and facilitate the early detection of chronic ABMR and/or transplant glomerulopathy. The Terasaki group [24] reviewed data on post-transplant HLA antibodies, and concluded that the time to first antibodies detection differs vastly among patients. In addition, they found that some allografts appear to be more readily and rapidly damaged by antibodies than others; therefore, they suggested adopting a policy of monitoring for antibody development at 3, 6, 9, and 12 months after transplantation, and then biannually thereafter so as to enable treatment of persistent antibodies upon early and first detection. They stated that this would be the only effective way to achieve a significant improvement in the long-term allograft survival rate.

This study has some limitations. Although we were able to follow up patients for 5 years after transplantation for C1q-binding DSA the group studied was small. Moreover, we were not able to match LABScreen® lots for DSA and C1q-detection since DSA evaluation was done prospectively, because of that we could not evaluate MFI values.

In conclusion, in our cohort, the presence of C1q-binding DSA during post-transplant monitoring appeared to be more informative in patient risk stratification than pre-transplant evaluation. Further detailed studies are needed to determine the impact of therapies against C1q-binding DSA in avoiding allograft loss. Overall, our work demonstrates that post-transplant monitoring for DSA, including C1q-binding detection, can be a useful tool to help guide immunosuppression regimens toward safer levels in low-risk patients while also identifying those at greater risk for allograft loss.

REFERENCES

- [1] Lefaucheur C, Viglietti D, Mangiola M, Loupy A, Zeevi A. From humoral theory to performant risk stratification in kidney transplantation. *J Immunol Res*. 2017;2017: 5201098.
- [2] Viglietti D, Loupy A, Vernerey D, Bentelejewski C, Gosset C, Aubert O, et al. Value of donor-specific anti-HLA antibody monitoring and characterization for risk stratification of kidney allograft loss. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28:702–15.
- [3] Aubert O, Loupy A, Hidalgo L, Duong van Huyen J-P, Higgins S, Viglietti D, et al. Antibody-mediated rejection due to preexisting versus de novo donor-specific antibodies in kidney allograft recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28:1912–23.
- [4] Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:807–17.
- [5] Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, Duong-Van-Huyen JP, Suberbielle C, Anglicheau D, et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: A population-based study. *Lancet*. 2013;381:313–9.
- [6] Bingaman AW, Wright Jr. FH, Kapturczak M, Shen L, Vick S, Murphey CL. Single-center kidney paired donation: the Methodist San Antonio experience. *Am J Transplant*. 2012;12:2125–32.
- [7] Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969;280:735–9.
- [8] Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol*. 1991;86:464–70.
- [9] Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Williams WW, Tolkoff-Rubin N, et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:2208–14.
- [10] Hönger G, Hopfer H, Arnold M-L, Spriewald BM, Schaub S, Amico P. Pretransplant IgG subclasses of donor-specific human leukocyte antigen antibodies and development of antibody-mediated rejection. *Transplantation*. 2011;92:41–7.
- [11] Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen J-P, Vernerey D, Aubert O, et al. IgG donor-specific anti-human HLA antibody subclasses and kidney allograft antibody-mediated injury. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27:293–304.

- [12] Speth C, Prodinge WM, Wurznere R, Stoiber H, Dierich MP: Complement. In: *Fundamental Immunology*, 6th ed., edited by Paul WE, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2008, pp 1047-78.
- [13] Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen J-P, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med*. 2013;369:1215–26.
- [14] Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *Am Soc Nephrol*. 2010;8:1398-406.
- [15] Tyan DB, Chen G. Technical foundation of the C1q assay and its clinical significance for Transplant Outcomes. 2013;24–9.
- [16] Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant*. 2012;12:388–99.
- [17] Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant*. 2004;4:438–43.
- [18] Thammanichanond D, Wiwattanathum P, Mongkolsuk T, Kantachuvesiri S, Worawichawong S, Vallipakorn SA, et al. Role of pretransplant complement-fixing donor-specific antibodies identified by C1q assay in kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2016;48:756–60.
- [19] Crespo M, Torio A, Mas V, Redondo D, Pérez-Sáez MJ, Mir M, et al. Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: Does C1q-fixation matter? *Transpl Immunol*. 2013;29:28–33.
- [20] Yabu JM, Higgins JP, Chen G, Sequeira F, Busque S, Tyan DB. C1q-fixing human leukocyte antigen antibodies are specific for predicting transplant glomerulopathy and late graft failure after kidney transplantation. *Transplantation*. 2011;91:342–7.
- [21] Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins LS, Fonseca I, Beirão I, et al. Determining donor-specific antibodies C1q-binding ability improves the prediction of antibody-mediated rejection in HLA-incompatible kidney transplantation. *Transpl Int*. 2017;30:344–6.
- [22] Sutherland SM, Chen G, Sequeira FA, Lou CD, Alexander SR, Tyan DB. Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatr Transplant*. 2012;16:12–7.
- [23] Calp-Inal S, Ajaimy M, Melamed ML, Savchik C, Masiakos P, Colovai A, et al. The

prevalence and clinical significance of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies early and late after kidney transplantation. *Kidney Int.* 2016;89:209–16.

- [24] Everly MJ, Terasaki PI. Monitoring and treating posttransplant human leukocyte antigen antibodies. *Hum Immunol.* 2009;70:655–9.

Figures

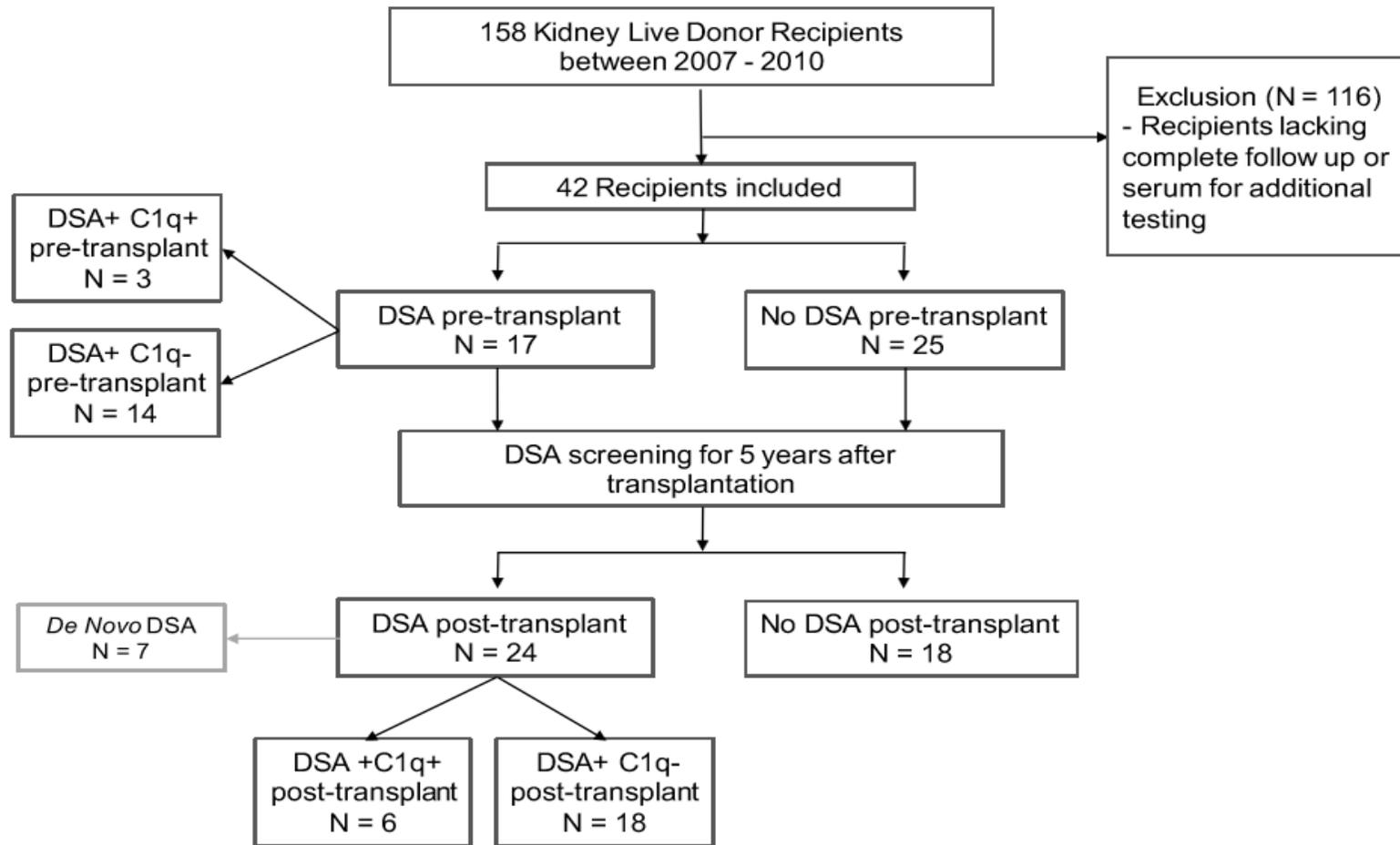


Figure 1. Study Population.

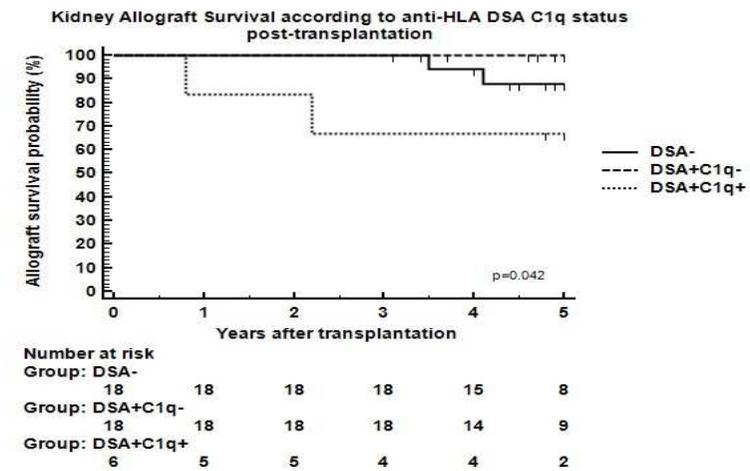
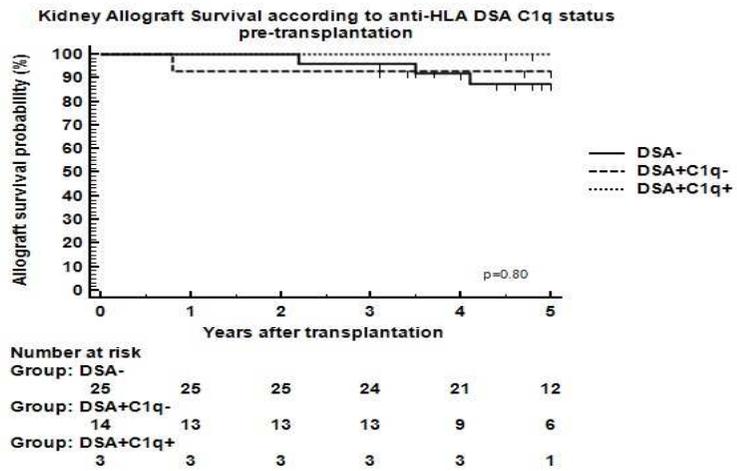
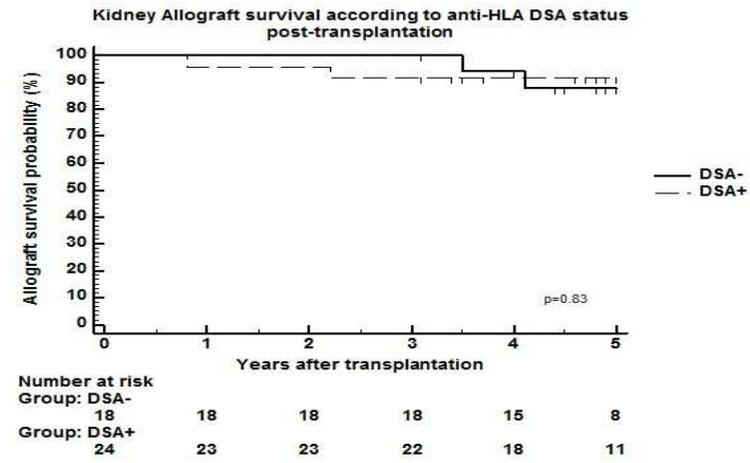
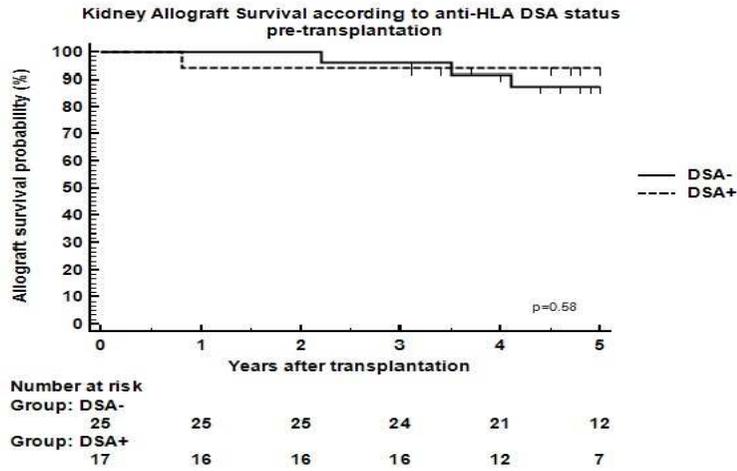


Figure 2. Kaplan-Meier curves for kidney allograft survival according to donor specific anti-HLA complement-binding antibody status (DSA+, C1q+) pre- and post-transplantation.

Table 1. Demographic characteristics of the study population according to the presence of donor-specific anti-HLA antibody and its ability to bind C1q in a pre-transplant and post-transplant setting.

Characteristics		All patients (N = 42)	DSA pre-transplant				p value	DSA post-transplant ⁺			p value
			DSA- (N = 25)	DSA+		DSA- (N = 18)		DSA+			
				C1q- (N = 14)	C1q+ (N = 3)			C1q- (N = 18)	C1q+ (N = 6)		
Female	no. (%)	23 (54.8)	11 (44.0)	10 (71.4)	2 (66.7)	0.23	10 (55.6)	9 (50.0)	4 (66.7)	0.77	
Age (years)	mean ± SD	42.7 ± 12.0	40.5 ± 12.5	44.6 ± 10.6	51.7 ± 13.3	0.24	42.7 ± 12.9	41.1 ± 10.7	47.2 ± 14.4	0.58	
Transplant type											
Live unrelated	no. (%)	17 (40.5)	9 (36.0)	7 (50.0)	1 (33.3)	0.67	5 (27.8)	8 (44.4)	4 (66.7)	0.22	
Live related	no. (%)	25 (59.5)	16 (64.0)	7 (50.0)	2 (66.7)		13 (72.2)	10 (55.6)	2 (33.3)		
Previous Sensitization											
Transfusions	median (min-max)	1 (0-10)	0 (0-9)	2 (0-10)	2 (0-6)	0.26	1.5 (0-9)	1 (0-10)	1 (0-6)	0.99	
Pregnancies (females only N=23)	median (min-max)	2 (0-19)	2 (0-11)	2 (0-19)	6 (3-9)	0.38	2 (0-11)	2 (0-19)	3 (2-9)	0.51	
Regrafts	no. (%)	4 (9.5)	1 (4.0)	3 (21.4)	0	0.74	1 (5.6)	3 (16.7)	0	0.36	
HLA Compatibility											
No. Mismatches	median (min-max)	4 (0-6)	3 (0-6)	4 (2-6)	5 (3-5)	0.58	2.5 (0-6)	4.5 (2-6)	4.5 (3-6)	0.05	
PRA (%)	mean ± SD	46.4 ± 41.1	24.7 ± 36.5	75.9 ± 20.9	79.5 ± 30.8	<0.001	35.5 ± 40.8	55.6 ± 39.3	55.9 ± 48.0	0.30	
DSA post-transplant monitoring time (days)	median (min-max)	739 (21-1871)	736 (26-1871)	736 (208-1852)	761 (21-1432)	0.79	742.5 (26-1871)	739 (187-1852)	716 (21-1717)	0.94	
Clinical Events											
Dialysis time (days)	median (min-max)	730 (0-4380)	539 (0-3650)	791 (183-3285)	1521 (1278-4380)	0.08	634 (0-3650)	730 (0-3650)	1065 (153-4380)	0.53	
Diabetes	no. (%)	6 (14.3)	5 (20.0)	1 (7.1)	0	0.41	5 (27.8)	1 (5.6)	0	0.09	
Hypertension	no. (%)	30 (71.4)	18 (72.0)	9 (64.3)	3 (100.0)	0.46	14 (77.8)	12 (66.7)	4 (66.7)	0.73	
Induction	no. (%)	19 (47.5)	8 (33.3)	10 (76.9)	1 (33.3)	0.04	6 (35.3)	11 (64.7)	2 (33.3)	0.17	
Thymoglobulin	no. (%)	11 (26.2)	3 (12.0)	7 (50.0)	1 (33.3)	0.14	3 (16.7)	6 (33.3)	2 (33.3)	0.71	
anti-IL2mAb	no. (%)	3 (7.1)	3 (12.0)	0	0		1 (5.6)	2 (11.1)	0		
Predinizone	no. (%)	4 (9.5)	2 (8.0)	2 (14.3)	0		2 (11.1)	2 (11.1)	0		
Muronab-CD3	no. (%)	1 (2.4)	0	1 (7.1)	0		0	1 (5.6)	0		
Infection	no. (%)	24 (57.1)	14 (56.0)	8 (57.1)	2 (66.7)	0.94	9 (50.0)	10 (55.6)	5 (83.3)	0.35	
Graft loss	no. (%)	4 (9.5)	3 (12.0)	1 (7.1)	0	0.75	2 (11.1)	0	2 (33.3)	0.05	

Kidney Allograft Function *										
eGFR pre-transplant	mean ± SD	6.6 ± 3.8	7.6 ± 4.4	5.4 ± 2.2	4.3 ± 1.5	0.28	7.6 ± 4.9	5.6 ± 2.0	6.7 ± 3.9	0.013
eGFR at 10 days	mean ± SD	48.9 ± 23.3	53.6 ± 21.2	46.9 ± 24.4	19.0 ± 13.9		54.1 ± 23.7	48.1 ± 22.5	35.5 ± 22.0	
eGFR at 30 days	mean ± SD	56.4 ± 19.9	59.8 ± 15.0	52.6 ± 26.1	46.0 ± 24.9		58.7 ± 18.0	57.6 ± 15.9	45.8 ± 33.8	
eGFR at 60 days	mean ± SD	51.9 ± 16.2	52.5 ± 10.9	49.7 ± 24.1	56.3 ± 10.1		54.1 ± 10.3	53.6 ± 15.5	40.2 ± 27.9	
eGFR at 90 days	mean ± SD	53.6 ± 15.9	54.4 ± 12.0	54.9 ± 19.5	41.0 ± 25.9		55.4 ± 13.0	56.6 ± 13.8	39.5 ± 23.6	
eGFR at 180 days	mean ± SD	52.3 ± 15.0	54.8 ± 12.3	49.8 ± 18.3	43.7 ± 21.1		56.3 ± 14.2	52.3 ± 12.5	40.3 ± 20.3	
eGFR at 1 year	mean ± SD	53.6 ± 18.1	54.3 ± 10.9	54.9 ± 27.5	42.0 ± 13.2		54.8 ± 11.2	57.8 ± 19.6	37.3 ± 23.8	
eGFR at 2 years	mean ± SD	59.4 ± 21.6	62.6 ± 19.9	54.6 ± 23.8	55.0 ± 27.5		65.1 ± 15.0	60.8 ± 17.8	38.2 ± 36.0	
eGFR at 3 years	mean ± SD	53.8 ± 22.0	55.0 ± 21.8	53.2 ± 23.8	46.0 ± 20.0		57.3 ± 21.1	57.6 ± 16.4	31.7 ± 29.4	
eGFR at 4 years (N = 37)□	mean ± SD	54.8 ± 27.1	54.1 ± 26.8	57.1 ± 30.7	52.3 ± 23.7		57.3 ± 27.2	61.1 ± 22.3	32.7 ± 29.4	
eGFR at 5 years (N = 22)□	mean ± SD	56.1 ± 27.9	54.6 ± 25.8	64.5 ± 34.0	28		57.6 ± 23.9	69.9 ± 18.4	24.8 ± 33.5	

Histological Characteristics										
ABMR	no.(%)	4 (9.5)	1 (4.0)	2 (14.3)	1 (33.3)	0.2	0	0	4 (66.7)	<0.0001
ACR	no.(%)	9 (21.4)	6 (24.0)	2 (14.3)	1 (33.3)	0.68	3 (16.7)	5 (27.8)	1 (16.7)	0.69
CsA Nephropathy	no.(%)	5 (11.9)	3 (12.0)	2 (14.3)	0	0.78	3 (16.7)	2 (11.1)	0	0.55
BKV Nephropathy	no.(%)	1 (2.4)	0	1 (7.1)	0	0.36	0	1 (5.6)	0	0.51

❖ All DSA that persisted post-transplantation were considered for the analysis; de novo DSA and preexisting DSA were not differentiated. Chi-squared tests were used for comparison of categorical variables and one-way ANOVA was used for the comparison of parametric continuous variables.

Comparison between groups of non-parametric variables was performed by the Kruskal-Wallis method. Non-parametric variables are presented as the median (range). *Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated through the Modification of Diet in Renal Diseases (MDRD) formula and was evaluated by repeated-measures ANOVA. eGFR values measured at 4 and 5 years were not included in the repeated-measures analysis. ABMR, antibody-mediated rejection; ACR, acute cellular rejection; BKV, BK virus; CsA, cyclosporine; DSA, donor-specific

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mais estudos são necessários a fim de avaliar o impacto da detecção de anticorpos específicos contra o doador fixadores de complemento, na perda do enxerto. Na população estudada, observou-se uma heterogeneidade na ocorrência desses anticorpos no pós-transplante dos pacientes, ficando clara a importância do monitoramento dos mesmos, ao longo do tempo do transplante.

A resposta apresentada por um dos pacientes pode indicar que a resposta humoral evolui durante o tempo a partir de uma ativação do sistema imune gerando as lesões características de rejeição que levam a perda do enxerto. A definição de tempo e mecanismos associados a produção de anticorpos fixadores de complemento podem ajudar na elaboração de protocolos mais eficazes de tratamento e de seguimento de pacientes transplantados renais. Nada se tem descrito em relação aos resultados do teste SAB-C1q serem preditivos em tempo suficiente de se evitar o dano desses anticorpos ao enxerto. Mais uma vez acreditamos que, mesmo o teste SAB-C1q sendo mais específico com relação aos anticorpos detectados, ele só tem valor na clínica do transplante se for utilizado em períodos pré-determinados no monitoramento pós-transplante.

A população estudada também apresentou altas taxas de infecção, sendo esta a maior causa de óbito dos pacientes. Uma vez que o monitoramento ao longo do tempo do transplante pode ajudar na definição de protocolos de imunossupressão diferenciados, principalmente para pacientes de baixo risco, isso também pode contribuir de maneira indireta na diminuição das taxas de infecção destes pacientes.

7. CONCLUSÃO

As principais conclusões que foram obtidas com este estudo foram:

1. A positividade para anticorpos contra o doador fixadores de complemento, presentes no soro pré-transplante, não foi um preditor para a redução da sobrevida do enxerto;
2. A presença de anticorpos contra o doador fixadores de complemento no pós-transplante foi correlacionada com diminuição da função renal e com uma menor sobrevida do enxerto;
3. O tempo de aparecimento de anticorpos contra o doador fixadores de complemento após o transplante é heterogeneo.

8. REFERÊNCIAS

AUBERT, V. et al. Low levels of human leukocyte antigen donor-specific antibodies detected by solid phase assay before transplantation are frequently clinically irrelevant. **Human Immunology**, v. 70, p. 580–583, 2009.

BALDWIN, W. M. et al. Beyond C4d: Other Complement-Related Diagnostic Approaches to Antibody-Mediated Rejection. **American Journal of Transplantation**, v. 4, n. 3, p. 311–318, mar. 2004.

BALDWIN, W. M.; LARSEN, C. P.; FAIRCHILD, R. L. Innate Immune Responses to Transplants. **Immunity**, v. 14, n. 4, p. 369–376, abr. 2001.

BALDWIN, W. M.; OTA, H.; RODRIGUEZ, E. R. Complement in transplant rejection: Diagnostic and mechanistic considerations. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 25, p. 181–197, 2003.

BINDON, C. I. et al. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. **The Journal of experimental medicine**, v. 168, p. 127–142, 1988.

BRAY, R. A.; LEBECK, L. K.; GEBEL, H. M. The flow cytometric crossmatch. Dual-color analysis of T cell and B cell reactivities. **Transplantation**, v. 48, p. 834–840, 1989.

BRÜGGEMANN, M. et al. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. **The Journal of experimental medicine**, v. 166, p. 1351–1361, 1987.

CHANG, A. T.; PLATT, J. L. The role of antibodies in transplantation. **Transplantation Reviews**, v. 23, p. 191–198, 2009.

COLVIN, R. B.; SMITH, R. N. Antibody-mediated organ-allograft rejection. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, p. 807–817, 2005.

DANGL, J. L. et al. Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse antibodies. **The EMBO journal**, v. 7, p. 1989–1994, 1988.

DONADI, E. A. Como Entender a Nomenclatura E Os Mecanismos De Associação Entre Os Antígenos E Os Alelos De. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP**, v. 33, n. 1, p. 7–18, 2000.

FREITAS, M. C. S. et al. The role of immunoglobulin-G subclasses and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody kidney transplantation outcomes. **Transplantation**, v. 95, p. 1113–9, 2013.

GIBNEY, E. M. et al. Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: Another tool for kidney transplant risk stratification. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, p. 2625–2629, 2006.

GLOOR, J. et al. The Spectrum of Antibody-Mediated Renal Allograft Injury: Implications for Treatment. **American Journal of Transplantation**, v. 8, n. 7, p. 1367–1373, jul. 2008.

GUPTA, A.; SINNOTT, P. Clinical relevance of pretransplant human leukocyte antigen donor-specific antibodies in renal patients waiting for a transplant: A risk factor. **Human Immunology**, v. 70, p. 618–622, 2009.

HEEGER, P. S.; KEMPER, C. Novel roles of complement in T effector cell regulation. **Immunobiology**, v. 217, n. 2, p. 216–224, fev. 2012.

HEINEMANN, F. M. et al. Immunoglobulin isotype-specific characterization of anti-human leukocyte antigen antibodies eluted from explanted renal allografts. **Human Immunology**, v. 68, p.

500–506, 2007.

HERRERA, O. B. et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, p. 4828–4837, 2004.

HÖNGER, G. et al. C4d-fixing capability of low-level donor-specific HLA antibodies is not predictive for early antibody-mediated rejection. **Transplantation**, v. 89, p. 1471–1475, 2010.

HORNICK, P. Direct and indirect allorecognition. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 333, p. 145–156, 2006.

HOWELL, W. M.; CARTER, V.; CLARK, B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. **Journal of clinical pathology**, v. 63, p. 387–390, 2010.

JIN, Y.-P. et al. Anti-HLA class I antibodies activate endothelial cells and promote chronic rejection. **Transplantation**, v. 79, p. S19–S21, 2005.

LOBASHEVSKY, A. et al. Subtypes of immunoglobulin (Ig)-G antibodies against donor class II HLA and cross-match results in three kidney transplant candidates. **Transplant Immunology**, v. 23, p. 81–85, 2010.

LOUPY, A. et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. **The New England journal of medicine**, v. 369, p. 1215–26, 2013.

MINAMI, K. et al. C4d deposition and clearance in cardiac transplants correlates with alloantibody levels and rejection in rats. **American Journal of Transplantation**, v. 6, p. 923–932, 2006.

MIZUTANI, K. et al. Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. **American Journal of Transplantation**, v. 5, p. 2265–2272, 2005.

MORRELL, C. N. et al. In vivo platelet-endothelial cell interactions in response to major histocompatibility complex alloantibody. **Circulation Research**, v. 102, p. 777–785, 2008.

PEI, R. et al. Simultaneous HLA class I and class II antibodies screening with flow cytometry. **Human Immunology**, v. 59, p. 313–322, 1998.

PEI, R. et al. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. **Human Immunology**, v. 60, p. 1293–1302, 1999.

PHELAN, D. et al. Living donor renal transplantation in the presence of donor-specific human leukocyte antigen antibody detected by solid-phase assay. **Human Immunology**, v. 70, p. 584–588, 2009.

REGELE, H.; BÖHMIG, G. A. Tissue injury and repair in allografts: novel perspectives. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 12, p. 259–266, 2003.

RODRIGUEZ, E. R. et al. Antibody-mediated rejection in human cardiac allografts: Evaluation of immunoglobulins and complement activation products C4d and C3d as markers. **American Journal of Transplantation**, v. 5, p. 2778–2785, 2005.

ROELEN, D. L.; DOXIADIS, I. I. N.; CLAAS, F. H. J. Detection and clinical relevance of donor specific HLA antibodies: a matter of debate. **Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation**, v. 25, n. 6, p. 604–10, jun. 2012.

SERINSOZ, E. et al. Local complement C3 expression is upregulated in humoral and cellular rejection of renal allografts. **Am.J.Transplant.**, v. 5, p. 1490–1494, 2005.

SIS, B.; HALLORAN, P. F. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. **Current opinion in organ transplantation**, v. 15, p. 42–

48, 2010.

SMITH, J. D. et al. C4d fixing, luminex binding antibodies - A new tool for prediction of graft failure after heart transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 7, p. 2809–2815, 2007.

SMITH, R. N. et al. C4d deposition in cardiac allografts correlates with alloantibody. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 24, p. 1202–1210, 2005.

SMITH, R. N. et al. Chronic antibody mediated rejection of renal allografts: Pathological, serological and immunologic features in nonhuman primates. **American Journal of Transplantation**, v. 6, p. 1790–1798, 2006.

STASTNY, P. et al. Role of immunoglobulin (Ig)-G and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients. **Human Immunology**, v. 70, p. 600–604, 2009.

TAIT, B. D. et al. Consensus Guidelines on the Testing and Clinical Management Issues Associated With HLA and Non-HLA Antibodies in Transplantation. **Transplantation**, v. 95, n. 1, p. 1–29, 2012.

TERASAKI, P. I.; CAI, J. **Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation.** **Transplantation**, 2008.

THOMAS, K. A.; VALENZUELA, N. M.; REED, E. F. The perfect storm: HLA antibodies, complement, FcγRs, and endothelium in transplant rejection. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 5, p. 319–329, 2015.

THORSBY, E. A short history of HLA. **Tissue Antigens**, v. 74, n. 2, p. 101–116, ago. 2009.

TYAN, D. B.; CHEN, G. Technical Foundation of the C1q Assay and its Clinical Significance for Transplant Outcomes. p. 24–29, 2013.

UEHARA, S. et al. Chronic cardiac transplant arteriopathy in mice: Relationship of alloantibody, C4d deposition and neointimal fibrosis. **American Journal of Transplantation**, v. 7, p. 57–65, 2007.

VALUJSKIKH, A.; HEEGER, P. S. Emerging roles of endothelial cells in transplant rejection. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, n. 5, p. 493–498, out. 2003.

VAN DEN BERG-LOONEN, E. M. et al. Clinical relevance of pretransplant donor-directed antibodies detected by single antigen beads in highly sensitized renal transplant patients. **Transplantation**, v. 85, p. 1086–1090, 2008.

VIGLIETTI, D. et al. Value of Donor-Specific Anti-HLA Antibody Monitoring and Characterization for Risk Stratification of Kidney Allograft Loss. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 2, p. 702–715, 2017.

VLAD, G. et al. Relevance of different antibody detection methods for the prediction of antibody-mediated rejection and deceased-donor kidney allograft survival. **Human Immunology**, v. 70, p. 589–594, 2009.

WAHRMANN, M. et al. Flow cytometry based detection of HLA alloantibody mediated classical complement activation. **Journal of Immunological Methods**, v. 275, p. 149–160, 2003.

WALPORT, M. J. Complement-first of two parts. **The New England journal of medicine**, v. 344, p. 1058–1066, 2001a.

WALPORT, M. J. Complement. Second of two parts. **The New England journal of medicine**, v. 344, p. 1140–1144, 2001b.

WEHNER, J. et al. Antibody and Complement in Transplant Vasculopathy. **Circulation Research**, v. 100, n. 2, p. 191–203, 2 fev. 2007.

WOOD, K. J.; GOTO, R. Mechanisms of Rejection: Current Perspectives. **Transplantation**, v. 93, n. 1, p. 1, 2012.

WORTHINGTON, J. E. et al. A novel strategy for the detection and definition of HLA-specific antibodies in patients awaiting renal transplantation. **Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation**, v. 11 Suppl 1, p. S372–S376, 1998.

YABU, J. M. et al. C1q-fixing human leukocyte antigen antibodies are specific for predicting transplant glomerulopathy and late graft failure after kidney transplantation. **Transplantation**, v. 91, p. 342–347, 2011.

9. ANEXO

1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado por pacientes e doadores no momento da coleta da amostra biológica para realização dos exames de histocompatibilidade requeridos pelo médico responsável.
2. Gráfico informativo relacionado ao monitoramento dos pacientes com presença de anticorpos fixadores de C1q no pós transplante.

IMPORTANTE

1. A coleta de sangue pode causar um pouco de dor, podendo gerar um hematoma subcutâneo, que desaparece em alguns dias, sem deixar marcas. Para evitar a formação de hematoma, aperte com firmeza o local da punção por alguns minutos, não dobre o braço e procure não realizar esforços físicos (inclusive carregar bolsas ou sacolas) com o braço onde foi realizada a punção por, aproximadamente, 10 minutos;
2. Em alguns casos o material, colhido no Laboratório, pode ser insuficiente, sofrer alterações que prejudiquem certos exames. Nestas situações, haverá necessidade de nova coleta;
3. Todo exame laboratorial deve ser interpretado a partir de dados clínicos e epidemiológicos e, em caso de divergências, confirmações serão necessárias, pois os exames laboratoriais estão sujeitos a variações decorrentes tanto dos métodos utilizados quanto das condições em que o paciente se encontra por ocasião da coleta da amostra (principalmente alimentação, utilização de medicamentos e estágio de evolução das doenças, etc.);
4. Os exames realizados sem requisição ou com a mesma incompleta só serão entregues seus resultados após o recebimento da requisição devidamente preenchida.
5. Os prazos de entrega dos resultados estão sujeitos a imprevistos de ordem técnica, de atraso no fornecimento de reagentes importados e outros.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu _____ RG _____
,autorizo o uso dos resultados dos exames de histocompatibilidade sorológicos e biologia molecular realizado no laboratório de Imunogenética do Hospital Universitário Cajuru para estudos com o objetivo de identificação de genes e proteínas que possam estar envolvidos direta ou indiretamente nos processos imunológicos que possam elevar à rejeição de órgãos transplantados, bem como de suas frequências fenotípicas, alélicas e gênicas.

Declaro ter sido esclarecido a respeito dos objetivos da pesquisa e sigilo a respeito dos meus dados pessoais ter recebido informações referente a coleta e resultados de exames.

Curitiba, _____ de _____ de 2006.

(Assinatura)



Evolução da intensidade média de fluorescência dos anticorpos específicos contra o doador (DSA) no pós-transplante, pontos nos quais foram detectados anticorpos fixadores de complemento, pontos onde foi diagnosticada rejeição mediada por anticorpos (ABMR) e rejeição celular aguda (ACR) e tempo de perda do enxerto, para os seis pacientes com positividade para C1q em qualquer ponto de monitoramento pós-transplante. * Positividade-C1q; 1.Biópsias com lesões de ABMR; 2.Biópsias com lesões de ACR; 3. Perda de enxerto.

