



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

RENATA VON GLEHN PONSIRENAS

**AVALIAÇÃO DA RELEVÂNCIA CLÍNICA DE ALOANTICORPOS ANTI-HLA
DETECTADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO EM PACIENTES
TRANSPLANTADOS RENAIIS**

CURITIBA
SETEMBRO/2018

RENATA VON GLEHN PONSIRENAS

**AVALIAÇÃO DA RELEVÂNCIA CLÍNICA DE ALOANTICORPOS ANTI-HLA
DETECTADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO EM PACIENTES
TRANSPLANTADOS RENAIIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadoras:
Prof^a. Dr^a. Vanessa S. Sotomaior
Prof^a. Dr^a. Michelle F. Susin

**CURITIBA
SETEMBRO/2018**



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - *Stricto Sensu*

PUCPR
GRUPO MARISTA

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

Aos doze dias do mês de dezembro de 2014, realizou-se a sessão pública de defesa de tese provisório: "AVALIAÇÃO DA RELEVÂNCIA CLÍNICA DE ALOANTICORPOS DETECTADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO EM PACIENTES RENAIIS" apresentada por RENATA VON GLEHN PONSIRENAS, para obtenção do título de doutora; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Vanessa Santa Sotomaior (PUCPR) - Presidente	
Prof. Dr. Miguel Carlos Riella (PUCPR)	
Profa. Dra. Andrea Novais Moreno (PUCPR)	
Profa. Dra. Maria Cristina Ribeiro Castro (USP)	
Profa. Dra. Alexandra Senegaglia (PUCPR/HC-UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior (PUCPR) - Presidente Parecer: Aprovada
 Prof. Dr. Miguel Carlos Riella (PUCPR) Parecer: Aprovado
 Profa. Dra. Andrea Novais Moreno (PUCPR) Parecer: APROVADA
 Profa. Dra. Maria Cristina Ribeiro Castro (USP) Parecer: Aprovada
 Profa. Dra. Alexandra Senegaglia (PUCPR/HC-UFPR) Parecer: Aprovada
Parecer Final: Aprovada

Observações da Banca Examinadora:

A banca concluiu o texto relevante e atual e sugeriu que os obs de banca fossem incorporados a tese e os trabalhos a publicar.

Profa. Dra. Vanessa Santa Sotomaior
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e chefe Cristina von Glehn pelo exemplo de vida, pelo incentivo financeiro e pela ideia inicial do projeto.

À Professora Michelle F. Susin pela orientação, pelo empenho e pelo apoio durante a execução do trabalho.

À Professora Vanessa Santos Sotomaior que assumiu o desafio de orientar um projeto novo, fora de sua linha de pesquisa.

À toda equipe do Laboratório de Imunologia de Transplante do Hospital Universitário Cajuru, especialmente Ana Luísa Ponsirenas e Carlos Fernandes Alves, pela ajuda na aquisição de material e todo suporte financeiro do estudo, Liliane Nascimento, Carolina Kneib, Karin Razzini, Fernanda Cazarote e Taiana Bertozzi pela ajuda no desenvolvimento da técnica e coleta de dados.

À equipe de pesquisa do Laboratório de Imunologia de Transplante do HUC, Helena Cazarote e Joana Valdameri pela parceria no desenvolvimento do estudo e Heloisa Salomão e Paula Gimenes pela ajuda na realização dos testes práticos.

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 e por me ensinar como aplicar o modelo, além de paciência em discutir os dados obtidos.

À Professora Maria Fernanda Soares que esclareceu dúvidas de biópsias e ainda realizou a revisão de resultados.

Ao Professor Miguel Riella pelo esclarecimento de dúvidas nas questões clínicas e sugestões de análise.

A Hugo Kaneku, pesquisador da University of California e Terasaki Foundation na elaboração dos protocolos de detecção de subclasses de IgG.

A Hal Gibson pela ajuda na elaboração dos artigos e revisão da língua inglesa.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGH – anti-globulina humana

CAM – complexo de ataque à membrana

CDC – citotoxicidade dependente de complemento

Cr - *Creatinine*

DRC – Doença Renal Crônica

DSA – *Donor-Specific Antibodies*

DTT – dithiothreitol

ENDTAs – *Endothelial-associated Transcripts*

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

eTFG (eGFR) – taxa de filtração glomerular estimada (*estimated Glomerular Function Rate*)

HLA – *Human Leucocyte Antigens*

IC – imunocomplexos

IFTA – Fibrose Intersticial e Atrofia Tubular

Ig – imunoglobulina

IRC – Insuficiência Renal Crônica

KDIGO - *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*

MBP – proteína ligadora de manose

MCP – proteína cofator de membrana

MDRD - *Modification of Diet in Renal Disease*

MFI – *Mean Fluorescence Intensity*

NC – soro controle negativo

PC – Prova Cruzada

PE – Phicoeritrin

RMA (AMR) – rejeição mediada por anticorpos (*Antibody Mediated Reajection*)

ROC – *Receiver Operator Curve*

RR – risco relativo

SAB – *Single Antigen Beads*

TG – Glomerulopatia do Transplante

TM – trombomodulina

LISTA DE TABELAS

- **TABELA 1** - Definição dos estágios de Doença Crônica Renal baseada na estimativa da TFG.
- **TABELA 2** - Estratificação de risco para pacientes com DSA pré-transplante de acordo com os padrões de RMA.
- **TABELA 3** - Risco Relativo para RMA aguda de acordo com o valor de MFI por SAB.

LISTA DE FIGURAS

- **FIGURA 1** - Evolução das técnicas para detecção de anticorpos anti-HLA. PC-CDC - Prova Cruzada por Citotoxicidade Dependente de Complemento; PC-CDC-AGH - Prova Cruzada Citotoxicidade Dependente de Complemento com adição de antiglobulina humana; SAB – Single Antigen Beads. Adaptada de TINCKAM e CHANDRAKER, 2006.
- **FIGURA 2** – Estrutura das subclasses de Imunoglobulina G. A figura destaca as diferenças na região da dobradiça de cada subclasse. As características morfológicas das subclasses de IgG conferem diferentes funcionalidades à cada molécula. Adaptado de <http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials>, acesso outubro de 2014.
- **FIGURA 3** - Vias de ativação do Sistema Complemento. IC: Imunocomplexos (antígeno-Anticorpo); MBP: Proteína ligadora da manose; C3bi: C3b inativado; MCP: Proteína cofator de membrana; TM: Trombomodulina; CAM: Complexo de ataque a membrana; ** Alça de amplificação. Figura adaptada de VAISBICH, 2014.
- **FIGURA 4** - Sequência de estágios de RMA proposto por Colvin RB e Smith RN, Nat. Rev Immunol, 2005, e adaptado por Wiebe C et al., AJT, 2012.
- **FIGURA 5** - História natural da rejeição mediada por anticorpos e seus estágios de progressão de acordo com a presença e desenvolvimento de DSA após o transplante renal. Adaptada de Loupy et al., Nat. Rev. Nephrol., 2012.
- **FIGURA 6** - Modelo temporal de mudança de classe de IgG partindo de uma reação do centro germinal. Adaptada de Collins AM e Jackson KJL, Front. Immunol., 2014.
- **FIGURA 7** - Hipótese. Progresso da Rejeição Mediada por Anticorpos. Adaptada de Colvin RB e Smith RN, Nat. Rev Immunol, 2005, e Wiebe C et al., AJT, 2012.
- **FIGURA 8** – Seleção de pacientes para o estudo. Foram selecionados somente pacientes transplantados com doador vivo no Hospital Evangélico de Curitiba entre os anos de 2007 a 2010. Todos os pacientes incluídos tinham

que ter monitoramento pós-transplante para presença de anti-HLA DSA, um soro ou mais com DSA positivo e amostras de soro disponíveis para os testes adicionais. DSA – anticorpo anti-HLA específico contra o doador.

- **FIGURA 9** - Monitoramento pós-transplante. Foram selecionadas amostras pré e pós-transplante dentro dos períodos determinados.
- **FIGURA 10** - Evolução da resposta humoral após o transplante renal. A. Resultados de detecção de anticorpos anti-HLA por SAB e valores de MFI para IgG total. B. Resultados da detecção de fixação de C1q e valores de MFI. C. Resultados da detecção de subclasses de IgG apresentadas em ratio (MFI/Valor de corte MFI).

RESUMO

A identificação de anticorpos anti-HLA de baixo título pela técnica *Single Antigen Beads* trouxe avanços à avaliação de risco para receptores de enxerto renal. No entanto, o uso da média de intensidade de fluorescência (MFI) não é suficiente para quantificar anticorpos e guiar tratamentos terapêuticos. Hipoteticamente a troca de subclasses de IgG segue uma sequência programada após um sinal de emergência do centro germinal. Ainda não é claro como esse processo ocorre após o transplante. Neste estudo, avaliamos sequencialmente subclasses de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA), as mudanças de perfil e habilidade em fixar C1q desses anticorpos e a influência dessas características na rejeição mediada por anticorpos (ABMR) e diminuição de função do enxerto. Os pacientes desse estudo foram monitorados prospectivamente para presença de DSA. Trinta pacientes positivos para DSA tiveram seus soros testados para definição de subclasses de IgG e habilidade em fixar C1q. Vinte e um pacientes tinham DSA pré-transplante; pacientes sensibilizados por somente transfusões ou gestações tinham apenas IgG1 e/ou IgG3, e pacientes sensibilizados por transfusões e gestações ou transplante prévio apresentavam grupos mais expandidos de subclasses. Fixação de C1q foi detectada na presença de MFI mais elevados contendo IgG1 ou múltiplas subclasses. Quatro pacientes foram positivos para C1q apenas após o transplante, e três desses apresentaram aumento de MFI, mudanças de padrão de subclasses, ABMR e disfunção do enxerto. A avaliação pós-transplante de subclasses de DSA e sua habilidade em fixar C1q pode ser informativo para a ocorrência de ABMR e disfunção do enxerto. A monitorização desses eventos pode ajudar a definir melhor o risco do transplante e pontos de intervenção terapêutica.

Palavras-chave: Anticorpos específicos contra o doador (DSA), fixação de C1q, subclasses de IgG, Rejeição-mediada por anticorpos (RMA), Disfunção de enxerto renal, *Single Antigen Beads* (SAB).

ABSTRACT

The identification of low-level antibodies by single antigen bead methodology has brought advancements to risk evaluation of kidney transplants recipients. However, the use of mean fluorescence intensity values (MFIs) to quantify antibodies and to guide therapy is not enough. IgG subclass switching is hypothesized to follow a programmed sequence after an emergency signal from the germinal center. In transplantation this process is not clear yet. Here, we sequentially evaluate anti-HLA donor specific antibodies (DSA) subclasses, their profile changes, and C1q-binding ability and the influence of those characteristics on antibody mediated rejection (ABMR) occurrence and allograft function. We followed up all patients testing prospectively for DSA. Thirty DSA positive patients were then tested for IgG subclass content of each serum and C1q-binding. Twenty-one patients were DSA positive pre-transplant; patients sensitized by only transfusion or pregnancies had IgG1 and/or IgG3, and patients sensitized by both transfusion and pregnancies or previous transplant showed broader range of IgG subclasses. C1q-binding was detected in high MFI content of IgG1 or multiple IgG subclasses. Four patients were positive for C1q post-transplantation only, and three of those showed increase in MFI, changes in subclasses patterns, ABMR and allograft dysfunction. Post-transplant evaluation of DSA subclasses and ability to bind C1q may be informative for both ABMR occurrence and allograft dysfunction. Monitoring these events may help to better define risk and interventional time points.

Keywords: Donor-specific antibodies (DSA), C1q-binding, IgG-subclass, antibody-mediated rejection (AMR), kidney allograft dysfunction, Single Antigen Beads (SAB).

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. DOENÇA RENAL CRÔNICA E TRANSPLANTE RENAL.....	13
1.2. SENSIBILIZAÇÃO CONTRA ANTÍGENOS HLA.....	14
1.3. TÉCNICAS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA	16
1.4. CLASSES DE IMUNOGLOBULINA E REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS	19
1.5. SISTEMA COMPLEMENTO E REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS.....	22
1.6. EVOLUÇÃO DA REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS NO TRANSPLANTE	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	33
3.1. OBJETIVO GERAL	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. DESENVOLVIMENTO.....	34
4.1. SELEÇÃO DE PACIENTES E MONITORAMENTO PÓS-TRANSPLANTE	34
4.2. CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA.....	36
4.2. 1. IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA O DOADOR.....	36
4.2. 2. IDENTIFICAÇÃO DE SUBCLASSE DE IMUNOGLOBULINA.....	36
4.2.3. DETERMINAÇÃO DA HABILIDADE EM FIXAR C1q PELO ANTICORPO	36
5. ARTIGO	38
5.1. Anti-HLA donor specific IgG-subclasses and C1q-binding evolution in post-transplant monitoring	38
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
7. CONCLUSÕES	82
8. REFERÊNCIAS.....	83
9. ANEXOS	92
9.1. ANEXO I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	92

9.2. ANEXO II – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR para realização do estudo.....	94
--	----

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA E TRANSPLANTE RENAL

De acordo com a Fundação Nacional Americana do Rim cerca de 26 milhões de americanos sofrem com doença renal crônica (DRC) (CORESH et al., 2007). No Brasil, apesar de não existir estudos avaliando a incidência dessa doença na população, o elevado número de pacientes submetidos à terapia de substituição renal, indica alta prevalência da doença (BASTOS; KIRSZTAJN, 2010). A DRC é uma doença silenciosa, portanto de difícil diagnóstico em seus estágios iniciais, sua definição é baseada em três características: 1) evidência de dano renal anatômico ou estrutural; 2) evidência de perda de função renal; e 3) cronicidade. O diagnóstico é principalmente realizado pela estimativa da função renal que pode ser obtida pela estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG), que é calculada a partir do valor de creatinina sérica e pela presença de proteinúria ou albuminúria, marcadores de dano renal (BASTOS; KIRSZTAJN, 2010). A creatinina é um produto do metabolismo do músculo esquelético e seu aumento sérico indica redução de filtração glomerular. As duas principais fórmulas para avaliar a estimativa da TFG são a equação de *Cockcroft-Gault* e a equação simplificada *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD). A equação *Cockcroft-Gault* é amplamente utilizada no contexto clínico, no entanto tem como limitação a ausência de padronização para área de superfície corporal (PECOITS-FILHO, 2004). Já a fórmula simplificada baseada no estudo MDRD, utiliza a combinação do valor da creatinina sérica com a idade, raça e sexo do paciente, em mL/min/1,73m² de superfície corporal, para estimar a TFG (PÖGE et al., 2005). O valor da TFG permite a definição de estágios da DRC (LEVEY et al., 2011). O valor de TFG menor ou igual a 15 mL/min/1,73m² indica perda de função renal e o paciente é indicado para terapia de substituição renal (Tabela 1) (KIDNEY DISEASE: IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO) CKD WORK GROUP, 2013). As terapias de substituição renal consistem em transplante ou diálise.

***TABELA 1.** Definição dos estágios de Doença Crônica Renal baseado na estimativa da TFG

Estágio DRC	Definição
1	Lesão renal, eTFG ≥ 90 mL/min/1,73m ² , proteinúria presente
2	Lesão renal, eTFG $\geq 60-89$ mL/min/1,73m ² , proteinúria presente
3a	eTFG = 30-59 mL/min/1,73m ² , proteinúria presente ou ausente
3b	eTFG = 44-30 mL/min/1,73m ² , proteinúria presente ou ausente
4	eTFG = 15-29 mL/min/1,73m ² , proteinúria presente ou ausente
5	eTFG < 15 mL/min/1,73m ² , proteinúria presente ou ausente. Insuficiência renal tratada por diálise ou transplante

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela diminuição da taxa de filtração glomerular (eTFG) por pelos menos 3 meses consecutivos e presença de dano renal. *Adaptado de KIDNEY DISEASE: IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO) CKD WORK GROUP, 2013.

1.2 SENSIBILIZAÇÃO CONTRA ANTÍGENOS HLA

O transplante renal é o tratamento de preferência por trazer benefícios como longevidade com qualidade de vida aos portadores de insuficiência renal crônica terminal (IRC) apresentando custos mais baixos do que os outros tratamentos (LEE et al., 2005; PORT et al., 1993; WOLFE et al., 1999). No entanto, a escassa população de doadores de órgãos e a sensibilização contra antígenos do sistema HLA (*Human Leucocyte Antigen*) geram um acúmulo de pacientes de alto risco imunológico nas listas de espera por um transplante renal (BINGAMAN et al., 2012; MONTGOMERY et al., 2012a, 2012b). A importância dos antígenos leucocitários humanos para o transplante renal é conhecida desde 1969, quando Patel e Terasaki mostraram a associação entre um resultado positivo de prova cruzada (PC) por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) com a perda imediata de função renal após o transplante (PATEL; TERASAKI, 1969).

Um resultado positivo de PC por CDC indica a presença de anticorpos pré-formados contra antígenos presentes no doador, sendo, portanto, considerado como contraindicação ao transplante renal e podendo levar a uma rejeição hiperaguda (TAKEMOTO et al., 2004). A rejeição hiperaguda se desenvolve minutos ou horas após o transplante e é causada pela pré-sensibilização do paciente por antígenos HLA e outros, sendo mediada geralmente por aloanticorpos e fixação de complemento (COLVIN; SMITH, 2005; WILLIAMS et

al., 1968). A sensibilização contra antígenos HLA ocorre devido a gestações, transfusões sanguíneas e transplantes anteriores (HÖNGER et al., 2013; HYUN et al., 2012; SCORNIK; MEIER-KRIESCHE, 2011).

A aplicação das técnicas de PC para avaliação imunológica prévia ao transplante e avanços nas terapias imunossupressoras praticamente eliminaram a ocorrência de episódios de rejeição hiperaguda (MENGEL et al., 2012). No entanto, episódios de rejeição aguda e crônica ainda são a principal causa de perda de enxerto renal (COLVIN; SMITH, 2005; LOUPY; HILL; JORDAN, 2012). A rejeição aguda se desenvolve rapidamente em poucos dias, ou pode ocorrer dias ou anos após o transplante. Por muitas décadas, as células T foram consideradas como as principais responsáveis pela rejeição aguda do enxerto. Assim, as principais terapias imunossupressoras (ex. inibidores de calcineurina, micofenolato mofetil, rapamicina e prednisona) têm como alvo as funções desse grupo celular. A implementação dessas terapias aumentou a sobrevida do enxerto em curto prazo em aproximadamente 90% (COLVIN; SMITH, 2005; MENGEL et al., 2012).

A utilização de técnicas mais sensíveis e específicas para detecção de anticorpos anti-HLA que não são detectados por técnicas de base celular trouxe a hipótese de que anticorpos em baixo título poderiam estar associados aos casos remanescentes de rejeição. Uma dessas técnicas é a citometria de fluxo em fase sólida. Essa teoria tomou força em 1994, quando Feucht e colaboradores demonstraram o depósito de C4d – um componente do sistema complemento, ativado na via clássica e dependente de lectina – na microvasculatura de enxertos renais, e mais tarde com a demonstração da associação de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA – *Donor Specific Antibodies*) com a presença de C4d depositado em órgãos transplantados (COLLINS et al., 1999; FEUCHT et al., 1991).

Vários estudos mostram a associação da presença de anticorpos anti-HLA, tanto de classe I quanto de classe II, com a redução da sobrevida do enxerto renal (LACHMANN et al., 2009; LEFAUCHEUR et al., 2010). No entanto, o fato de pacientes com DSA detectado por técnicas mais sensíveis que CDC apresentarem boa evolução do transplante levantou a questão do que faz um anticorpo ser deletério (ROELEN; DOXIADIS; CLAAS, 2012). Os fatores que

podem influenciar o impacto clínico de anticorpos anti-HLA são: quantidade, tanto em número quanto em título, classe, força de ligação ao epítipo antigênico, capacidade de ativação do sistema complemento, e capacidade de recrutamento celular via receptores Fc (SCHAUB; HÖNGER; AMICO, 2014; VALENZUELA; MCNAMARA; REED, 2014).

1.3 TÉCNICAS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA

Desde a descrição da técnica de PC-CDC por Patel e Terasaki em 1969, muitos esforços foram aplicados com intuito de tornar a detecção de anticorpos anti-HLA mais sensível e específica. A técnica de PC por CDC é uma técnica de base celular que consiste na incubação de linfócitos T e B do potencial doador com o soro do paciente e subsequente adição de complemento de coelho. Na presença de anticorpo específico contra o doador haverá, então, a ligação do anticorpo ao antígeno e então a ativação do complemento promovendo lise celular. A análise da PC-CDC é realizada através da contagem do número de células lisadas nesta reação (PATEL; TERASAKI, 1969). Essa técnica pode também ser aplicada na forma de uma triagem (*screening*) com a utilização de um painel, com geralmente 20 a 40 células, coletadas randomicamente de indivíduos de uma determinada população, para que este painel seja composto de vários alelos HLA diferentes representativos da população. Diferentemente da PC na qual um resultado positivo significa que o paciente apresenta anticorpos formados contra um doador específico, no *screening* o resultado é dado em porcentagem, a qual reflete a porcentagem da população específica do painel para qual o paciente tem anticorpos formados (TINCKAM; CHANDRAKER, 2006).

A metodologia por CDC apesar de ser uma ferramenta importante para a predição de rejeição humoral hiperaguda, apresenta baixa sensibilidade. Com o intuito de aumentar esta sensibilidade, a técnica sofreu modificações durante o tempo, foram incluídas lavagens, aumento em tempos de incubação e a principal foi a inclusão de antiglobulina humana (AGH). A AGH é um anticorpo que se liga a complexos imunes e no caso da técnica por CDC ela promove a ligação de C1q e a ativação do complemento por anticorpos em menor concentração através de sua porção Fc (FULLER et al., 1997). Outra limitação da técnica de PC era a incapacidade de definir se a reação positiva é causada pela presença

IgG ou IgM. Para solucionar este problema foi introduzida a utilização de dithiothreitol (DTT) que quebra pontes dissulfeto de moléculas IgM ou complexos imunológicos (TAIT et al., 2013). A técnica por CDC apresenta ainda algumas outras desvantagens como a necessidade da obtenção de muitos linfócitos viáveis e a possibilidade de um resultado positivo pela presença de anticorpos que não são anti-HLA. Além disso, a determinação da especificidade de um anticorpo detectado por esta técnica exige a construção de painéis muito abrangentes e, ainda assim, em pacientes hipersensibilizados com perfis de anticorpos mais complexo torna-se quase impossível a determinação de especificidades. Além disso, existe a dificuldade de definir a classe HLA do anticorpo detectado (TAIT et al., 2013).

Outra técnica aplicada para detecção de anticorpos anti-HLA é a citometria de fluxo com base celular que apresenta maior sensibilidade do que a PC-CDC-AGH (AYNA et al., 2013; BRAY; GEBEL; ELLIS, 2004). No entanto, não possibilita diferenciação entre anticorpos fixadores e não-fixadores de complemento e também sofre interferência de anticorpos não HLA. Além disto, os resultados deste teste podem ser alterados pela ligação de IgG anti-HLA a receptores de membrana de linfócitos B. Assim, a enzima proteolítica pronase é utilizada para remover estes receptores da superfície das células, reduzindo a ocorrência destas alterações (BEARDEN et al., 2004; LOBO et al., 1995). Contudo, um resultado positivo nem sempre tem sido considerado um impedimento para o transplante, tal contraindicação depende de uma avaliação do histórico do paciente e este resultado pode ser apenas indicador de um pós-transplante mais complicado (TAIT et al., 2013).

Avanços na tecnologia de purificação de antígenos HLA permitiram a ligação destes antígenos solubilizados a matrizes sólidas, como placas de micro titulação utilizadas em ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) ou micro esferas de poliestireno que podem ser utilizadas em Citometria de Fluxo convencional ou na plataforma multiplex (LUMINEX®)(PEI et al., 1999, 2003; ZACHARY et al., 2001). Os painéis são comercializados em três diferentes formas: i) grupos de antígenos HLA com duas ou mais populações com afinidade para moléculas HLA de classe I (HLA-A, -B, -C) ou HLA de classe II (HLA-DR, -DQ, -DP), obtidas de várias linhagens celulares que são utilizadas apenas para

determinação de presença ou não de anticorpo anti-HLA, especificando apenas a classe HLA do anticorpo; ii) painéis fenotípicos nos quais as populações de antígenos HLA de classe I ou II provém de um único indivíduo por grupo de antígenos, este painel se assemelha muito ao painel de base celular, no entanto, além de detectar apenas anticorpos anti-HLA, permite a diferenciação entre HLA de classe I e II; iii) painéis com um único antígeno HLA ligado à microesfera, no qual em cada grupo de microesferas contém um único antígeno HLA clonado (TAIT et al., 2013).

Este último, SAB (*Single Antigen Beads*), é o teste mais sensível e específico para detecção de anticorpos anti-HLA disponível, permitindo a identificação de anticorpos anti-HLA individualmente de classe I (HLA-A, -B, -C) e de classe II (HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQB1, -DQA1, -DPB1 e -DPA1), além da determinação de anticorpos epítipo específicos. A leitura do teste é realizada através da plataforma LUMINEX e este é analisado através do valor médio da intensidade de fluorescência obtido, chamado MFI (*Mean Fluorescence Intensity*). O SAB por LUMINEX® é um teste considerado qualitativo, o valor de MFI é usado, no entanto, para inferência de semiquantitativa dos níveis de anticorpos. Os resultados obtidos em termos de presença de DSA, classe HLA e MFI são avaliados para inferência de risco ao transplante (Figura 1) (TAIT et al., 2009, 2013; TINCKAM; CHANDRAKER, 2006).

Como toda técnica, o SAB apresenta limitações. Por exemplo, o processo de clonagem e transferência dos antígenos para a microesfera pode gerar a desnaturação da molécula HLA, expondo sítios de ligação no antígeno que na forma natural não estariam expostos podendo levar a um resultado falso positivo (GRENZI et al., 2013; TAIT et al., 2013; OTTEN et al., 2013; VISENTIN et al., 2014) . Existe também uma variação entre a densidade de antígenos presentes em cada microesfera, não possibilitando assim a quantificação de anticorpo. O teste original é realizado com um anticorpo secundário IgG total, o que não permite determinar a função do anticorpo. Além disso, a presença de moléculas solúveis de C1q e C3 ou outros imunocomplexos podem bloquear a ligação do anticorpo ao seu sítio de ligação gerando resultados fraco positivos ou falso negativos (TAIT et al., 2013).

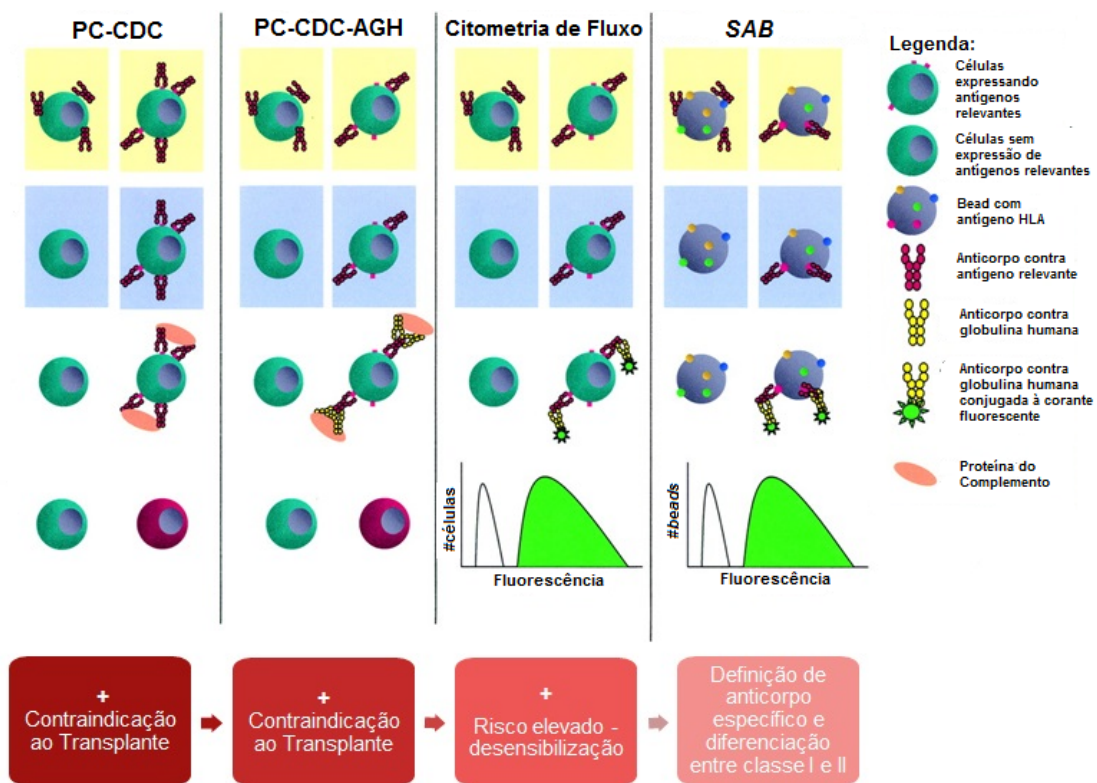


Figura 1. Evolução das técnicas para detecção de anticorpos anti-HLA. PC-CDC - Prova Cruzada por Citotoxicidade Dependente de Complemento; PC-CDC-AGH - Prova Cruzada Citotoxicidade Dependente de Complemento com adição de antiglobulina humana; SAB – *Single Antigen Beads*. Adaptada de TINCKAM e CHANDRAKER, 2006.

1.4 CLASSES DE IMUNOGLOBULINAS E REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS

Os isotipos de imunoglobulina (Ig) que apresentam relatos de participação na resposta humoral ao transplante são: IgM, IgA e IgG (ARNOLD et al., 2008, 2013; HÖNGER et al., 2011; STASTNY et al., 2009). A molécula IgM, responsável pela resposta imunológica primária é constituída de pentâmeros na sua forma secretada (PAUL, 2008; SCHROEDER; CAVACINI, 2010). Sua capacidade de ativar a cascata do complemento e formar redes já foi correlacionada com efeitos maléficos e efeitos protetivos ao transplante (KHODADADI; ADIB; POURAZAR, 2006; STASTNY et al., 2009). A imunoglobulina A é o tipo dominante de imunoglobulina presente nas secreções mucosas, e representa no sangue apenas 10-15% das Igs (PAUL, 2008; SCHROEDER; CAVACINI, 2010). O efeito da presença de anticorpos tipo IgA

em pacientes transplantados é controverso (ARNOLD, M-L et al., 2008). Os principais mecanismos de ação da IgA estão relacionados à inibição e aglutinação de micróbios (PAUL, 2008). No entanto, a capacidade dessas imunoglobulinas em ativar o sistema complemento é também controversa. Há relatos de que em determinadas circunstâncias fisiopatológicas IgA poderia ativar o sistema complemento através do mecanismo dependente de manoselectina (ROOS et al., 2001).

Diferentemente das outras imunoglobulinas, a participação da IgG na rejeição ao transplante e o efeito da presença de um anticorpo deste isotipo quando específico contra epítopos do doador está associado a perda do enxerto (LACHMANN et al., 2009; LEFAUCHEUR et al., 2010). A IgG é o isotipo de imunoglobulina mais abundante e com meia vida mais longa encontrada no soro humano. Baseando-se em diferenças estruturais, antigênicas e funcionais, principalmente da região constante, foram identificadas quatro subclasses de IgG, as quais receberam o nome de acordo com a quantidade encontrada no soro de indivíduos saudáveis (IgG1>IgG2>IgG3>IgG4) (Figura 2) (SASORITH; LEFRANC, 2014). As diferenças nas regiões constantes e da dobradiça afetam a flexibilidade e a afinidade funcional de cada subclasse (PAUL, 2008; SCHROEDER; CAVACINI, 2010).

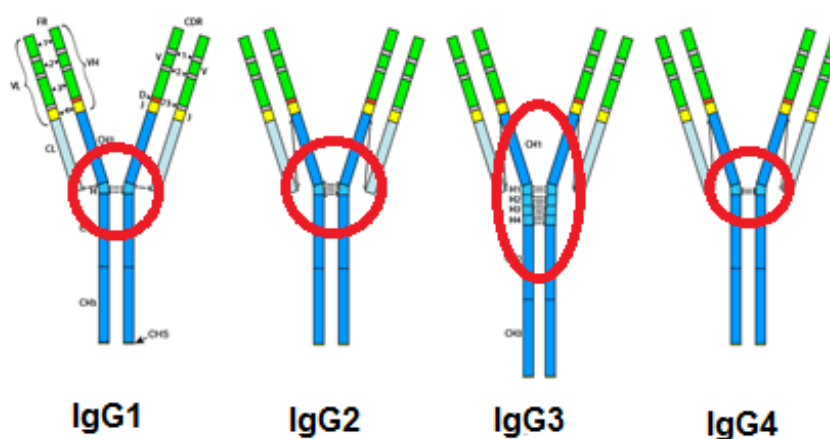


Figura 2. Estrutura das subclasses de Imunoglobulina G. A figura destaca as diferenças na região da dobradiça de cada subclasse. As características morfológicas das subclasses de IgG

conferem diferentes funcionalidades à cada molécula. Adaptado de <http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials>, acesso outubro de 2014.

A troca de subclasse é influenciada pelo tipo de antígeno, pela resposta imune desencadeada e pelo microambiente de citocinas (NIMMERJAHN; RAVETCH, 2005; STAVNEZER; GUIKEMA; SCHRADER, 2008; STAVNEZER, 1996; TANGYE et al., 2002). Lowe et al. (2013) caracterizaram o perfil de subclasses de IgG de pacientes em lista de espera para um transplante renal e concluíram que os perfis de subclasses de IgG são heterogêneos e podem ter relação com o tipo de evento que gerou a sensibilização, mas o mesmo evento de sensibilização pode gerar perfis diferentes em diferentes indivíduos. Por exemplo, anticorpos formados após transfusão sanguínea apresentaram a tendência de ser da subclasse IgG1, enquanto pacientes com transplante prévio apresentavam combinações de subclasses, em níveis mais elevados (LOWE et al., 2013). Hönger et al. (2011) também testaram a presença de anticorpos específicos contra o doador em um grupo de pacientes antes do transplante renal e avaliaram o efeito desses anticorpos com a incidência de rejeição. No entanto, devido à presença de vários perfis diferentes de subclasses não foi possível identificar quais padrões de perfis estão correlacionados com a ocorrência de rejeição (HÖNGER et al., 2011). Os resultados apresentados por Lowe et al (2013), sugerem que após o transplante os perfis de subclasses apresentados no pré-transplante podem sofrer alterações devido à presença do antígeno. A resposta ao transplante renal parece ser muito mais complexa do que o esperado, a simples definição dos anticorpos como fixadores e não fixadores de complemento não é suficiente para explicá-la (SCHAUB et al., 2014). A presença de anticorpos fixadores e não fixadores de complemento em eluatos de enxerto renal obtidos após rejeição, comprova a existência de dois grupos de imunoglobulinas (HEINEMANN et al., 2007).

As imunoglobulinas G são efetoras da resposta imune pela ativação do sistema complemento e pela ligação a receptores Fc que ativam uma série de grupos celulares e transduções de sinais que geram proliferação celular (COLVIN; SMITH, 2005; VALENZUELA; REED, 2011). A ativação do sistema complemento é responsável pela patogenicidade da rejeição aguda mediada por anticorpos (COLVIN; SMITH, 2005). As subclasses de imunoglobulina diferem

na habilidade de se ligar à molécula C1 pela porção C1q que dá início a cascata clássica do complemento. A IgG3 apresenta maior afinidade para fixar C1q, seguida por IgG1. IgG2, no entanto apresenta fraca afinidade, assim como IgG4 que não mostrou fixar complemento *in vitro* (PAUL, 2008; SCHROEDER; CAVACINI, 2010). Dessa forma, muitos estudos caracterizam IgG1 e IgG3 como fixadoras de complemento e IgG2 e IgG4 como não fixadoras de complemento (ARNOLD et al., 2008, 2013; HÖNGER et al., 2011).

1.5 SISTEMA COMPLEMENTO E REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS

O Sistema Complemento faz parte da imunidade inata, suas principais funções biológicas são interagir com partículas e macromoléculas estranhas ao organismo e promover sua eliminação por opsonização ou lise (DUNKELBERGER; SONG, 2010; MARKIEWSKI; LAMBRIS, 2007; RICKLIN et al., 2010; TOUZOT et al., 2014). É constituído de mais de 35 proteínas, incluindo moléculas de reconhecimento, enzimas proteolíticas, produtos efetores e receptores, as quais podem ser encontradas na circulação, ou nos tecidos (CHEN; CHEN; CHEN, 2013; PAUL, 2008). As moléculas circulantes de complemento são secretadas principalmente pelo fígado, enquanto as moléculas presentes nos tecidos são sintetizadas por células específicas do tecido ou células migratórias (TOUZOT et al., 2014). Além de participar da eliminação de patógenos, o sistema complemento tem um papel importante na manutenção da homeostase reconhecendo componentes próprios do organismo danificados ou alterados, como por exemplo, moléculas com estrutura alterada, células em degradação e complexos imunes (DUNKELBERGER; SONG, 2010; MARKIEWSKI; LAMBRIS, 2007; RICKLIN et al., 2010; TOUZOT et al., 2014). A ativação desse sistema ocorre principalmente por uma cascata de eventos proteolíticos através de domínios serina-protease presentes em alguns dos componentes. Existem três vias principais de ativação: a clássica, a dependente de lectina e a alternativa (Figura 3) (PAUL, 2008; VAISBICH, 2014).

A via clássica é ativada pela ligação de C1 ao complexo antígeno-anticorpo através dos domínios globulares de sua porção C1q. A ligação de C1q ao complexo antígeno-anticorpos exige que existam pelo menos duas porções Fc com conformação alterada, disponíveis, isso implica na necessidade de uma densidade suficiente de anticorpos para que haja ativação do complemento. A

ligação de C1q induz alterações em sua conformação que promovem a ativação de C1r e C1s. C1s é a enzima responsável pela clivagem de C4 e C2. A ativação de C4 gera a formação de C4a e C4b, os quais se ligam à superfície celular. A clivagem de C2 gera C2a, que se combina à C4a, formando o complexo C4b2a (C3 convertase). A C3 convertase cliva C3, formando C3b que se liga ao complexo C3 convertase, gerando C4b2a3b (C5 convertase). Esta por sua vez cliva C5 em C5a e C5b. C5b desencadeia a formação do complexo de ataque à membrana que leva à lise celular. C4b e o C3b promovem opsonização, enquanto o C4a e o C5a são anafilotoxinas, com propriedades quimiotáticas e de resposta inflamatória (COLVIN; SMITH, 2005; PAUL, 2008; VAISBICH, 2014).

A ativação da via da lectina ocorre quando proteínas que se ligam à manose reconhecem a manose presente na superfície de microrganismos. A ligação dessas proteínas à manose promove sua ativação e, então, a clivagem de C4 e C2, iniciando a partir daí o processo descrito na via clássica (PAUL, 2008; VAISBICH, 2014).

Já a via alternativa é ativada pela hidrólise de C3, presente na circulação, formando C3a e C3b. C3b se liga à superfície celular e interagindo com o Fator B, que é clivado pelo Fator D, gerando o fragmento Bb, capaz de se ligar a outras moléculas C3b da superfície das células e formar C3bBb (C3 convertase). A C3 convertase desencadeia uma alça de amplificação que aumenta a hidrólise de C3. Por fim, ocorre uma superprodução de C3b, o qual liga-se à C3 convertase e estimula a conversão para formar a C5 convertase (C3b2Bb). Esta, por sua vez, cliva C5 formando C5a e C5b, levando a formação do complexo de ataque à membrana (PAUL, 2008; VAISBICH, 2014).

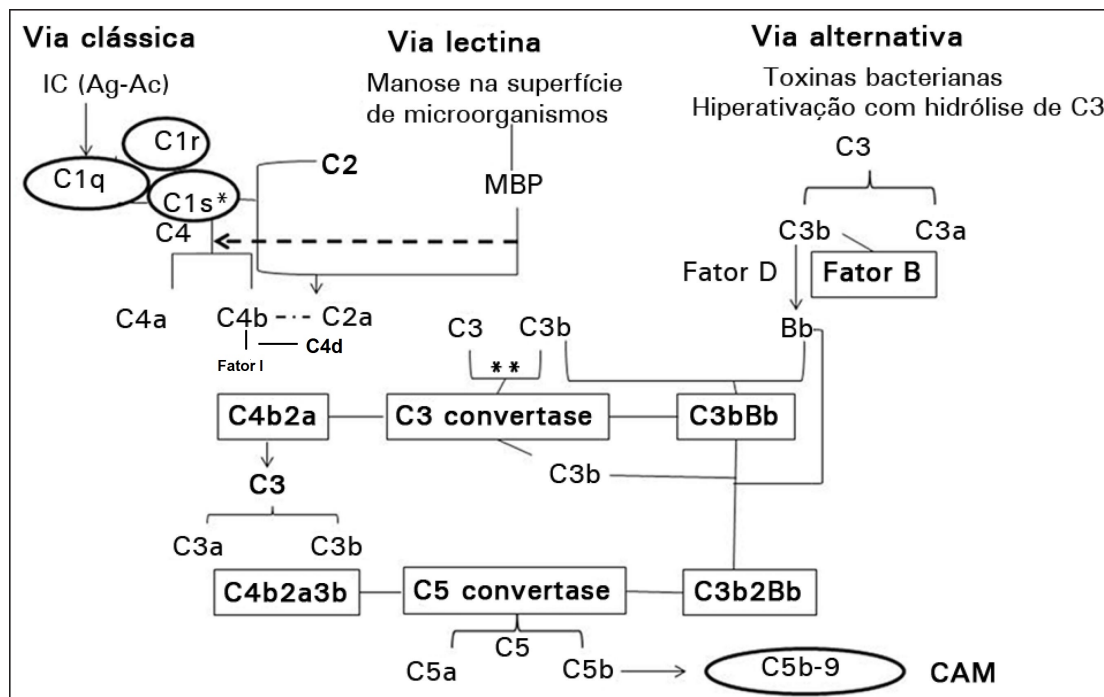


Figura 3. Vias de ativação do Sistema Complemento. IC: Imunocomplexos (antígeno-Anticorpo); MBP: Proteína ligadora da manose; C3bi: C3b inativado; MCP: Proteína cofator de membrana; TM: Trombomodulina; CAM: Complexo de ataque a membrana; ** Alça de amplificação. Figura adaptada de VAISBICH, 2014.

O Sistema Complemento pode induzir dano ao tecido transplantado por quatro mecanismos principais: i) Formação do complexo de ataque à membrana pela via clássica que gera lise celular direta; ii) Atração de células inflamatórias por C3a e C5a; iii) Ativação de células endoteliais através de C3a e C5a, que levam a expressão de moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas; iv) ou ainda, promovendo a expressão de molécula de adesão pelas células endoteliais em resposta ao complexo C5b-9 solúvel e pela síntese de moléculas pró-inflamatórias e fatores do tecido que contribuem para trombose (ALBRECHT; WARD, 2005; ALBRECHT et al., 2004; MONSINJON et al., 2003; SAADI et al., 1995).

A ativação da via clássica é essencial para a patogênese da rejeição mediada por anticorpos (RMA) hiperaguda e aguda. O diagnóstico desse processo de rejeição é realizado através da determinação da presença de lesões características no enxerto, presença de evidência no tecido de atividade do sistema complemento e presença de anticorpos específicos contra o doador. C4d é um marcador de ativação de complemento no tecido, formado pela

clivagem de C4 em C4a e C4b, quando C4b é inativado pelo fator I a C4d, C4d permanece covalentemente ligado ao tecido (COLVIN; SMITH, 2005; FEUCHT et al., 1991). Essa propriedade do C4d, juntamente com o fato de este poder ser detectado no tecido por microscopia de imunofluorescência ou por imunohistoquímica, transformou a detecção de C4d em uma boa ferramenta para o diagnóstico de rejeição mediada por anticorpo no transplante de órgãos sólidos. A partir de 2003, a presença de C4d no tecido foi incluída como critério de BANFF para o diagnóstico de RMA, no transplante renal, juntamente com evidências morfológicas no tecido e presença de anticorpos específicos contra o doador (HAAS, 2012; RACUSEN; HALLORAN; SOLEZ, 2004). No entanto, estudos tanto morfológicos quanto moleculares mostram que existe uma forma de RMA em que não é detectado C4d no tecido (EINECKE et al., 2009; HAAS; MIROCHA, 2011; HAAS, 2013; HAYDE et al., 2013; LOUPY et al., 2011, 2009; SIS et al., 2009, 2012). Dessa forma em 2013, a RMA com C4d-negativo foi incluída nos critérios de BANFF para diagnóstico de RMA no transplante renal. Esta ficou definida por danomicrovascular (glomerulite, capilarite peritubular e microangiopatia trombótica) na presença de DSA (HAAS et al., 2014).

Considerando a relevância da ativação da via clássica para ocorrência de RMA tornou-se importante identificar a capacidade do DSA em fixar elementos do sistema complemento. Böehmig e colaboradores (2003) foram os primeiros a desenvolver metodologias para detecção da capacidade do DSA para se ligar a C1q e C4d baseadas em citometria de fluxo (WAHRMANN et al., 2003). Essa técnica foi posteriormente adaptada para o sistema LUMINEX® e consiste em incubar microesferas coloridas ligadas a antígenos únicos HLA com o soro do paciente (anticorpo) e C1q humano purificado marcado com biotina. Esta ligação microesfera-anticorpo-C1q-biotiniliado é posteriormente marcada com ficoeritrina e a leitura das reações é realizada pelo LUMINEX®. A relevância clínica da aplicação deste teste na detecção de anticorpos anti-HLA fixadores de complemento vem sendo amplamente estudada. No entanto, a detecção de anticorpos específicos contra o doador fixadores de complemento no pré-transplante renal não mostrou ser informativa para a definição de risco de perda de enxerto (CRESPO et al., 2013; LOUPY et al., 2013). Por outro lado, a detecção de DSA fixador de complemento após o transplante tem sido associada

à rejeição mediada por anticorpos, disfunção renal e perda de enxerto. De acordo com Loupy et al. (2013), a presença de anticorpos contra o doador no pós-transplante, em uma análise multivariada com fatores clínicos e histológicos, apresentou um aumento no risco de perda de enxerto de 4 vezes (LOUPY et al., 2013). Esses achados mostram que a determinação de anticorpos capazes de fixar C1q pode ser uma ferramenta de diagnóstico importante no pós-transplante para avaliar risco de perda de enxerto e definir medidas de tratamento.

1.6 EVOLUÇÃO DA REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS NO TRANSPLANTE

A rejeição mediada por anticorpos (RMA) é atualmente, uma das principais causas de disfunção e perda renal, com uma incidência de aproximadamente 30%, representa metade das perdas de enxertos renais transplantados (LEFAUCHEUR et al., 2013; SELLARÉS et al., 2012). A utilização de protocolos de dessensibilização, que permite hoje o transplante de pacientes com anticorpos anti-HLA pré-formados e, os avanços tecnológicos nas técnicas diagnósticas, tanto para detecção de anticorpos quanto para avaliação histológica permitiram um melhor entendimento dessa doença (LEFAUCHEUR et al., 2013; LOUPY; HILL; JORDAN, 2012).

As características da RMA são bem definidas e diferem das características da rejeição causada primariamente por células, no entanto esta doença apresenta diferentes formas de manifestação, sendo estas consideradas um espectro de doenças associadas à presença de DSA (*Donor Specific Antibodies*) e diferentes aspectos patológicos que resultam de um processo de resposta humoral contínuo (COLVIN; SMITH, 2005; LOUPY; HILL; JORDAN, 2012). A tabela 2 mostra a estratificação de risco para desenvolvimento de cada forma de RMA para pacientes com DSA pré-formado (LOUPY; HILL; JORDAN, 2012).

TABELA 2. Estratificação de risco¹ para pacientes com DSA pré-transplante de acordo com os padrões de RMA

Fenótipo clínico	DSA	C4d	Comentários
RMA aguda	+++	Positivo	Forma clássica de RMA, definida pelos critérios de BANFF
RMA indolente	++	Positivo	Forma truncada de RMA
Inflamação Microcirculação	+	Negativo	Forma silenciosa de RMA
Sem lesões humorais	+	Positivo	Acomodação ² ?/Pode desenvolver para RMA aguda ou indolente
Sem lesões humorais	Pos/Neg	Negativo	Não caracterizada atualmente

¹O risco de progressão para RMA crônica e perda de enxerto decresce com a tabela. ²Pacientes com DSA e deposição de C4d mas sem lesões patológicas podem apresentar um processo de acomodação, no entanto a maioria dos pacientes acabam apresentando lesões futuramente. Abreviações: RMA - Rejeição Mediada por Anticorpos, DSA - *Donor Specific Antibodies*. **Adaptado de Loupy A et al, Nat. Rev. Nephrol, 2012.**

A presença de DSA pré-transplante ou o desenvolvimento de aloanticorpos após o transplante e suas características - subclasse, força de ligação e título - estão ligados à história natural da RMA e podem determinar como será a progressão da doença. A Figura 4 é um modelo da progressão da RMA a partir da formação de DSA após o transplante e mostra que após eventos inflamatórios há a formação de aloanticorpos. A ação destes anticorpos no tecido é detectada após algum tempo do início da resposta e, então, começam a surgir os primeiros sinais de danos no tecido, ainda sem sinais clínicos. A disfunção renal diagnosticada pela redução na taxa de filtração glomerular (TFG) só pode ser detectada num estágio mais avançado da doença (COLVIN; SMITH, 2005; WIEBE et al., 2012). A Figura 5 apresenta um panorama da rejeição mediada por anticorpos um pouco mais complexo, incluído a resposta de pacientes com anticorpos pré-formados, mostrando que diferentes fases da doença podem ser diagnosticadas durante o tempo (LOUPY; HILL; JORDAN, 2012). O reconhecimento dos diferentes estágios da RMA e seu diagnóstico mais preciso, além do melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos em cada parte do processo, é essencial para definição de terapias para tratamento e definição de períodos de intervenção (COLVIN; SMITH, 2005; LOUPY; HILL; JORDAN, 2012; LOUPY et al., 2009).

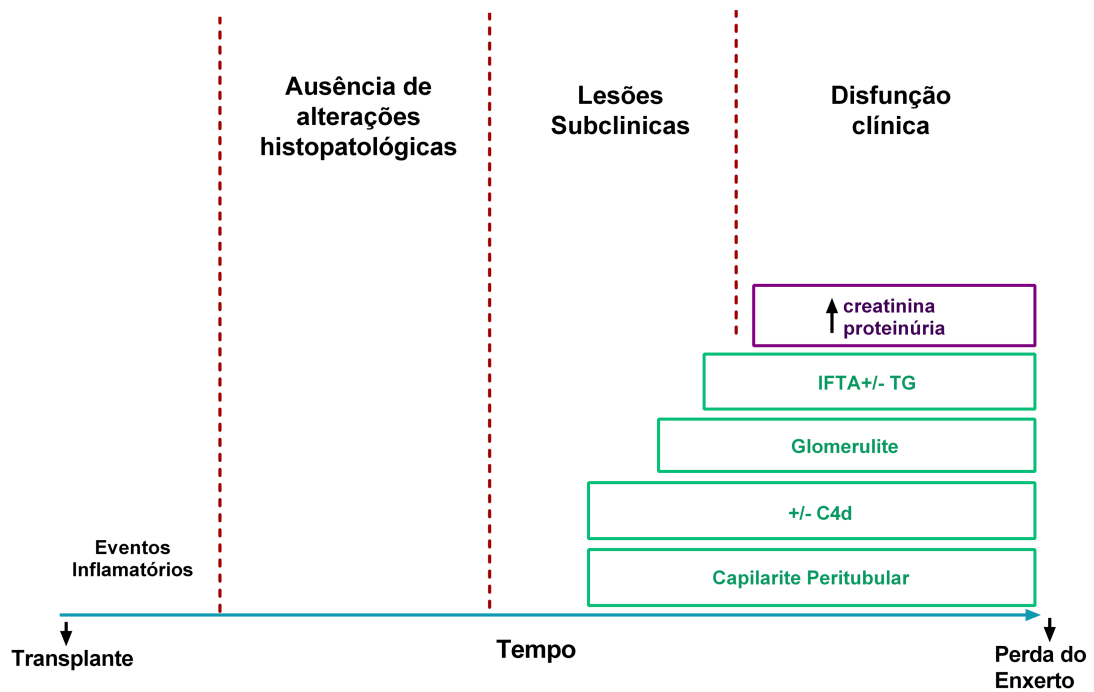


Figura 4. Adaptação da sequência de estágios de rejeição mediada por anticorpos proposto por Colvin RB e Smith RN, Nat. Rev Immunol, 2005 e adaptado por Wiebe C *et al.*, AJT, 2012. IFTA – Fibrose Intersticial e Atrofia Tubular; TG – Glomerulopatia do Transplante.

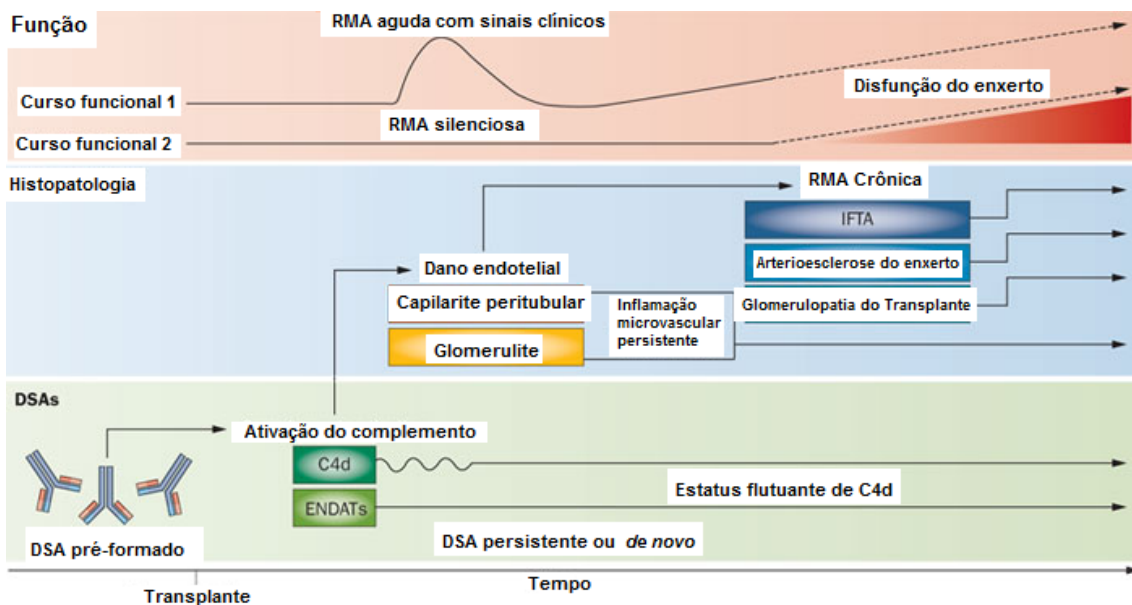


Figura 5. História natural da rejeição mediada por anticorpos e seus estágios de progressão de acordo com a presença e desenvolvimento de DSA após o transplante renal. DSA – Donor Specific Antibodies; IFTA – Fibrose Intersticial e Atrofia Tubular; ENDATs – Endothelial-Associated Transcripts; RMA – Rejeição Mediada por Anticorpos. Adaptada de Loupy *et al.*, Nat. Rev. Nephrol., 2012.

2 JUSTIFICATIVA

A aplicação de novas tecnologias para detecção de anticorpos anti-HLA mudou a maneira de preparar um paciente para o transplante renal. A combinação de resultados de diferentes metodologias permite hoje uma análise de risco para a tomada de decisão para a realização do transplante, assim como definição de estratégias de desensibilização e protocolos imunossupressores. No entanto, dentro do complexo processo de rejeição mediada por anticorpos (RMA), pouco se sabe sobre a evolução da resposta imunológica.

Apesar do *Single Antigen Beads* (SAB) ser um teste aprovado para uso qualitativo para determinação de anticorpos específicos contra o doador (DSA), o valor médio de intensidade de fluorescência (MFI) é amplamente utilizado para inferir risco para o transplante renal. Vários estudos populacionais mostram que existe uma correlação entre valores mais altos de MFI, tanto com ocorrência de rejeição mediada por anticorpos quanto com a perda de enxerto (GIBNEY et al., 2006; AMICO et al., 2008; LACHMANN et al., 2009; LEFAUCHEUR et al., 2010; DUNN et al., 2011; HOSHINO et al., 2014). Lefaucheur e colaboradores, 2010, avaliaram o impacto da detecção de DSA e da quantificação por valores de MFI em soro pré-transplante de 402 pacientes transplantados renais para a ocorrência de RMA e a sobrevida do enxerto. Neste estudo, pacientes com DSA com valores de MFI acima de 3000 apresentaram menor sobrevida em 8 anos de transplante, do que pacientes com DSA abaixo de 3000 MFI. A tabela 3 mostra os resultados da análise de risco relativo (RR) para ocorrência de RMA obtida no estudo. Os autores concluíram que a presença de DSA com valores de MFI acima de 6000 está associada a um risco relativo de ocorrência de RMA 100 vezes maior do que pacientes com DSA com MFI menor que 465. No entanto, analisando a tabela apresentada no estudo é possível notar que, apesar da significância estatística, os intervalos de confiança são muito grandes. Isso nos leva a concluir que alguns pacientes com DSA acima de 6000 MFI apresentam risco semelhante ao de pacientes com DSA menor que 1500 MFI. Essa diferença de risco entre pacientes com os mesmos valores de MFI mostra que a análise desta característica é superficial para entendimento do processo de rejeição.

Tabela 3. Risco Relativo para RMA aguda de acordo com o valor de MFI por SAB (regressão logística)

MFI DSA	RR (95% IC)	p
≤ 465	1	<0,0001
465 a 1500	24,8 (4,6 a 134,8)	0,0001
1500 a 3000	23,9 (3,5 a 160,8)	<0,0001
3000 a 6000	61,3 (11,5 a 327)	<0,0001
>6000	113,0 (30,8 a 414,0)	<0,0001

DSA - *Donor Specific Antibodies*; MFI - *Mean Fluorescence Intensity*; RMA - Rejeição Medida por Anticorpos; RR - Risco Relativo; SAB - *Single Antigen Beads*. Adaptado de Lefaucheur *et al.*, JASN, 2010.

A resposta imunológica a um antígeno segue um curso determinado pelo ambiente de citocinas e da sinalização gerada após o início de uma inflamação. Segundo o modelo proposto por Collins e Jackson, 2013, existe uma sequência programada de troca de classes de imunoglobulina que ocorre durante o tempo de resposta e é influenciada pelas citocinas liberadas durante o processo. Após uma sinalização de inflamação a primeira imunoglobulina liberada seria IgM, seguida posteriormente de IgG3, então IgG1, IgG2 e por fim IgG4 (Figura 6) (COLLINS; JACKSON, 2013). Dessa forma, uma progressão de subclasses fixadoras de complemento para não fixadoras de complemento indicariam progressão da resposta imunológica. Arnold e colaboradores, 2007, relataram a presença de IgG2 e IgG4 em eluatos de enxerto renal após a perda, ainda o mesmo grupo em 2013, mostrou que pacientes com IgG2 e IgG4 apresentavam mais RMA do que pacientes com subclasses fixadoras de IgG. Esses achados corroboram a ideia de que a transição de IgGs de subclasses fixadoras para subclasses não fixadoras de complemento está associada à progressão da doença. No entanto, não existem dados ainda hoje que demonstrem como essa evolução da resposta humoral ocorre.

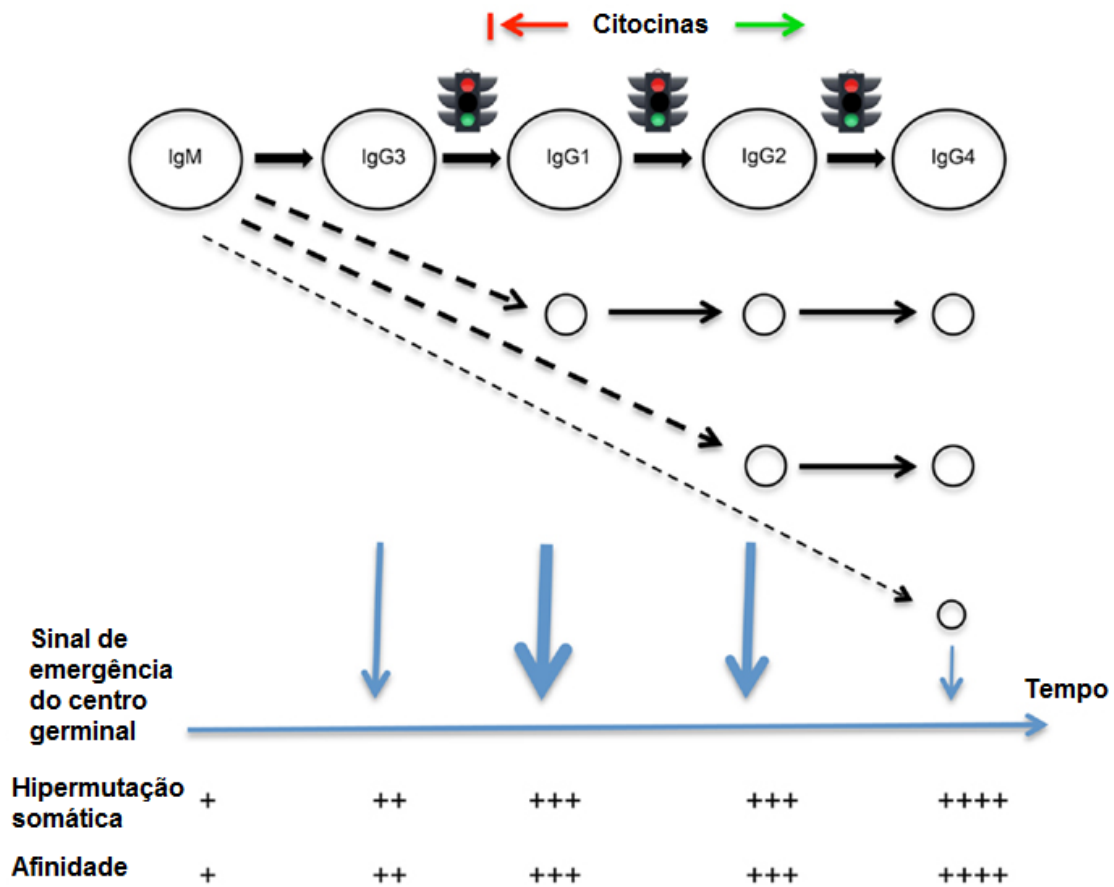


Figura 6. Modelo temporal de mudança de classe de IgG partindo de uma reação do centro germinal. A presença de diferentes citocinas pode levar a diferentes processos, além disso, a eliminação do antígeno iniciaria uma sinalização de interrupção da resposta. Adaptada de Collins AM e Jackson KJL, *Front. Immunol.*, 2014.

Dessa forma, dentro da evolução da RMA existe também a evolução da resposta imunológica (Figura 7). A definição de como essas mudanças de classes de imunoglobulina ocorre durante o processo de rejeição e o esclarecimento da progressão da doença no nível das características dos anticorpos anti-HLA podem elucidar os mecanismos envolvidos na RMA e ainda ajudar a definir intervalos de tempo para monitoração destes anticorpos e para aplicação de diferentes tratamentos, os tornando mais eficazes.

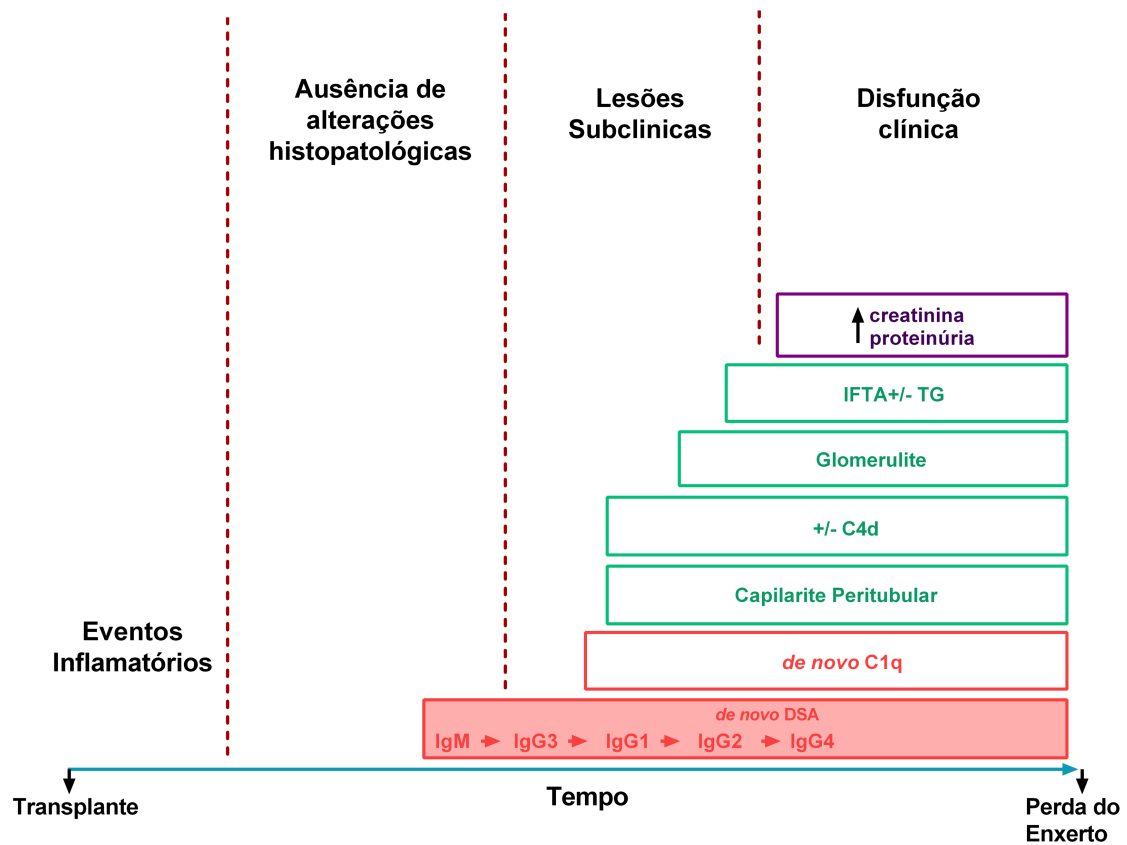


Figura 7. Hipótese. Evolução da rejeição mediada por anticorpos gera o progresso da Rejeição Mediada por Anticorpos. DSA – *Donor Specific Antibodies*; IFTA – Fibrose Intersticial e Atrofia Tubular; TG – Glomerulopatia do Transplante. Adaptada de Colvin RB e Smith RN, *Nat. Rev Immunol*, 2005 e Wiebe C *et al.*, *AJT*, 2012.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e definir as características dos anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA – Donor Specific Antibodies) relacionadas com o risco de ocorrência de rejeição mediada por anticorpos (RMA), e avaliar no período de 5 anos após o transplante o impacto de fatores clínicos, histológicos e imunológicos na função renal de pacientes transplantados renais com doador vivo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Modificar a técnica de detecção de anticorpos anti-HLA por *Single Antigen Beads* (SAB) com o objetivo de identificar as diferentes subclasses de imunoglobulina G e avaliar a aplicabilidade da técnica modificada.
- b. Correlacionar as subclasses de IgG detectadas pelo método modificado à habilidade em fixar complemento “in vitro”.
- c. Avaliar a associação entre os valores de intensidade de fluorescência (MFI) dos DSAs detectados pelo SAB original com os valores obtidos para cada subclasse de IgG e obtidos pelos DSAs detectados pelo SAB-C1q.
- d. Avaliar o impacto clínico do monitoramento de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA), o padrão do perfil de subclasses de IgG dos DSAs e a fixação de complemento, assim como a manutenção ou modificação deste perfil durante o tempo.
- e. Avaliar o risco da ocorrência de rejeição mediada por anticorpos e a evolução da função renal associadas às características dos anticorpos específicos contra o doador, tais como: classe das moléculas HLA, número, valor de intensidade de fluorescência (MFI), padrão de subclasses de IgG, presença de fixação de complemento.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Seleção de pacientes e monitoramento pós-transplante

Para o registro, organização e seleção de pacientes foi elaborado um banco de dados utilizando a plataforma Microsoft Access e as linguagens de programação *Visual Basic for Applications* para a montagem da interface, e *Structured Query Language* para a estrutura do banco em si e de suas consultas. Depois de terminado o desenvolvimento do banco, foi iniciada a coleta de dados dos pacientes transplantados entre 2007 e 2010. Esses dados incluíram dados demográficos, como nome, data de nascimento, sexo e etnia. Assim como dados clínicos como doença de base, valores de creatinina, terapia imunossupressora, tipificação HLA e ABO, eventos de sensibilização, como gestações, transfusões sanguíneas, e transplantes prévios, data de início de diálise, dados de avaliações clínicas gerais, resultado de exames de prova cruzada histórica, de detecção de anticorpos anti-HLA por SAB (*Single Antigen Beads*) e resultados de biópsias. Os dados clínicos foram obtidos pela análise dos prontuários dos pacientes estabelecendo uma linha temporal de eventos clínicos e histológicos. Todos os pacientes declararam sua concordância em participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a cada coleta de amostra (Anexo 1). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Anexo 2).

Para o estudo foram selecionados pacientes transplantados renais (N = 300) no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba no período entre 2007 e 2010. Foram incluídos no estudo apenas pacientes transplantados com doador vivo (N = 158), com monitoramento pós-transplante para a presença de anticorpo anti-HLA específico contra o doador (DSA), com pelo menos uma amostra de soro positiva para DSA e amostras de soro disponíveis no Laboratório de Imunologia de Transplantes da PUC-PR para a realização do SAB modificados para cada subclasse de IgG e C1q Screen (Figura 8). O monitoramento pós-transplante para detecção de anticorpos anti-HLA contra o doador pelo ensaio SAB original foi realizado prospectivamente seguindo o protocolo apresentado na Figura 9.

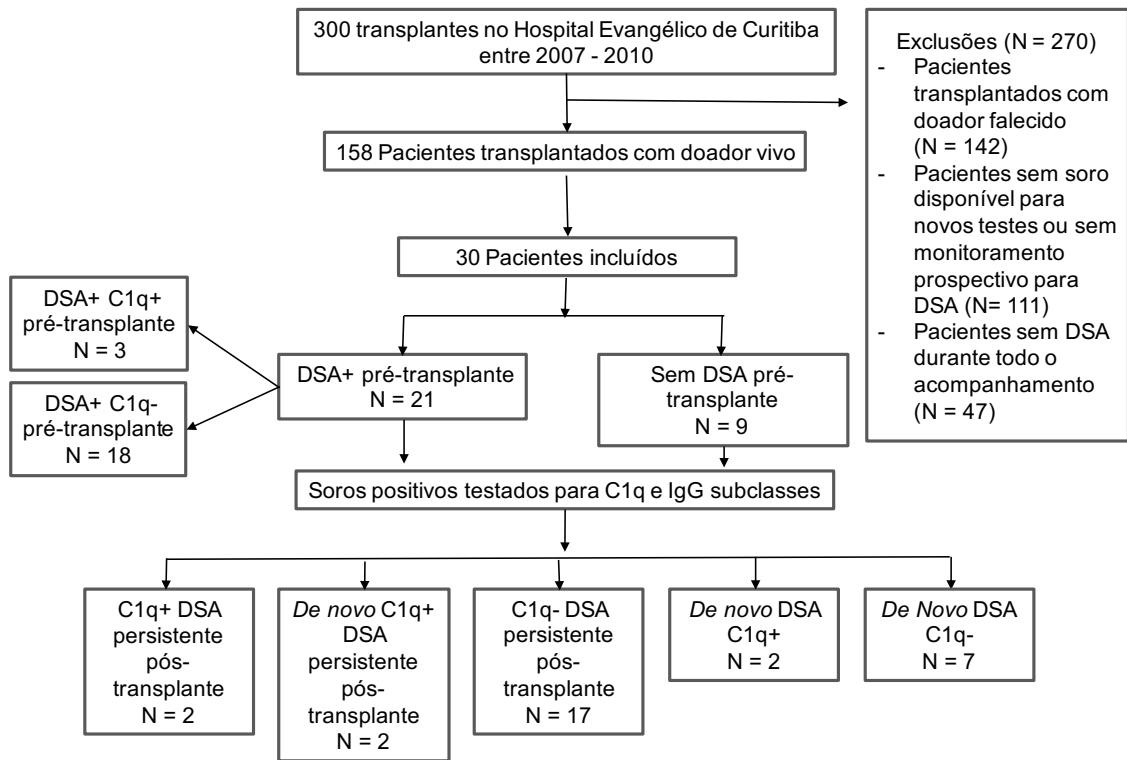


Figura 8. Seleção de pacientes para o estudo. Foram selecionados somente pacientes transplantados com doador vivo no Hospital Evangélico de Curitiba entre os anos de 2007 a 2010. Todos os pacientes incluídos tinham que ter monitoramento pós-transplante para presença de anti-HLA DSA, um soro ou mais com DSA positivo e amostras de soro disponíveis para os testes adicionais. DSA – anticorpo anti-HLA específico contra o doador.

Pré-Tx	1° a 10° dia pós-tx	10° a 20° dia pós-tx	20° a 60° dia pós-tx	60° a 90° dia pós-tx	90° a 180° dia pós-tx	180° a 365° dia pós-tx	2 anos pós-tx	3 anos pós-tx	4 anos pós-tx	5 anos pós-tx
--------	---------------------	----------------------	----------------------	----------------------	-----------------------	------------------------	---------------	---------------	---------------	---------------

Figura 9. Monitoramento pós-transplante. Foram selecionadas amostras pré e pós-transplante dentro dos períodos determinados.

4.2 Caracterização de anticorpos anti-HLA

4.2.1 Identificação de anticorpos específicos contra o doador

Os soros pré- e pós-transplante foram testados para presença de anticorpos anti-HLA de classe I e classe II utilizando um kit comercial Single Antigen Beads (SAB-IgGtotal) baseado na tecnologia Luminex® (LABScreen® Single Antigen LS1A04 and LS2A01; One Lambda, Inc.; Canoga Park, CA) seguindo as instruções do fabricante. 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 HLA-A, -B, -DR, -DQ loci.

4.2.2 Identificação das subclasses de imunoglobulina

As amostras positivas para anticorpos específicos contra o doador foram testadas pelo ensaio SAB modificado para determinar a subclasse do anticorpo IgG. Para isso o anticorpo secundário padrão que detecta IgG total foi substituído por um marcador específico para cada subclasse de imunoglobulina, IgG1-4, conjugado com fico-eritrina (PE) (IgG1 clone HP6001, IgG2 clone 31-7-4, IgG3 clone HP6050, IgG4 clone 6025; Southern Biotech, Birmingham, AL). O ponto de corte para determinar a positividade da reação foi estabelecido usando três soros de homens (NC1-3), saudáveis sem sensibilização contra antígeno HLA e um soro controle negativo comercial (NC4) $CutoffMFI=2*((mean\ NC1-4)+3*(Standard\ deviations\ NC1-4))$; $Cutoff\ ratio=MFI/CutoffMFI$. O valor de MFI do teste foi dividido pelo valor do Cutoff calculado e um valor acima de 5 foi considerado positivo (modificado de HÖNGER, GIDEON et al., 2011).

4.2.3 Determinação da habilidade em fixar C1q pelo anticorpo

As amostras positivas para anticorpos específicos contra o doador pelo teste padrão foram testadas para avaliação da habilidade em fixar complemento usando um teste disponível comercialmente (C1qScreen™, One Lambda, Canoga Park, CA). Os soros foram aquecidos (56°C for 30 minutes) com o intuito de desnaturar moléculas endógenas de C1 e C3 e então o teste foi realizado conforme instruções do fabricante. A interpretação dos resultados foi realizada

de acordo com a metodologia descrita por Stanford (TYAN, 2013). Brevemente, o MFI foi arranjado do valor mais alto para o mais baixo e então nós procuramos por 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 consideradas positivas. Os valores entre o corte positivo e negativo foram analisados conforme histórico do paciente.

5 ARTIGO

5.1 Anti-HLA donor specific IgG-subclasses and C1q-binding evolution in post-transplant monitoring*

Authors

Renata Glehn-Ponsirenas^{1,2}

Helena B. Cazarote^{1,2}

Stanley de Almeida Araújo³

David Campos Wanderley³

Silvia Shimakura⁴

Joana S. Valdameri¹

Fabiana L. C. Contieri⁵

Cristina C. Q. C. von Glehn^{1,2}

*Michelle F. Susin^{1,2}

*Vanessa Santos Sotomaio²

1. Transplant Immunology Laboratory, Hospital Universitário Cajuru, Curitiba, PR, Brazil
2. School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brazil*
3. Nephropathology Institute, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
4. Department of Statistics, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil
5. Hospital Universitário Evangélico do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

Keywords – Donor Specific Antibodies (DSA), C1q-binding, IgG subclasses, Antibody Mediated Rejection (ABMR), Allograft Dysfunction.

Address for correspondence:

Renata Glehn-Ponsirenas, Transplant Immunology Laboratory, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Guabirota, s/n, portão 3, bl IV, 2 andar, Curitiba, PR, 80215200, Brazil. Email: renata.ponsirenas@gmail.com

Phone/FAX: +55 41 33341139

This study was funded by the Transplant Immunology Laboratory of Hospital Universitário Cajuru, Curitiba, Brazil.

Approved by the Ethics Committee for Research of Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Authorship –

Renata Glehn-Ponsirenas^{1,2} – designed research study, collected and analyzed data; performed statistical analysis, and wrote the paper.

Helena B. Cazarote^{1,2} – collected data; performed C1q-binding analysis.

Stanley de Almeida Araújo³ – revised biopsies and clinical advisory.

David Campos Wanderley³ – revised biopsies and clinical advisory.

Silvia Shimakura⁴ – performed statistical analysis and paper review.

Joana S. Valdameri¹ – collected data.

Fabiana L. C. Contieri⁵ – provided patient sera and clinical advisory.

Cristina C. Q. C. von Glehn^{1,2} – designed research study, contributed with important reagents.

*Michelle F. Susin^{1,2} – designed research study, analyzed data, paper review.

*Vanessa S. Sotomaior² - designed research study, analyzed data, paper review.

*Drs. Susin and Sotomaior contributed equally to this article.

Renata Glehn-Ponsirenas – renata.ponsirenas@gmail.com

Helena B. Cazarote - helena.cazarote@hospitalcajuru.com.br

Stanley de Almeida Araújo - stanleyaa@gmail.com

David Campos Wanderley – david_wanderley@hotmail.com

Silvia Shimakura – silvia.shimakura@gmail.com

Joana S. Valdameri – joanavaldameri@yahoo.com

Fabiana L. C. Contieri – flcontieri@aol.com

Cristina C. Q. C. von Glehn – c.glehn@hospitalcajuru.com.br

*Michelle F. Susin – mfsusin@gmail.com

*Vanessa Santos Sotomaior – vanessa.sotomaior@pucpr.br

Disclosure –

The authors of this manuscript report the following conflicts of interest:

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

Funding –

This study had no external funding

ABBREVIATIONS

HLA, human leucocyte antigen

IgG, Immunoglobulin G

DSA, donor specific antibodies

MFI, mean fluorescence intensity

SAB, Single antigen beads

ABMR, antibody mediated rejection

TCMR, cellular mediated rejection

ABSTRACT

Background

The identification of low-level antibodies by single antigen bead (SAB) methodology has brought advancements to risk evaluation of kidney transplant recipients. However, the use of mean fluorescent intensity (MFI) to quantify antibodies and to guide therapy is not enough. Notably, IgG subclass switching is hypothesized to follow a programmed sequence after an emergency signal from the germinal center. In transplantation this process is not clear yet. In the present study, we sequentially evaluate anti-human leukocyte antigen donor specific antibody (DSA) subclasses, their profile changes, and C1q-binding ability and the influence of those characteristics on antibody mediated rejection (ABMR) occurrence and allograft function.

Methods

A total of 30 DSA positive patients were tested for IgG subclass content and C1q-binding in sequential serum samples.

Results

Twenty-one patients were DSA positive prior to transplant; patients sensitized only by transfusion or pregnancies had IgG1 and/or IgG3, and patients sensitized by both transfusion and pregnancies or previous transplant showed a broader range of IgG subclasses. C1q-binding was detected in high MFI made up of IgG1 or multiple IgG subclasses. Only four patients were positive for C1q post-transplantation and three of these showed an increase in MFI, changes in subclasses patterns, ABMR, and allograft dysfunction.

Conclusions

Post-transplant evaluation of DSA subclasses and the ability to bind C1q may be informative for both ABMR occurrence and allograft dysfunction. Monitoring these events may help to better define risk and interventional time points.

INTRODUCTION

Technological advancements in antibody identification have revolutionized how we assess risk in solid organ transplantation. From the identification of low-level antibodies to the characterization of highly sensitized re-transplant patients,¹ these advancements, particularly solid phase single antigen beads assays (SABs), have made it exponentially easier to differentiate and categorize patients.^{2,3} However, as beneficial as this is to organ allocation and desensitization protocols,⁴ it provides minimal improvement in rejection diagnosis and treatment,^{5,6} particularly when attempting quantification through mean fluorescence intensity (MFI).⁵

While there is an association of elevated MFI values with worse outcomes, there is very little evidence supporting a direct correlation of MFI and clinical impact. For example, Lefaucheur et al. showed in a pre-transplant setting that patients with DSA higher than 6,000 MFI presented a 100-fold increased risk for antibody mediated rejection (ABMR) (RR 113.0; 30.8 - 414 95%CI), however, the confidence interval showed by the data suggests that some of the patients in this group presented lower risk for ABMR than patients with MFI between 465 and 1500 (RR 24.8; 4.6 – 134.8).⁷ When evaluating large cohorts, it is possible to find greater risk associated to higher MFI values, but the question remains, what differs in patients with high MFI values that develop ABMR versus those that do not?^{5,8}

In the post-transplant setting, the appearance of anti-HLA donor specific antibodies (DSA), as determined by MFI and the subsequent rise and/or fall of the MFI value, while implying risk, does very little to define the function and activity of that antibody.^{8,9} When considering the functionality of DSA, it was recently demonstrated by Loupy et al. that allograft survival in the presence of C1q-binding DSA was significantly lower than in patients with non-C1q-binding DSA and no DSA. However, in their cross-sectional analysis of 1016 patients tested at one year or at the time of rejection with a five-year follow-up, they found only 77 patients with C1q-positive DSA.¹⁰ While providing a highly significant cohort of patients at higher risk for allograft loss, suggesting the functionality of DSA at a specific time point; these data do little to elucidate the true evolution of the immune response. One could argue that instead of being a marker for

rejection and possibly an opportunity for intervention, it is nothing more than evidence of a predetermined fate.

It has recently been shown that the presence of complement-fixing IgG (IgG1 and/or IgG3) is abundant in kidney transplant patient serum but is not a determinant of the detection of C1q-binding.¹¹ Moreover, subclass switching is hypothesized to follow a programmed sequence after an emergency signal from the germinal center leading to the production of IgM followed by IgG3, then IgG1, then IgG2, and finally IgG4.¹² This process is influenced by the initial immune response, the microenvironment of cytokines, and the signaling produced.^{13,14} There are many reports suggesting that IgG3 and IgG1 appear relatively early in the immune response and are often the only subclasses detected, which could mean early antigen clearance.¹² Arnold et al. observed that ABMR features were more common in patients with an expansion to non-complement-fixing DSA.¹⁵ This suggests that the expansion of complement-fixing to non-complement-fixing DSA shows an evolution of the immune response. Little has been described in transplantation about this process; as most studies evaluate pre-transplant sera alone or pre-transplant sera with only one post-transplant time point.¹⁶⁻²¹

In the present study, we sequentially evaluated anti-HLA DSA subclasses, their profile changes, and C1q-binding ability while observing the influence of those characteristics on ABMR and allograft function in live donor kidney transplant recipients.

METHODOLOGY

Patients and Sera Selection

From January of 2007 we prospectively monitored pre- and post-kidney transplant patients for the presence of donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) by Single Antigen Beads (SAB). Between 2007 and 2010, 158 patients received kidneys from live donors at the Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. From those, 63 patients were excluded due to lack of complete follow-up or available serum for new tests, and 65 did not present DSA during the 5 years of post-transplant monitoring. Thirty patients were included in the study, twenty-one with preformed DSA and nine with *de novo* DSA. All transplants required a negative complement-dependent cytotoxicity cross-match for IgG T-cell and B-

cell, and ABO blood group compatibility. Sera collection is shown in Figure 1. The study was approved by the Ethics Committee for Research from the Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Clinical Data

Clinical data on donors and recipients were obtained from the original medical records. Immunosuppression included prednisone, cyclosporine, and mycophenolate mofetil. Acute clinical rejection was characterized by deterioration of allograft function, proteinuria, and histopathological evidence. Allograft function is shown as estimated glomerular filtration rate (eGFR) by the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) formula in mL/min/1.73 m². Proteinuria is presented in the following categories: P+ - 150-500mg; P++ - 500-1000mg; P+++ - 1000-3500mg; P++++ - >3500mg. Biopsies were re-analyzed by two different pathologists without any clinical information of the recipient and were classified according to the most recent Banff classification criteria. C4d was performed for all biopsies.

Detection of IgG and Donor-Specific Antibody Characterization

Pre- and post-transplant sera were tested for Class I and Class II anti-HLA antibodies (SAB-IgG_{total}) with commercially available, Luminex® based Single Antigen Bead assay kits (LABScreen® Single Antigen LS1A04 and LS2A01; One Lambda, Inc.; Canoga Park, CA) per the manufacture's protocol and analyzed with HLA FUSION™ software (One Lambda, Inc.). A positive result was defined as a baseline normalized mean fluorescence intensity (MFI) greater than 500. Donor specificity for anti-HLA antibodies was determined by the comparison of the HLA antibody specificities with the HLA typing of the donor for HLA-A, - B, - DRB1, DRB3, 4 and 5, DQB1 and DQA1 *loci*. HLA typing for both patient and donor was performed by LABType® SSO (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA).

Detection of IgG subclasses

DSA positive samples were tested with a modified SAB assay to determine the IgG subclass of the antibody. The generic secondary antibody IgG_{total} (One Lambda, Inc.) was replaced by monoclonal secondary antibodies specific for IgG₁₋₄ subclasses conjugated with phycoerythrin (PE) (IgG₁ clone HP6001, IgG₂ clone 31-7-4, IgG₃ clone HP6050, IgG₄ clone HP6025; Southern Biotech, Birmingham, AL). A positive result was defined as an MFI above the cut off ratio that was generated for each individual bead of each subclass using three negative control sera (NC1-3) obtained from healthy, non-sensitized, anti-HLA antibody negative males and one commercially available negative control serum (NC4). The cut off ratio was calculated as follows: Cut off MFI = $2 * ((\text{mean NC1-4}) + 3 * (\text{Standard deviations NC1-4}))$; Cut off ratio = MFI/Cut off MFI. A ratio above five was considered positive.

Detection of complement-fixing antibodies

DSA positive samples were tested for C1q-binding anti-HLA antibodies (SAB-C1q) using commercially available kits (C1qScreen™, One Lambda, Canoga Park, CA). The serum samples were heat-treated (56°C for 30 minutes) to denature endogenous complement components and the test was performed per the manufacture's protocol. The analyses of C1q results were performed by HLA FUSION™ software (One Lambda, Inc.) following the interpretation method published by Tyan et al. ²².

Statistics

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 compared according to the presence of anti-HLA DSA C1q-binding status using the log-rank test. Allograft function was evaluated by comparing the means of groups with DSA C1q-binding and DSA without C1q-binding by ANOVA one-way on the following post-transplant days: 30, 180, 365, 730, 1095, 1460 and 1825. We further applied repeated-measures ANOVA to evaluate the variance in eGFR MDRD over time after transplant according to the

presence of DSA C1q-binding. All statistical analyses were performed using MedCalc for Windows, version 13.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Study population demographics

Patient characteristics according to C1q donor specific antibodies (DSA) status are shown on table 1. Patients with C1q DSA positive at any time during the study were included in the group DSA+C1q+. We tested a mean of twelve serum samples per patient from pre-transplant up to five years after transplantation for the presence of DSA. In the post-transplant evaluation, anti-HLA class II DSA was more frequent than class I alone and classes I and II together. IgG subclasses were primarily found in combinations, IgG1 being the most frequent. C1q-binding was detected in three pre-transplant patients, two of whom continued to present during the post-transplant period. Four patients presented C1q-binding during post-transplant monitoring, and two of these presented pre-transplant DSA, while two formed post-transplant DSA (figure 2). Four patients presented antibody mediated rejection (ABMR), three pre-sensitized and one with *de novo* DSA. T-cell mediated rejection (TCMR) occurred in two patients, both with *de novo* DSA. Two patients lost their allograft, one with pre-formed DSA, and one with *de novo* DSA. Three patients died during the study, two with functioning allografts and one who developed DSA, C1q-binding, and ABMR.

Mean Fluorescence Intensity (MFI) of IgG total and C1q-binding according to IgG subclass groups

We analyzed 1598 beads with positive reactions in IgG total for anti-HLA class I, and 2087 positive reactions for anti-HLA class II antibodies. In 630 (39.4%) of class I beads, and 899 (43.1%) of class II beads with low MFI, it was not possible to define the IgG subclass. IgG1 was the predominant IgG subclass found either alone or in combinations with other subclasses; 811 (50.8%) for class I and, 1091 (52.3%) for class II antibodies. C1q-binding reactions showed a higher MFI when IgG1 and IgG3 were positive (table 2).

Pre-transplant IgG subclass pattern, C1q-reactivity and previous sensitization

Twenty-one patients had pre-formed DSA. Pre-transplant antibody profile and sensitization are shown on table 3. Previous sensitization information was not available for two patients. Patients with only transfusions or only pregnancies presented IgG1 and/or IgG3 with lower MFI, while patients with both transfusion and pregnancy or previous transplant presented a broader antibody profile with an higher MFI ($p < 0.00001$) (table 4). 90.7% of the positive beads in previously transplanted patients had IgG2 and IgG4 in its composition and 64.3% of the positive bead reactions in patients with pregnancy plus transfusion presented IgG1 and IgG3 ($\chi^2=97.504$; $p < 0.0001$). C1q-binding was detected in six pre-transplant patients, of these, two were DSA. Patients with C1q-binding antibodies were sensitized by transfusions and pregnancy, or previous transplantation.

Post-transplant changes in IgG subclass patterns and C1q-reactivity

Pre-sensitized patients

Table 5 shows post-transplant evolution of preformed DSA for each patient with the changes in DSA IgG subclasses, ability to bind C1q, allograft function, and clinical events over time during follow up. Patients number 2, 6 and 17 had pre-formed C1q-binding DSA; but only patients 2 and 17 remained positive after transplantation. Patient 17 presented antibody mediated rejection (ABMR) with minimal (10%) C4d deposition. Patients 4 and 20 were pre-sensitized after multiple transfusions and pregnancies and developed post-transplant C1q-binding DSA showing an increase in MFI values and changes in IgG subclasses patterns, C4d deposition, and antibody mediated rejection (ABMR). Patient 20 lost the allograft before completing 1 year of transplant.

De novo DSA patients

Table 6 shows the post-transplant follow-up for patients that developed DSA after transplantation, with the changes of IgG subclasses, ability to bind C1q, allograft function, and clinical events. Patients 22 and 25 formed C1q-binding DSA. The first anti-HLA DSA detected in patient number 22 was on day 90 after transplant with no C1q-binding, followed by an increase in MFI and change in the

subclass profile from IgG1 and/or IgG3 to all subclasses and C1q-binding. This patient developed ABMR and lost the allograft before completing 2 years of transplant.

C1q reactivity and allograft function and survival

Allograft function over time was evaluated by comparing the mean eGFR MDRD by period (figure 3A) and by ANOVA repeated measurements (figure 3B). Patients with C1q binding anti-HLA donor specific antibodies (DSA) showed lower allograft function from the first year of transplant through the fifth year. Allograft loss was only observed in patients with C1q binding anti-HLA DSA (100% survival rate at five years for DSA+C1q- patients compared to 71.4% survival rate for patients DSA+C1q+).

DISCUSSION

In the present study, we sequentially followed thirty patients with anti-HLA donor specific antibodies (DSA) (mean of twelve samples per patient) to evaluate characteristics such as HLA class, IgG subclass, C1q-binding ability, changes in reaction patterns over time after transplant, time of antibody mediated rejection (ABMR), cellular mediated rejection (TCMR), and allograft dysfunction. All transplants required a negative T- and B-cell CDC-XM at the time of transplantation. The presence of DSA of any MFI value was not a counter indication for transplantation.

In pre- and post-transplant sera, IgG1 was the most common IgG subclass. Pre-sensitized patients showed different compositions of IgG subclasses according to the cause of sensitization. Patients sensitized by only transfusion or pregnancies had anti-HLA antibodies of IgG1 and/or IgG3 subclasses, while patients with both transfusion and pregnancies and previous transplant showed a broader range of IgG subclasses. This is in accordance with data presented by Lowe et al.¹⁹

We found IgG3 more frequently than IgG2 in post-transplant sera rather than the expected order of the IgG subclass concentration IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4²³. The evaluation of sequential sera allowed for detection of subclasses at different stages of the immune response. We hypothesize that like other

diseases, such as membranous glomerulonephritis,^{24,25} development of ABMR and its progression is related to subclass switching. There were also differences between patients with pre-formed DSA and *de novo* DSA, in which *de novo* DSA were primarily made up of IgG1 and IgG3 alone. Only one patient with *de novo* DSA presented ABMR, and subsequently, allograft dysfunction. The first IgG detected was a class II DSA of IgG3 subclass with no C1q-binding ability *in vitro*. We subsequently detected all subclasses and C1q binding in the next serum, which presented ABMR features in the tissue with minimal C4d deposition. It has been suggested that subclass switching occurs first from IgM to IgG3 and then to IgG1, IgG2, and IgG4. In many responses early antigen clearance would prevent the appearance of IgG2 and IgG4.¹² IgG2 and IgG4 were detected, but only in combination with other subclasses, demonstrating an evolution of the immune response. The presence of IgG2 and IgG4 was shown in elutes of rejected renal allografts confirming sequential subclass switching¹⁶. Moreover, there seemed to be a correlation between the occurrence of ABMR and the expansion of complement-fixing to non-complement fixing DSA.¹⁵

Another important observation was that despite the high prevalence of IgG1 subclass, C1q-binding was found in less than 15% of the sera tested, and only in the presence of high MFI IgG1 or, most frequently, in the presence of a combination of all four subclasses. As recently shown by Schaub et al., C1q-binding is related to anti-HLA antibody density, and furthermore, a great number of HLA antibodies found in sera that do not induce C1q-binding *in vitro* do, however, contain C-binding IgG subclasses (IgG1 and IgG3).¹¹ The presence of all four subclasses can indicate a higher antibody concentration, thus providing higher density for C1q-binding. The presence of a high concentration of antibodies sequentially binding to antigens leads to hexamer formation that binds to C1q with higher avidity than monomeric IgG, inducing activation of the complement system.²⁶

Antibody mediated rejection is one of the leading causes of allograft failure.²⁷ Although the presence of DSA implies risk for ABMR, long-term survival of patients with DSA has been reported.^{28,29} Despite our small population number, we observed that most patients diagnosed with ABMR presented an increase in MFI, changes in IgG subclasses, and C1q-binding DSA. Loupy et al reported that

patients with donor specific C1q-binding DSA present lower allograft survival within 5-years of follow-up when compared to non-complement-binding DSA and non-DSA patients.¹⁰ Moreover, pediatric kidney recipients with *de novo* C1q DSA reactivity showed higher rates of rejection and increased risk of allograft loss.³⁰ The presence of a combination of IgG subclasses with C1q-binding DSA could also be related to ABMR occurrence, and diminished allograft function. It was previously shown that liver transplant patients with IgG subclass combinations containing IgG3 presented allograft survival that was significantly lower than patients who presented a single IgG subclass. Changes in the profile of antibodies during post-transplant follow-up demonstrate the importance of close anti-HLA DSA monitoring after transplantation.³¹ Moreover, the presence of different subclasses can indicate distinct phenotypes of ABMR. IgG4-containing DSA was associated with features of subclinical ABMR, while IgG3-containing DSA was associated with an acute form of ABMR and represented a greater risk for allograft loss.¹⁹

Our study presents certain limitations, including the small population and testing at different time points with different lots of SAB for DSA. In addition, we were unable to evaluate denatured antigens to confirm the IgG subclass negative reactions.

Recently, three different stages of ABMR were described by molecular diagnosis of kidney biopsies; early-stage ABMR, fully-formed ABMR, and late-stage ABMR.³² Understanding the natural evolution of anti-HLA antibodies during the process of ABMR and correlating to its stages is essential to define treatment. Although our data is not conclusive, we demonstrate that there is a progression of the immune response and it can begin at the sensitization cause and may consequently lead to allograft loss. These insights should be considered if patients are not consistently monitored for anti-HLA antibodies after transplantation. Thus, a single time point evaluation after transplantation may not be sufficient to provide all the information needed to make clinical decisions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Vera Lucia Bertoldi, Patrícia Soldera, Michele Cavalheiro, and Denise Dener for their support during clinical data

collection at the Hospital Universitário Evangélico de Curitiba as well as Dr. Iria Visoná from the Department of Pathology at the Universidade Federal de São Paulo for assistance with the biopsy materials.

REFERENCES

1. Tait BD, Hudson F, Cantwell L, Brewin G, Holdsworth R, Bennett G, Jose M: Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology* 14:247–54, 2009
2. Gibney EM, Cagle LR, Freed B, Warnell SE, Chan L, Wiseman AC: Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephrol Dial Transplant* 21:2625–9, 2006
3. Dunn TB, Noreen H, Gillingham K, Maurer D, Ozturk OG, Pruett TL, Bray RA, Gebel HM, Matas AJ: Revisiting traditional risk factors for rejection and allograft loss after kidney transplantation. *Am J Transplant* 11:2132–43, 2011
4. Becker LE, Süsal C, Morath C: Kidney transplantation across HLA and ABO antibody barriers. *Curr Opin Organ Transplant* 18:445–54, 2013
5. Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M: Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. *Am J Transplant* 14:255–71, 2014
6. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, Pratschke J, Rudolph B, Schimidt D, Salama A, Schönemann C: Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* 87:1505–1513, 2009
7. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, Gautreau C, Charron D, Glotz D, Suberbielle-Boissel C: Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 21:1398–406, 2010

8. Bosch A, Llorente S, Diaz JA, Salgado G, López M, Boix F, López-Hernández R, González-Soriano MJ, Campillo JA, Moya-Quiles MR, Perez-Lopez N, Minquela A, Jimeno L, Alvarez-López MR, Muro M: Low median fluorescence intensity could be a nonsafety concept of immunologic risk evaluation in patients with shared molecular eplets in kidney transplantation. *Hum Immunol* 73:522–525, 2012
9. Higgins R, Lowe D, Hathaway M, Lam F, Kashi H, Tan LC, Imray C, Fletcher S, Chen K, Krishnan N, Hamer R, Zehnder D, Briggs D: Rises and falls in donor-specific and third-party HLA antibody levels after antibody incompatible transplantation. *Transplantation* 2009 87:882–8, 2009
10. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, van Huyen J-PD, Mooney N, Suberbielle C, Frémeaux-Bacchi V, Méjean A, Desgrandchamps F, Anglicheau D, Nochy D, Charron D, Empana JP, Delahousse M, Legendre C, Glotz D, Hill GS, Zeevi A, Jouven X: Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* 369:1215–26, 2013
11. Schaub S, Hönger G, Koller MT, Liwski R, Amico P: Determinants of C1q binding in the single antigen bead assay. *Transplantation* (Epub ahead of print), 2014
12. Collins AM, Jackson KJL: A temporal model of human IgE and IgG antibody function. *Front Immunol* 4:235, 2013
13. Stavnezer J: Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol* 8:199–205, 1996
14. Stavnezer J, Guikema JEJ, Schrader CE: Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 26:261–292, 2008
15. Arnold M-L, Ntokou I-S, Doxiadis II, Spriewald BM, Boletis JN, Iniotaki AG: Donor specific HLA antibodies: Evaluating the risk for allograft loss in renal transplant recipients with isotype switch from complement fixing IgG1/IgG3 to non-complement fixing IgG2/IgG4 anti HLA alloantibodies. *Transpl Int* 3:253–261, 2013

16. Heinemann FM, Roth I, Rebmann V, Arnold ML, Witzke O, Wilde B, Spriewald BM, Grosse-Wilde H: Immunoglobulin isotype-specific characterization of anti-human leukocyte antigen antibodies eluted from explanted renal allografts. *Hum Immunol* 68:500–506, 2007
17. Arnold M-L, Dechant M, Doxiadis IIN, Spriewald BM: Prevalence and specificity of immunoglobulin G and immunoglobulin A non-complement-binding anti-HLA alloantibodies in retransplant candidates. *Tissue Antigens* 72:60–66, 2008
18. Amico P, Hönger G, Mayr M, Schaub S: Detection of HLA-antibodies prior to renal transplantation: prospects and limitations of new assays. *Swiss Med Wkly* 138:33-34, 2008
19. Lowe D, Higgins R, Zehnder D, Briggs DC: Significant IgG subclass heterogeneity in HLA-specific antibodies: Implications for pathogenicity, prognosis, and the rejection response. *Hum Immunol* 74:666–672, 2013
20. Lachmann N, Schönemann C: The differential pathogenicity of HLA antibodies: what a large cross-sectional study can tell us. *Clin Transpl* 2013 377–84, 2013
21. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong Van Huyen JP, Verney D, Aubert O, Verine J, Jouven X, Legendre C, Glotz D, Loupy A, Zeevi A: IgG donor-specific anti-human HLA antibody subclasses and kidney allograft antibody-mediated injury. *J Am Soc Nephrol* 27(1):293-304, 2016
22. Tyan DB, Chen G: Technical Foundation of the C1q Assay and its Clinical Significance for Transplant Outcomes. *ASHI Quarterly* 24–29, 2013
23. Schroeder HW, Cavacini L: Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 125:S41–52, 2010
24. Qu Z, Cui Z, Liu G, Zhao M: The distribution of IgG subclass deposition on renal tissues from patients with anti-glomerular basement membrane disease. *BMC Immunol* 14-19, 2013

25. Huang CC, Lehman A, Albawardi A, Satoskar A, Brodsky S, Nadasdy G, Hebert L, Rovin B, Nadasdy T: IgG subclass staining in renal biopsies with membranous glomerulonephritis indicates subclass switch during disease progression. *Mod Pathol* 26:799–805, 2013
26. Diebold C, Beurskens FJ, de Jong RN, Koning RI, Strumane K, Lindorfer M, Voorhorst M, Ugurlar D, Rosati S, Heck AJ, van de Winkel JG, Wilson IA, Koster AJ, Taylor RP, Saphire EO, Burton DR, Schuurman J, Gros P, Parren PW: Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* 343:1260–3, 2014
27. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, Hidalgo LG, Famulski K, Matas A, Halloran PF: Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* 12:388–99, 2012
28. Bentall a, Cornell LD, Gloor JM, Park WD, Gandhi MJ, Winters JL, Chedid MF, Dean PG, Stegall MD: Five-year outcomes in living donor kidney transplants with a positive crossmatch. *Am J Transplant* 13(1):76–85, 2013
29. Riella L V, Safa K, Yagan J, Lee B, Azzi J, Najafian N, Abdi R, Milford E, Mah H, Gabardi S, Malek S, Tullius SG, Magee C, Chandraker A: Long-term outcomes of kidney transplantation across a positive complement-dependent cytotoxicity crossmatch. *Transplantation* 97:1247–52, 2014
30. Sutherland SM, Chen G, Sequeira F a, Lou CD, Alexander SR, Tyan DB: Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatr Transplant* 16:12–7, 2012
31. Kaneku H, Leary JGO, Taniguchi M, Susskind BM: Donor-specific human leukocyte antigen antibodies of the immunoglobulin G3 subclass are associated with chronic rejection and allograft loss after liver transplantation. *Liver Transpl* 18(8):984–92, 2012
32. Halloran PF, Reeve J, Akalin E, Aubert O, Bohmig GA, Brennan D, Bromberg J, Einecke G, Eskandary F, Gosset C, Duong Van Huyen JP,

Gupta G, Lefaucheur C, Malone A, Mannon RB, Seron D, Sellares J, Weir M, Loupy A: Real time Central assessment of kidney transplant indication biopsies by microarrays: the INTERCOMEX study. Am J Transplant 17(11):2851-2862, 2017

FIGURES

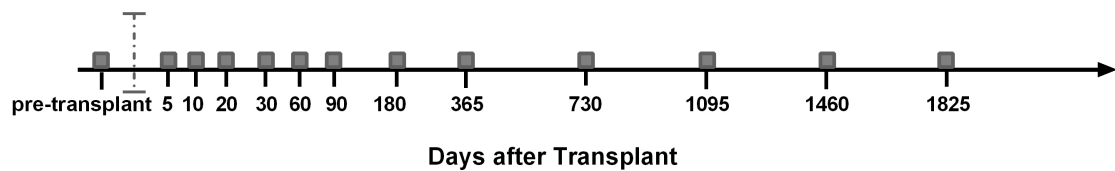


Figure 1. Sera samples collected during prospective post-transplant monitoring.

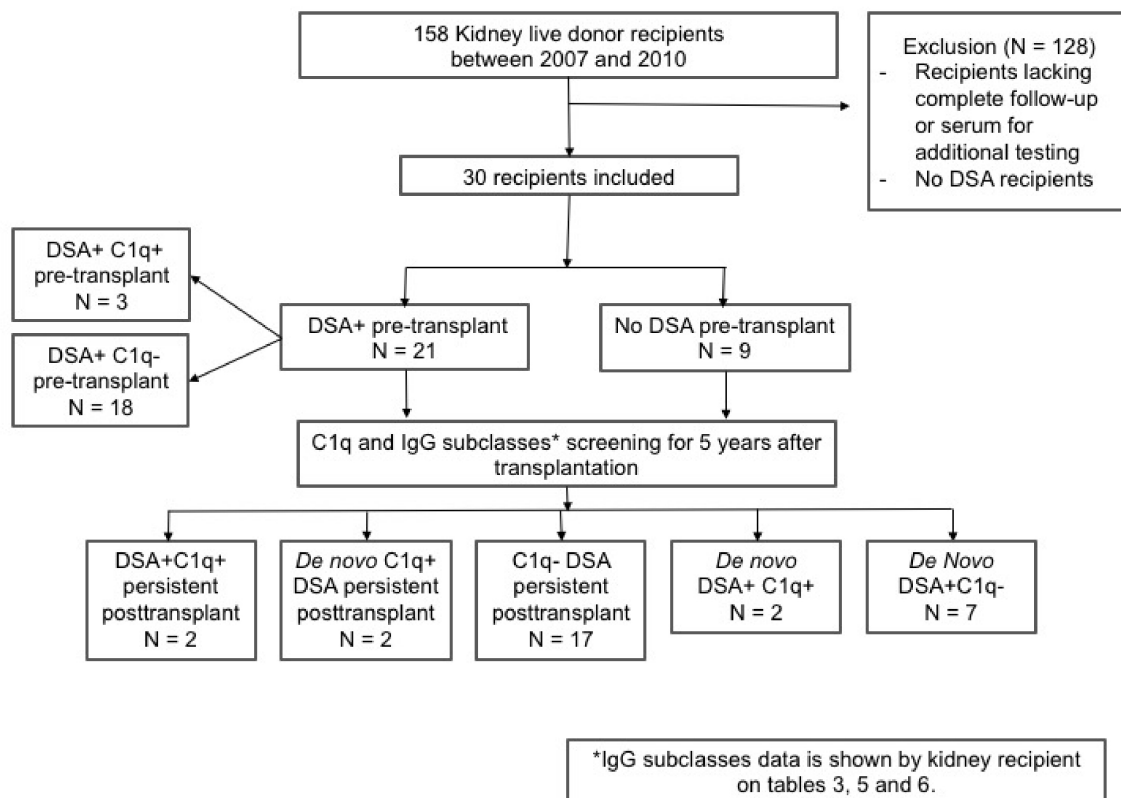


Figure 2. Study population according to anti-HLA donor specific antibody and C1q-binding status. DSA – Donor specific antibody; C1q+ - C1q-binding positive; C1q- - C1q-binding negative.

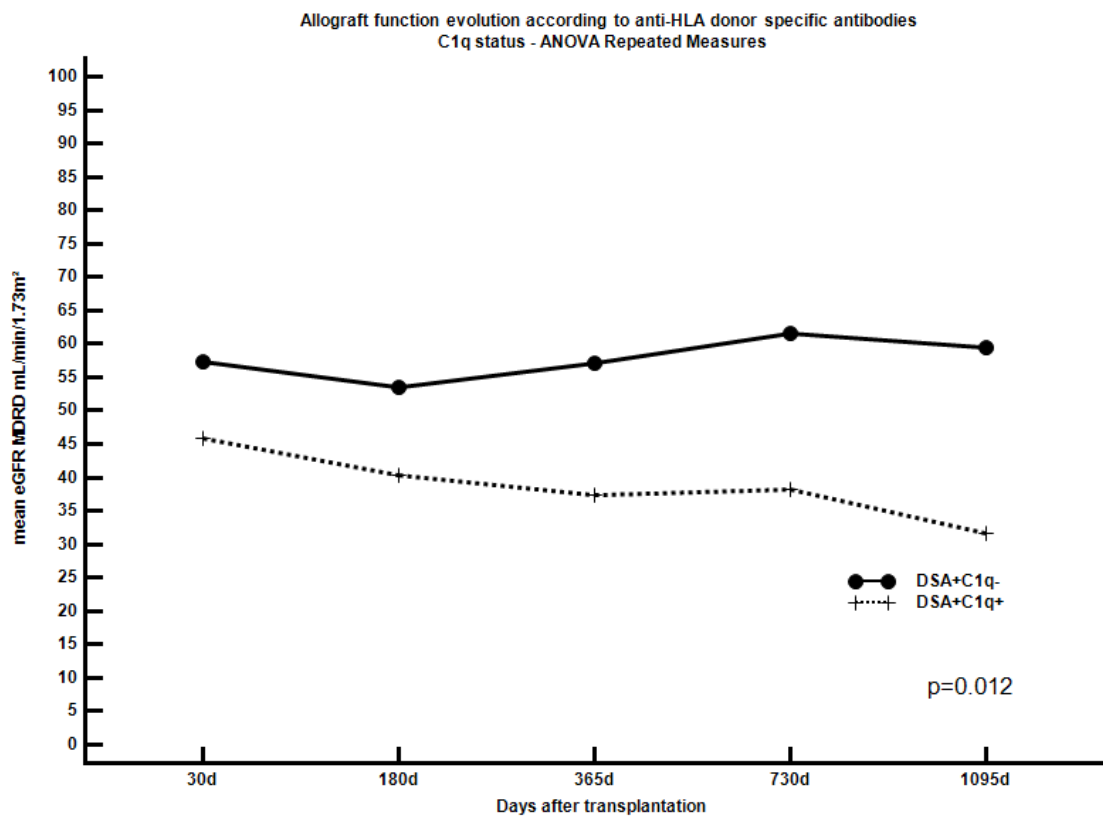
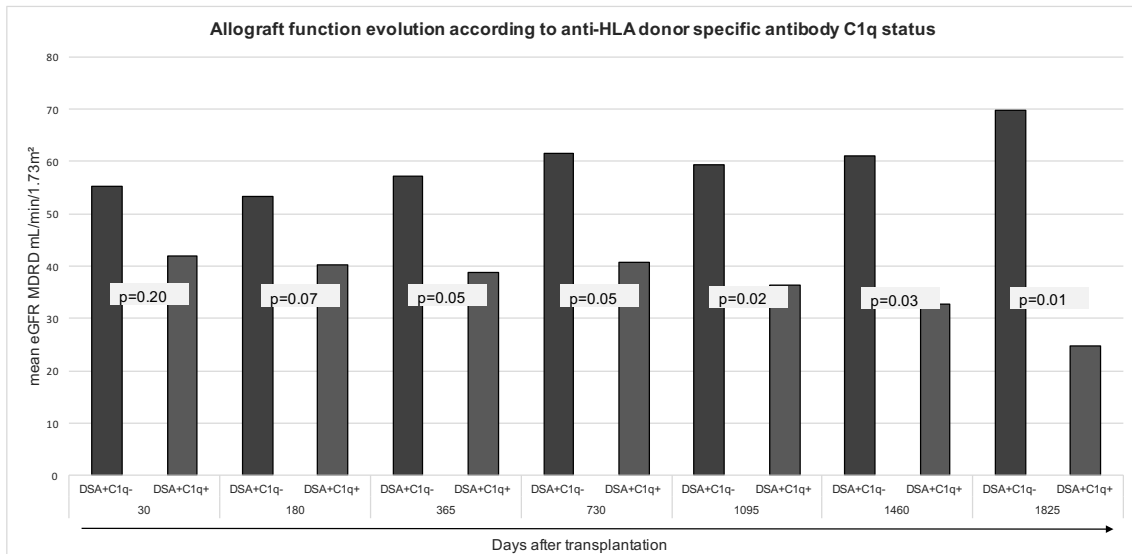


Figure 3. Evolution of allograft function. A. Comparison of means of allograft function measured by estimated glomerular filtration rate (eGFR) by Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) according to the presence

of anti-HLA donor specific antibodies with or without C1q-binding by each period of time evaluated. B. Evolution of allograft function over time evaluated by ANOVA repeated measures according to C1q-binding status.

TABLES

TABLE 1. Patient Demographics

Characteristics		All patients	DSA+C1q-	DSA+C1q+	P value
N total	n (%)	30 (100)	23 (76.7)	7 (23.3)	
Female	n (%)	17 (56.7)	12 (52.2)	5 (71.4)	0.38
Age (years)	mean±SD	42.17 ±13.70	41.09 ±13.82	45.71 ±13.68	0.44
Transplant type					
Live unrelated	n (%)	12 (40.0)	8 (34.8)	4 (57.1)	0.30
Live related	n (%)	18 (60.0)	15 (65.2)	3 (42.9)	
Previous Sensitization					
Transfusions	median (min-max)	2.0 ±2.9	2.1 ±3.2	1.8 ±2.2	0.85
Pregnancies N=17	median (min-max)	3 (0-19)	2.5 (0-19)	3.0 (2-9)	0.38
Regrafts	n (%)	3 (10.0)	3 (13.0)	0	0.32
HLA Compatibility					
No. Mismatches	mean±SD	4.23±1.48	4.2 ±1.6	4.4 ±1.1	0.70
PRA	mean±SD	56.6±39.8	54.9 ±38.4	62.1 ±46.8	0.68
Clinical Events					
Induction therapy	n (%)	17 (56.7)	15 (65.2)	2 (28.6)	0.09
Dialysis time (days)	median (min-max)	730 (0-4380)	700 (0-3650)	1278 (153-4380)	0.22
Diabetes	n (%)	1 (3.3)	1 (4.3)	0	0.58
Hypertension	n (%)	20 (66.7)	15 (65.2)	5 (71.4)	0.76
Follow up time (days)	median (min-max)	1801.5 (289-2176)	1833 (951-2176)	1770 (289-1914)	0.33
Infection	n (%)	20 (66.7)	15 (65.2)	5 (71.4)	0.76
Graft loss	n (%)	2 (6.7)	0	2 (28.6)	0.009
Patient death	n (%)	3 (10.0)	2 (8.7)	1 (14.3)	0.67
Histological Factors					
ABMR	n (%)	4 (13.3)	0	4 (57.1)	0.0001
TCMR	n (%)	2 (6.7)	2 (8.7)	0	0.63
CsA Nephropathy	n(%)	1 (3.3)	1 (4.3)	0	0.58
BKV Nephropathy	n (%)	4 (13.3)	4 (17.4)	0	0.24

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). ABMR, antibody-mediated rejection; TCMR, T-cell mediated rejection; BKV, BK virus; CsA, cyclosporine; DSA, donor-specific antibodies.

TABLE 2. Mean Fluorescence Intensity in SAB IgG total and SAB C1q by groups of IgG subclasses.

Anti-HLA antibody IgG subclass composition	No subclass	Ig G1	Ig G2	Ig G3	Ig G4	IgG1+Ig G2	IgG1+Ig G3	IgG1+Ig G4	IgG3+Ig G4	IgG2+Ig G4	IgG1+IgG2+ IgG3	IgG1+IgG2+ IgG4	IgG1+IgG3+ IgG4	IgG1+IgG2+IgG3 +IgG4
Number of anti-HLA Class I IgGt positive Beads*	630	44 1	17	78	39	96	121	37	22	1	5	1	25	85
Mean MFI IgGt Class I	1780	49 31	45 12	<u>76</u> <u>10</u>	16 64	<u>6411</u>	<u>8882</u>	1938	2981	1902	<u>8530</u>	2518	<u>9292</u>	<u>10310</u>
Mean MFI C1q Class I	57	79 0	49	12 73	64	1538	<u>6433</u>	89	234	43	3472	70	3125	<u>5751</u>
Number of anti-HLA Class II IgGt positive Beads*	899	51 1	1	39	54	123	65	123	2	1	68	110	3	88
Mean MFI IgGt Class II	2830	<u>64</u> <u>14</u>	29 16	21 36	26 19	<u>10112</u>	<u>6883</u>	<u>9843</u>	2040	<u>9364</u>	<u>9140</u>	<u>10547</u>	<u>11033</u>	<u>6604</u>
Mean MFI C1q Class II	31	10 40	36	58	40	<u>5748</u>	4881	682	22	22	<u>10422</u>	4516	1585	<u>9308</u>

*All beads with mean fluorescence intensity above 500 were considered.

SAB - Single antigen beads; HLA - Human leucocyte antigens; IgGt - Immunoglobulin G total; MFI - Mean fluorescence intensity

TABLE 3. Pre-transplant antibody profile

Patient ID	Pre-transplant antibody profile					
	Sensitization	PRA (%)	HLA class	Anti-HLA Antibodies (IgGt MFI-IgG subclass)	Anti-HLA Antibodies IgGt+ with no subclass (MFI)	C1q binding (MFI)
1	Transfusion	76%	II	DQ7(3)* (2934-IgG1)		Negative
2	Not Known	44%	I	<u>B12* (2121-IgG1)</u> B8 (2297 -IgG1) B37 (1851-IgG1+IgG2) B41 (2666-IgG1) B42 (2609-IgG1) <u>B82 (4529-IgG1)</u>		B12* (3083) B37 (4001) B82 (6173)

3	Transfusion +Pregnancies	84%	II	DR53* (4717-IgG3)	DR9* (4547) DR18 (738) DR7 (4471) DR52 (1544) DQA1*03:01 (621) DQB1*03:02/DQA1*01:01 (2613)	Negative
<hr/>						
4	Transfusion +Pregnancies	97%	I and II	A9* (2238-IgG1) B27 (719-IgG1) B39 (743-IgG1) B45(728-IgG1) B21 (677) B22 (1140) B67 (691-IgG1+IgG4) DR3* (6255-IgG1+IgG2) DR4 (1259- IgG4) DR7 (3372-IgG1+IgG4) DR8 (3188-IgG1) DR9 (2905-IgG1) DR5 (5626-IgG1+IgG2+IgG4) DR6 (8787- IgG1+IgG2) DR52 (3826-IgG1+IgG4) DQB1*03:01/DQA1*05:03/DQA1*05:05 (927-IgG4)	A10* (699) B8* (1268) B14 (1165) B15 (677) B70 (661) B42 (964)B81 (676) B82 (801)	Negative
<hr/>						
5	Previous Transplantation	98%	II	DR4* (7611-IgG1+IgG2+IgG4) DR53* (12593-IgG1+IgG2+IgG4) DR1 (5963- IgG1+IgG2+IgG4) DR7 (13794-IgG1) DR9 (11016-IgG1+IgG4) DR10 (8489- IgG1+IgG4) DR14 (6518-IgG1) DR15(2) (9958-IgG1+IgG2+IgG4) DR16(2) (9434-IgG1+IgG4) DR51 (13501-IgG1+IgG2+IgG4) DR12 (3498- IgG1) DQB1*05:01/DQA1*01:01 (6696- IgG1+IgG2+IgG4) DQB1*05:02/DQA1*01:02 (6056) (IgG1+IgG2+IgG4)	DR1 (5901) DR7 (1171) DR9 (1436) DR10 (1225) DR15(2) (726) DR16(2) (772) DR51 (1088) DQB1*05:01/DQA1*01:01 (2209)	
<hr/>						

6	Transfusion +Pregnancies	99%	I	<p>A1* (3502-IgG1) A2 (6686-IgG1+IgG2+IgG3) A3 (5745-IgG1) A11 (4895-IgG1) A9(6821-IgG1+IgG2+IgG3) A10 (5367-IgG1+IgG2) A*3201 (5550-IgG1+IgG2) A19 (2967-IgG1) A36 (2967-IgG1) A28 (12043-IgG1+IgG2+IgG3) A80 (1640-IgG1) B13 (3633-IgG1+IgG2) B15 (4174-IgG1+IgG2) B27 (4158-IgG1+IgG2) B37 (2879-IgG1) B16 (3972-IgG1+IgG2) B39 (1866-IgG1) B12 (3455-IgG1+IgG2) B47 (2999-IgG1) B21 (6413-IgG1+IgG2) B5 (3771-IgG1+IgG2) B53 (4898-IgG1+IgG2) B17 (7543-IgG1+IgG2) B59 (3475-IgG1+IgG2)</p>	<p>A1* (5011) A2(11698) A3 (7811) A11 (3735) A9 (8866) A10 (928) A19(1193) A36 (4659) A28 (12043) A80 (868) B15 (1203) B37 (777) B16 (1821) B5 (1408) B53 (1137) B17 (6075) B59 (1019)</p>	
7	Transfusion	40%	I	<p>B7* (3998-IgG1) B27 (2650-IgG1) B81 (3915-IgG1)</p>	<p>B13(1008) B40 (939) B42 (2059) B48 (1122) B22 (2530) B67 (738)</p>	Negative
8	Transfusion +Pregnancies	80%	I	<p>A28* (5207-IgG1+IgG2+IgG3) A2 (10752-IgG1+IgG2+IgG3+IgG4) B15 (IgG1+IgG2) B12 (4339-IgG1+IgG2) B45 (10609-IgG1+IgG2+IgG4) B17 (2533-IgG1) B82 (7116-IgG1+IgG2)</p>	<p>B13 (964) B21(1996)</p>	<p>A2 (327)</p>

9	Transfusion	86%	I	B7 (3951-IgG1+IgG3) B27 (1743-IgG1+IgG3) B40 (935-IgG3) B42 (1760-IgG3) B48 (1208-IgG3) B81 (3746-IgG1+IgG2)	B13* (665) A10 (667) B15 (818) B12 (940) B22 (637) B67 (1486) B82 (916)	Negative
---	-------------	-----	---	--	---	----------

10	Transfusion +Pregnancies	72%	I	A1* (3689-IgG1+IgG3) A3 (1437-IgG1+IgG3) A11(1540-IgG1+IgG3) A9 (1195-IgG1+IgG3) A36 (2431-IgG12+IgG3) A80 (1587-IgG1+IgG3)	B15 (759)	Negative
----	--------------------------	-----	---	--	-----------	----------

HLA antibodies are shown in serologic groups; *Anti-HLA donor specific antibodies are highlighted.

HLA - Human leucocyte antigen; MFI - Mean fluoresce intensity; IgGt - Immunoglobulin total.

TABLE 3. Pre-transplant antibody profile Continued...

Pre-transplant antibody profile						
Patient ID	Sensitization	PRA (%)	HLA class	Anti-HLA Antibodies (IgGt MFI-IgG subclass)	Anti-HLA Antibodies IgGt+ with no subclass (MFI)	C1q binding (MFI)

11	Not Known	20%	I		A19* (2051) B40 (1102)	Negative
----	-----------	-----	---	--	------------------------	----------

12	Transfusion	31%	II		DQ7(3)* (1401)	Negative
----	-------------	-----	----	--	----------------	----------

13	Transfusion	75%	II	DQA1*01:01 (1743-IgG1) DQA1*01:03 (2210-IgG1)	DQA1*01:02* (1942)	Negative
----	-------------	-----	----	--	--------------------	----------

14	Pregnancy	80%	I and II	A10 (2477-IgG1+IgG3) DQ7(3)* (4084-IgG1) DR18(3) (616-IgG3)	A9 (1757) A19 (3117) B13 (1455) B15 (2429) B27 (2318) B37 (1862) B16 (1129) B12 (1326) B47 (2170) B21(3583) B5 (1374) B53 (2763) B17 (2069) B59 (1339)	Negative
----	-----------	-----	----------	---	---	----------

15	Transfusion +Pregnancies	80%	II		DQ6(1)* (852) DQ5(1) (787)	Negative
----	-----------------------------	-----	----	--	----------------------------	----------

16	Transfusion	82%	II		DQB1*03:02* (969)	Negative
----	-------------	-----	----	--	-------------------	----------

17	Transfusion +Pregnancies	95%	II	DR13* (5988-IgG1) <u>DQ6*(1)</u> (12651- <u>IgG1+IgG2+IgG3+IgG4</u>) DR1 (2002-IgG1) DR17(3) (2211- IgG1) DR4 (1612-IgG1) DR52 (3616-IgG1) <u>DQ5(1)</u> (15245- <u>IgG1+IgG2+IgG3</u>) DQB1*03:03 (3251-IgG1)	DR9 (686) DR11(5) (2022) DR15(2) (867) DR16(2) (2917) DR51 (1511) DQB1*03:02 (1813) DQB1*03:03 (1061) DR12(5) (2317)	DQB1*05:01/DQA1*01:01 (5541) DQ6(1)* (6198)
18	Transfusion +Pregnancies	83%	II	DQ7(3)* (8610-IgG1) DR2 (4033-IgG1)	DR51 (1235)	Negative
19	Previous Transplantation	100%	I and II	A*30(19) (1539-IgG4) A3 (1492-IgG4) A11 (2051-IgG4) <u>A10 (7769- IgG1+IgG2+IgG3+IgG4)</u> A31(19) (1813-IgG4) <u>A33(19)</u> (7859- <u>IgG1+IgG2+IgG3+IgG4</u>) A36 (4660-IgG1) <u>A28 (7609- IgG1+IgG2+IgG3+IgG4)</u> A74 (1686-IgG4) <u>B8(4184- IgG1+IgG4)</u> B*1302 (13) (2640-IgG1+IgG4) B18 (2044- IgG1+IgG4) B27 (2058-IgG4) <u>B37 (2896-IgG1+IgG4)</u> <u>B40</u> (1731-IgG1+IgG4) B42 (1523- IgG4) B45 (2035-IgG4) B*5001(21) (2392-IgG4) B*5401(22) (1936-IgG4) B*5601(22) (7265- <u>IgG1+IgG2+IgG4)</u> B59 (1154- IgG4) B67 (827-IgG4) B82 (6233-IgG4) DR8 (4812-IgG3) <u>DQ4 (7257- IgG1+IgG2+IgG3+IgG4)</u> DQB1*03:01 (7076- IgG1+IgG2+IgG3+IgG4) <u>DQB1*02:01/DQA1*05:01</u> (12111- <u>IgG1+IgG2+IgG3+IgG4</u>) <u>DQB1*02:01/DQA1*04:01</u> (20509 (IgG1+IgG2+IgG4) <u>DQB1*05:01/DQA1*</u> <u>01:01(17565-</u>	A1 (1464) A29(19) (1788) A32(19) (827) A43 (977) B15 (2653) B70 (704) B12 (748) B48 (708) B*4901(21) (1251) B*5501(22) (5407) B*1301 (13) (1057) DR1 (901) DR3 (2360) DR9 (929) DR11 (1188) DR13 (951) DR14 (963) DR15(2) (661) DR16(2) (608) DR4 (675) DR12(5) (3350) DR52 (1179) DR53 (772) DR51 (741) DQB1*02:02/DQA1*0201 (4367) DQB1*02:01(DQA1*02:01- DQA1*03:01) (2340) DQ7(3) (5370) DQ6(1) (1396)	A10 (4115) A33(19) (5903) A36 (3336) A28 (7950) B8 (706) B37 (843) B*4002(40) (1102) B22 (1821) DQB1*02:01/DQA1*05:01 (11087) DQB1*02:01/ DQA1*04:01 (5442) DQ4 (5677) DQB1*03:01 (12259) DQB1*05:01/DQA1*01:01 (776)

IgG1+IgG2+IgG3+IgG4)
 DQB1*05:02/DQA1*01:02 (
 10329-IgG1)

20	Transfusion +Pregnancies	100%	I and II	<p>A2* (8999-IgG1+IgG2) B17* (4805-IgG1) A9 (2592-IgG1) A28 (3166-IgG1) B12 (2059- IgG1) B45 (2979-IgG1) DR1 (15463-IgG1) DR3 (5603- IgG1) DR4 (12401- IgG1+IgG2) DR9 (11137- IgG1+IgG2) DR10 (12200- IgG1) DR11(5) (6668-IgG1) DR13(6) (7063-IgG1) DR15(2) (18684- IgG1+IgG2+IgG3) DR16(2) (15346- IgG1+IgG2) DR51* (13992-IgG1+IgG2) DR52* (6935-IgG1) DQ6(1)* (2549- IgG1) DQ5(1)* (1885-IgG1)</p>	<p>B15 (2109) B46 (1455) B73 (2153) DR12(5) (3335) DR14(6) (3377) DQ7(3) (1135)</p>	Negative
----	-----------------------------	------	----------	--	--	----------

21	Previous Transplantation	94%	I and II	<p>B39* (5347-IgG2) B7 (3709- IgG2) B8 (5913-IgG2) B15 (4883-IgG2) B70 (5021-IgG2) B18 (4667-IgG2) B27 (6772- IgG2) B35 (5066-IgG2) B39 (5347-IgG2) B40 (3001-IgG2) B45 (5637-IgG2) B48 (3570- IgG2) B21 (5456-IgG2) B67 (4295-IgG2) B81 (4532-IgG2)</p>	<p>B14 (3892) B16 (1784) B42 (5984) B46 (1857) B22 (4969) B73 (2701) B78 (4146) B82 (3167) DR9* (628) DR12(5) (608) DQA1*01:01/01:02/01:03* (765)</p>	Negative
----	-----------------------------	-----	----------	--	---	----------

HLA antibodies are shown in serologic groups; *Anti-HLA donor specific antibodies are highlighted.

HLA - Human leucocyte antigen; MFI - Mean fluorescence intensity; IgGt - Immunoglobulin total.

TABLE 4. Groups of anti-HLA antibodies IgG subclasses found in pre-transplant sera according with previous sensitization

		Groups of IgG subclasses on pre-transplant sera										
Sensitization cause	No subclasses	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG1+IgG2	IgG1+IgG3	IgG1+IgG4	IgG2+IgG4	IgG1+IgG2+IgG3	IgG1+IgG2+IgG4	IgG1+IgG2+IgG3+IgG4
Not Known	number Beads	6	5			1						
	mean MFI IgGt	1577	2844			1851						
	SD MFI IgGt	±536,4	±968									
Transfusion	number Beads	45	10	4		3						
	mean MFI IgGt	1362	2937	1234		3400						
	SD MFI IgGt	±825.2	±989.4	±366		±783.6						
Pregnancies	number Beads	24	6	1		1						
	mean MFI IgGt	2258	4184	616		2477						
	SD MFI IgGt	±1080.3	±2019.9									
Transfusion +Pregnancy	number Beads	68	78	5	40	11	4		10	1	6	
	mean MFI IgGt	1735	5919	1127	7655	2346	3271		9425	10609	12149	
	SD MFI IgGt	±1098.3	±3967.5	±473.8	±4404.1	±1533.5	±1947.8		±4846.3		±2102.0	
Previous Transplantation	number Beads	70	6	16	1	17		12	1	1	15	17
	mean MFI IgGt	2184	7320	4523	4812	2051		7535	9364	6177	9119	8045
	SD MFI IgGt	±2646.7	±3953.2	±1303.6	±1208.1			±4714.3			±4651.7	±3571.9

Number of all beads with mean fluorescence intensity values over 500 were included in this analysis. HLA - Human Leucocyte Antigens; IgGt - Immunoglobulin G total; MFI - Mean Fluorescence Intensity; SD - Standard Deviation.

TABLE 5. Posttransplant antibody monitoring results of pre-sensitized patients

Patient ID	Induction Therapy	Number days post-transplant	Donor-specific antibody profile	C1q-binding	eGFR MDRD	Proteinuria	C4d	Biopsies (BANFF 2017 score)
1	T	0	DQ7(3) (2934-IgG1)	negative				
		5	DQ7(3) (1148-IgG1)	negative	44	P+		
		16	DQ7(3) (1290-IgG1)	negative	74			
		30	DQ7(3) (930-IgG1)	negative	82			
		76	DQ7(3) (2297-IgG1)	negative	69			
		94	DQ7(3) (1362-IgG1)	negative	68			
		184	DQ7(3) (878-IgG1)	negative	54			

		549	DQ7(3) (2297-IgG1)	negative	75		
		757	DQ7(3) (891-IgG1)	negative	73		
		0	B*44:02 (2121-IgG1)	B*44:02 (3083)			
		3	B*44:02 (3111-IgG1)	B*44:02 (7116)	4	P++++	
		16	B*44:02 (5958-IgG1)	B*44:02 (3477)	33		
		27	B*44:02 (6960-IgG1)	B*44:02 (6680)	68		
		90	B*44:02 (3475-IgG1)	B*44:02 (1063)	70	P++	
2	N	164	B*44:02 (5035-IgG1)	B*44:02 (1058)	68		
		369	B*44:02 (8892-IgG1)	negative	60		
		540	B*44:02 (2102-IgG1)	negative	79	negative	No Rejection
		842	B*44:02 (1678-IgG1)	negative	44		
		1266	B*44:02 (3334-IgG1)	B*44:02 (1084)	47		
		1432	B*44:02 (4029-IgG1)	negative	66		
		0	DR9 (4547) DR53 (4717-IgG3)	negative			
		3	DR9 (1266)	negative	14	P+	
		8	DR9 (1742-IgG1) DR53 (1138)	negative	76	P+	
3	P	13	DR9 (1647-IgG1) DR53 (10231-IgG12)	negative	65	P+	
		38	DR53 (9607-IgG12)	negative	74	P+	
		90	DR53 (7348-IgG12)	negative	59		
		742	DR9 (756) DR53 (4174)	negative	56		
		0	A*24:02 (1847 - IgG1) A*26:01 (695) B*08:01 (1269) DRB1*03:01 (9329 - IgG12) DRB1*13:01 (9111 - IgG12) DR52 (3827 - IgG124)	negative			
		3	negative	negative	61		
		7	A*24:02 (8396 - IgG123) A*26:01 (7633 - IgG1) B*08:01 (5418 - IgG123) B*38:01 (10487 - IgG12) DRB1*03:01 (5101 - IgG12) DRB1*13:01 (11961 - IgG12) DR52 (10547 - IgG124) DQ2 (8770 - IgG1234)	A*24:02 (15962) B*08:01 (15495) DRB1*03:01 (16216) DRB1*13:01 (5928) DR52 (4135)	24	P++	
4	N	11	A*24:02 (5726 - IgG1234) A*26:01 (7749 - IgG1234) B*08:01 (4799 - IgG123) B*38:01 (12140 - IgG123) DRB1*03:01 (6852 - IgG123) DRB1*13:01 (14181 - IgG123) DR52 (12924 - IgG1234) DQ2 (13217 - IgG1234)	A*24:02 (11306) A*26:01 (7682) B*08:01 (11467) B*38:01 (7437) DRB1*03:01 (16344) DRB1*13:01 (11553) DR52 (10752) DQ2 (7436)	12	P++	

30		A*24:02 (7919 - IgG1234) A*26:01 (2380 - IgG13) B*08:01 (9730 - IgG123) B*38:01 (2537) DRB1*03:01 (9382 - IgG12) DRB1*13:01 (7822 - IgG12) DR52 (7161 - IgG14) DQ2 (11639 - IgG1234)	A*24:02 (12165) DRB1*03:01 (6995) DQ2 (1178)	4	P++++		
218		A*24:02 (1664) DRB1*03:01 (1269) DR52 (1263) DQ2 (1139)	negative	17	P+++	C4d+++	ABMR (cg0; ci1; ct1; cv1; ah1; mm0)
390		DRB1*03:01 (781) DR52 (1020) DQ2 (824)	negative	30	P+		
745		negative	negative	40	P+		
0		DRB4*01:01 (12416 - IgG14) DRB1*04:05 (9364- IgG24)	negative				
15		DRB4*01:01 (9998 - IgG14) DRB1*04:05 (1798-IgG4)	negative	70			
20		DRB4*01:01 (8793 - IgG14) DRB1*04:05 (1427-IgG4)	negative	95			
28		DRB4*01:01 (8427 - IgG14) DRB1*04:05 (688-IgG4)	negative	94			
52		DRB4*01:01 (13247 - IgG4) DRB1*04:05 (1614-IgG4)	negative	72			
92		DRB4*01:01 (9069 - IgG4) DRB1*04:05 (1001-IgG4)	negative	69			
210		DRB4*01:01 (7985 - IgG4) DRB1*04:05 (500-IgG4)	negative	68			
368		DRB4*01:01 (7717 - IgG4) DRB1*04:05 (727-IgG4)	negative	70			
509		DRB4*01:01 (9913 - IgG4) DRB1*04:05 (650-IgG4)	negative	59	P+		
754		DRB4*01:01 (8746 - IgG4) DRB1*04:05 (545)	negative	72			
0		A*01:01 (3502 - IgG1) B*39:01 (1866 - IgG1)	A*01:01 (5011)				
3		A*01:01 (5304 - IgG1) B*39:01 (859)	negative	5			
5		A*01:01 (2061 - IgG1)	negative	3	P++		
30		A*01:01 (4736 - IgG1) DQA1*01:02 (1979)	negative	19	P++		
61		A*01:01 (7846 - IgG1) B*39:01 (1591) DQA1*01:02 (1952 - IgG2)	negative	50	P+		
89		A*01:01 (3680 - IgG1) B*39:01 (862) DQA1*01:02 (1493 - IgG2)	negative	33	P++		
190		A*01:01 (5022 - IgG1)	negative		P+		
562		A*01:01 (3016 - IgG1)	negative	47	P+	negative	No Rejection
761		A*01:01 (4178 - IgG1)	negative	56	P+		
0		B*07:02 (3998 - I gG1)	negative				
3		negative	negative	23			
10		B*07:02 (1499 - IgG1)	negative	25	P+		
20		negative	negative	35			
23		B*07:02 (924 - IgG1)	negative	36			
27		B*07:02 (726 - IgG1)	negative	36			

Induction therapy: N - None; T - Thymoglobulin; I - anti-IL2mAb; P - Prednisone; OKT3 - MuronAb-CD3. eGFR (MDRD) - Estimated Glomerular Filtration Rate (Modification of Diet in Renal Disease Formula). ABMR - Antibody Mediated Rejection. TCMR - T-cell Mediated Rejection. Proteinuria - P+ - 150-500mg; P++ - 500-1000mg; P+++ - 1000-3500mg; P++++ - >3500mg. C4d - C4d+ - minimal deposition (<10%); C4d++ - focal deposition (10-50%); C4d+++ - diffuse (>50%).

TABLE 5. Posttransplant antibody monitoring results of pre-sensitized patients Continued...

Patient ID	Induction Therapy	Number days post-transplant	Donor-specific antibody profile	C1q-binding	eGFR MDRD	Proteinuria	C4d	Biopsies (BANFF 2017 score)
8	T	0	A*68:02 (5080 - IgG12)	negative				
		5	negative	negative	35			
		14	negative	negative	45			
		18	negative	negative	43			
		20	negative	negative	61			
		35	negative	negative	53			
		60	negative	negative	60			
		125	negative	negative	53			
		938	negative	negative	32			
		1048	negative	negative	22			
		1227	negative	negative	17			
9	N	0	B*13:02 (665)	negative				
		3	negative	negative	72			
		10	B*13:02 (1022)	negative	102			
		23	negative	negative	109			
		79	negative	negative	85			
		362	negative	negative	58			
		708	negative	negative	76			
10	T	0	A*01:01 (3689 - IgG13)	negative				
		6	A*01:01 (11681 - IgG13)	negative	53			
		10	A*01:01 (5370 - IgG13)	negative	66			
		19	A*01:01 (5481 - IgG13)	negative	66			
		29	A*01:01 (2710 - IgG13)	negative	51			
		69	A*01:01 (3688 - IgG13)	negative	64	P+		
		138	A*01:01 (2829 - IgG13)	negative	41			

		208	A*01:01 (897 - IgG3)	negative	49
		0	A*31:01 (2228)	negative	
		10	A*31:01 (5571 - IgG1)	negative	27
		20	A*31:01 (2739 - IgG1)	negative	109
		63	A*31:01 (1630)	negative	98
11	T	90	A*31:01 (1814)	negative	97
		176	A*31:01 (1503)	negative	51
		358	A*31:01 (1479)	negative	79
		601	A*31:01 (1500)	negative	93
		772	A*31:01 (1166)	negative	93
		0	DQB1*03:01 (3278)	negative	
		5	DQB1*03:01 (1380)	negative	33
		12	DQB1*03:01 (1058)	negative	45
		29	negative	negative	61
12	N	56	negative	negative	56
		92	negative	negative	60
		196	negative	negative	57
		390	negative	negative	52
		548	negative	negative	65
		0	DQB1*06:09/DQA1*01:02 (2706 - IgG1)	negative	
		11	DQB1*06:09/DQA1*01:02 (1298)	negative	4
13	P	15	DQB1*06:09/DQA1*01:02 (3797)	negative	12
		20	DQB1*06:09/DQA1*01:02 (6663 - IgG13)	negative	12
		30	DQB1*06:09/DQA1*01:02 (5989 - IgG13)	negative	12
		0	B*37:01 (1862) DQB1*03:01 (4396 - IgG1)	negative	
		5	B*37:01 (1110) DQB1*03:01 (3724 - IgG1)	negative	54
		16	DQB1*03:01 (4120 - IgG1)	negative	54
		20	DQB1*03:01 (5951 - IgG1)	negative	62
14	I	35	DQB1*03:01 (2189 - IgG1)	negative	51
		63	DQB1*03:01 (912 - IgG1)	negative	46
		180	DQB1*03:01 (4952 - IgG1)	negative	51
		365	DQB1*03:01 (1666 - IgG1)	negative	57
15	P	0	DQB1*06:03/DQA1*01:03 (1002)	negative	

	10		B*51:01 (1017) DQB1*06:03/DQA1*01:03 (2390 - IgG1)	negative	74		
	15		B*51:01 (1168) DQB1*06:03/DQA1*01:03 (1838 - IgG1)	negative	74		
	64		negative	negative	57		
	88		negative	negative	60		
	730		negative	negative	46		
	0		DQB1*03:02 (1527)	negative			
	5		DQB1*03:02 (1713)	negative	8		
	15		DQB1*03:02 (1606)	negative	43		
	30		DQB1*03:02 (1645)	negative	62		
16	N		DQB1*03:02 (3602)	negative	86		
	142		DQB1*03:02 (2086)	negative	26	negative	Acute Pyelonephritis (i1; t2; v0; g0; cv1; cg0; mm0; ah0; ptc0)
	180		DQB1*03:02 (2794)	negative	18	P+	
	600		DQB1*03:02 (1503)	negative	34	P++	

Induction therapy: N - None; T - Thymoglobulin; I - anti-IL2mAb; P - Prednisone; OKT3 - MuronAb-CD3. eGFR (MDRD) - Estimated Glomerular Filtration Rate (Modification of Diet in Renal Disease Formula). ABMR - Antibody Mediated Rejection. TCMR - T-cell Mediated Rejection. Proteinuria - P+ - 150-500mg; P++ - 500-1000mg; P+++ - 1000-3500mg; P++++ - >3500mg. C4d - C4d+ - minimal deposition (<10%); C4d+++ - focal deposition (10-50%); C4d+++ - diffuse (>50%).

TABLE 5. Posttransplant antibody monitoring results of pre-sensitized patients

Continued...TABLE 5. Posttransplant antibody monitoring results of

Patient ID	Induction Therapy	Number days post-transplant	Donor-specific antibody profile	C1q-binding	eGFR MDRD	Proteinuria	C4d	Biopsies (BANFF 2017 score)
		0	DRB1*13:01 (5635 - IgG1) DQA1*01:02 (13658 - IgG1234)	DQA1*01:02 (5624)				
		17	DRB1*13:01 (11917 - IgG123) DQA1*01:02 (6413 - IgG12)	DRB1*13:01 (9888) DQA1*01:02 (12744)	42	P++++		
17	T	21	DRB1*13:01 (13771 - IgG1234) DQA1*01:02 (7283 - IgG123)	DRB1*13:01 (11436) DQA1*01:02 (16646)	51	P++		
		626			27	P+	C4d+	ABMR (i2; t1; v0; g2; cv0; cg2; mm1; ah0; ptc2)
18	T	0	DQB1*03:01 (9486 - IgG1)	negative				

		3	DQB1*03:01 (5427 - IgG1)	negative	69	P++		
		15	DQB1*03:01 (3453 - IgG1)	negative	55			
		21	DQB1*03:01 (1821 - IgG1)	negative	52			
		83	DQB1*03:01 (2906 - IgG1)	negative	66	P+		
		169	DQB1*03:01 (2417 - IgG1)	negative	79	P+		
		289	DQB1*03:01 (1367 - IgG1)	negative	55			
		362	DQB1*03:01 (1386 - IgG1)	negative	48			
		519	DQB1*03:01 (1489 - IgG1)	negative	49		negati ve	No Rejection
		0	A*30:02 (723) A*32:01 (827) B*44:02 (808) B*49:01 (1251) DQA1*02:01 (6773 - IgG124)	negative				
		3	B*49:01 (1101) DQA1*02:01 (6060 - IgG124)	negative	37			
		6	DQA1*02:01 (3874 - IgG124)	negative	45			
		10	DQA1*02:01 (3606 - IgG124)	negative	46			
		17	DQA1*02:01 (6811 - IgG124)	negative	48			
19	T	27	DQA1*02:01 (3839 - IgG124)	negative	48			
		35	DQA1*02:01 (4880 - IgG124)	negative	40			
		60	DQA1*02:01 (4220 - IgG124)	negative	29			
		137	DQA1*02:01 (5331 - IgG124)	negative	45			
		272	DQA1*02:01 (6806 - IgG124)	negative	57		negati ve	No Rejection
		553	DQA1*02:01 (5996 - IgG124)	negative	57	P+		
		0	A*02:01 (6635 - IgG123) B*57:01 (4483 - IgG1) DRB1*16:01 (15645 - IgG12) DRB1*11:04 (6595 - IgG1) DQB1*03:01 (1372) DQA1*01:02 (2282 - IgG1) DRB3*02:02 (7956 - IgG1) DRB5*02:02 (17446 - IgG12)	negative				
		5	A*02:01 (3059 - IgG123) DRB1*16:01 (5639 - IgG1) DRB1*11:04 (640) DQB1*03:01 (2245 - IgG1) DQA1*01:02 (1549 - IgG1) DRB3*02:02 (904 - IgG1) DRB5*02:02 (6902 - IgG1)	negative	56			
20	T	20	A*02:01 (9031 - IgG123) B*57:01 (6911 - IgG123) DRB1*16:01 (14525 - IgG12) DQB1*03:01 (10766 - IgG123) DQA1*01:02 (12558 - IgG12) DRB3*02:02 (6181 - IgG1) DRB5*02:02 (11126 - IgG123)		6	P+		
							A*02:01 (7179) B*57:01 (1861) DRB1*16:01 (1534) DQA1*01:02 (754) DRB5*02:02 (12402)	

30		A*02:01 (10933 - IgG123) B*57:01 (6616 - IgG123) DRB1*16:01 (11727 - IgG13) DRB1*11:04 (5157 - IgG1) DQB1*03:01 (8207 - IgG123) DQA1*01:02 (8923 - IgG12) DRB3*02:02 (4754 - IgG1) DRB5*02:02 (7161 - IgG123)	A*02:01 (17486) B*57:01 (14806) DRB1*16:01 (3005) DQA1*01:02 (3203) DRB5*02:02 (14071)	6	P+		
75		A*02:01 (3403 - IgG123) DRB1*16:01 (9213 - IgG123) DRB1*11:04 (2694 - IgG1) DQB1*03:01 (5696 - IgG123) DQA1*01:02 (4533 - IgG123) DRB3*02:02 (3442 - IgG1) DRB5*02:02 (1926 - IgG123)	A*02:01 (1044) DRB1*16:01 (6240) DQA1*01:02 (16002) DRB5*02:02 (17436)	10	P++		
90		A*02:01 (7201 - IgG123) B*57:01 (1073) DRB1*16:01 (14792 - IgG123) DRB1*11:04 (5106 - IgG1) DQB1*03:01 (12126 - IgG123) DQA1*01:02 (14310 - IgG12) DRB3*02:02 (6660 - IgG1) DRB5*02:02 (13504 - IgG123)	A*02:01 (7201) DRB1*16:01 (4935) DQB1*03:01 (14664) DQA1*01:02 (15387) DRB5*02:02 (15590)	12	P+++	C4d++ +	ABMR (i2; t2; v0; g1; cv0; cg0; mm0; ah0; ptc3)
191		A*02:01 (1958 - IgG123) DRB1*16:01 (12159 - IgG123) DRB1*11:04 (1040) DQB1*03:01 (4805 - IgG123) DQA1*01:02 (6732 - IgG123) DRB3*02:02 (2457 - IgG1) DRB5*02:02 (6732 - IgG123)	DRB1*16:01 (4090) DQB1*03:01 (16545) DQA1*01:02 (14796) DRB5*02:02 (8203)	12	P++	C4d++ +	ABMR (i2; t1; v0; g2; cv0; cg1; mm1; ah0; ptc2)
237		A*02:01 (3845 - IgG123) DRB1*16:01 (13954 - IgG13) DRB1*11:04 (1968) DQB1*03:01 (6511 - IgG123) DQA1*01:02 (6527 - IgG123) DRB3*02:02 (3604) DRB5*02:02 (6630 - IgG1)	not tested	12	P++		Allograft Loss
0		B*39:01 (5347 - IgG12)	negative				
5		negative	negative	48			
10		B*39:01 (4382 - IgG1) DRB1*09:01 (1318 - IgG1) DRB1*14:01 (974 - IgG1)	negative	50			
21	T	B*39:01 (4791 - IgG1234) DRB1*09:01 (1318 - IgG1) DRB1*14:01 (974 - IgG1)	negative	34			
390		negative	negative	50			
416		negative	negative	50			
751		negative	negative	43			

Induction therapy: N - None; T - Thymoglobulin; I - anti-IL2mAb; P - Prednisone; OKT3 - MuronAb-CD3. eGFR (MDRD) - Estimated Glomerular Filtration Rate (Modification of Diet in Renal Disease Formula). ABMR - Antibody Mediated Rejection. TCMR - T-cell Mediated Rejection. Proteinuria - P+ - 150-500mg; P++ - 500-1000mg; P+++ - 1000-3500mg; P++++ - >3500mg. C4d - C4d+ - minimal deposition (<10%); C4d++ - focal deposition (10-50%); C4d+++ - diffuse (>50%).

TABLE 6. Posttransplant antibody monitoring results of *de novo* DSA patients

Patient ID	Number days post-transplant	Donor-specific antibody profile	C1q-binding	eGFR MDRD	Proteinuria	C4d	Biopsies (BANFF 2017 score)	
	3	0	0	45				
	5	0	0	66				
	15	0	0	57				
	27	0	0	76				
	30	0	0	87				
	62	DQB1*03:01 (IgM)	0	53	P++			
	90	DR8 (1422-IgG3) DQB1*03:01 (790)	0	65	P++			
	22	182	B35 (IgM) B53 (IgM) DR8 (1978-IgG3) DRB1*03:01 (2200-IgG13)	DQB1*03:01 (3020)	59	P++	C4d+	ABMR (i2; t2; v0; g1; cv0; cg0; mm0; ah0; ptc1)
	432	A1 (869-IgG13) A36 (339-IgG13) DR8 (1541-IgG3) DQB1*03:01 (2546-IgG1234) DQA1*04:01 (2260-IgG1234)	A36 (627) DQB1*03:01 (11275) DQA1*04:01 (11138)	64	P++			
687	A1 (4164-IgG134) A36 (4498-IgG1234) B53 (820) DR8 (3373-IgG3) DQB1*03:01 (2989-IgG1234) DQA1*04:01 (9983-IgG1234)	A1 (4886) A36 (4131) DQB1*03:01 (8829) DQA1*04:01 (9543)	37	P++		Allograft Loss		
	10	0	0	62				
	13	0	0	48				
	23	20	0	44				
	27	0	0	40				
	1832	DQB1*03:03 (2523)	0	70				
	3	DQ2/DQA1*02:01 (3130)	0	51				
	5	0	0	54	P++			
	12	0	0	71				
	30	0	0	65				
	24	48	DQ2/DQA1*02:01 (876)	0	31			
	71	0	0	46				
	168	DQ2/DQA1*02:01 (1398)	0	55				
	365	0	0	66				
	580	DQ2/DQA1*02:01 (1071)	0	61				

	760	DQ2/DQA1*02:01 (1190)	0	53	
	1024	0	0	41	
	1189	0	0	43	
	1290	0	0	31	
	2	0	0	37	P+
25	5	0	0	42	P+
	8	0	0	59	P+
	1717	DQ5(1) (7601-IgG1)	DQ5(1) (1276)	71	
	10	DQB1*02:01/DQA1*05:01 (2477-IgG2)	0	31	
	15	DQB1*02:01/DQA1*05:01 (2916-IgG2)	0	35	P++
	30	0	0	43	
26	34	0	0	39	
	63	0	0	41	
	92	0	0	39	
	187	0	0	43	
	3	A3 (581)	0	61	
	5	A3 (624)	0	64	
	15	0	0	61	
	30	0	0	44	
27	183	0	0	46	
	474	0	0	22	
	489	0	0	27	
	524	0	0	32	
	564	0	0	32	
	13	0	0	61	
	15	0	0	58	
	18	0	0	53	
	26	0	0	57	
28	69	0	0	66	
	94	0	0	67	
	180	0	0	51	
	545	DQA1*05:01/02/03 (2675-IgG13)	0	48	
	736	DQA1*05:01/02/03 (2676-IgG1)	0	90	
	3	0	0	41	
29	5	0	0	32	

15	0	0		P++	negative	TCMR (IA - i2; t2; v0; g0; cv0; cg0; mm0; ah0; ptc1)
			36			
20	0	0	48	P+		
30	0	0	55			
34	DQB1*03:01 (1801-IgG3)	0	55			
56	DQB1*03:01 (678-IgG3)	0	47			
90	DQB1*03:01 (568-IgG3)	0	43			
515	0	0	56			
730	0	0	66			
3	0	0	5			
6	0	0	7			
10	0	0	4			
20	0	0	34			
22	0	0	46			
31	0	0	51			
68	0	0	53			
171	0	0	50			
374	0	0	54			
705	DQA1*03:02 (4707-IgG1)	0				TCMR (IFTA discreet; i1; t0; v0; g0; cv0; cg0; mm0; ah0; ptc0)
			52			
1329	DQA1*03:02 (1457-IgG1)	0	51	P++		

Induction therapy: N - None; T - Thymoglobulin; I - anti-IL2mAb; P - Prednisone; OKT3 - MuronAb-CD3. eGFR (MDRD) - Estimated Glomerular Filtration Rate (Modification of Diet in Renal Disease Formula). ABMR - Antibody Mediated Rejection. TCMR - T-cell Mediated Rejection. IFTA - Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy. Proteinuria - P+ - 150-500mg; P++ - 500-1000mg; P+++ - 1000-3500mg; P++++ - >3500mg. C4d - C4d+ - minimal deposition (<10%); C4d++ - focal deposition (10-50%); C4d+++ - diffuse (>50%).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dos 30 pacientes inseridos no estudo, 21 tinham DSA pré-formado e 9 formaram anticorpo como resposta ao transplante. Foram testados uma média de 12 soros por paciente em um total de 363 soros testados para a presença de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e fixação de C1q.

Na população estudada, a presença de DSA não afetou a sobrevida do enxerto. No entanto, aqueles pacientes com um espectro maior de subclasses de IgG especialmente quando apresentavam fixação de C1q “*in vitro*” apresentaram sobrevida do enxerto significativamente menor do que pacientes negativos ou com apenas IgG1 e ou IgG3. Esse dado corrobora com a hipótese inicial do trabalho de que existe uma progressão da resposta humoral de subclasses de IgG fixadoras para não fixadoras de complemento.

Além disso, apenas um paciente que formou anticorpos anti-HLA específicos contra o doador no pós-transplante progrediu para um perfil de rejeição mediada por anticorpos aguda e perda do enxerto. As mudanças de subclasses desse paciente são apresentadas na Figura 9. Este paciente foi diagnosticado por biópsia no terceiro dia após o transplante com rejeição celular. No 90º dia pós-transplante (PO) o primeiro DSA de classe II, IgG (IgG3) foi detectado. Prospectivamente, o soro do 60º PO negativo para IgG, foi testado para verificar a presença de IgM para classe II e este teste foi positivo. Subsequentemente, no soro do 180º PO, este paciente apresentava IgG1, IgG2 e IgG3 para classe II e IgM para classe I. O diagnóstico de RMA foi realizado no 413º PO a rejeição foi caracterizada como rejeição mista pela presença de lesões no tecido tanto de rejeição celular como rejeição humoral, além disso o paciente apresentava gradual redução na taxa de filtração glomerular (TFG). Neste período o paciente apresentava todas as subclasses para classe I e classe II e fixação de C1q, evoluindo para perda do enxerto e óbito com 2 anos de transplante.

A incidência de formação de anticorpos após o transplante renal é de aproximadamente 15% (HOURMANT et al., 2005), destes casos nem todos evoluem para um quadro de resposta humoral. Dessa forma, para estudar este tipo de resposta é necessário a elaboração de um estudo multicêntrico com um

número grande de pacientes com essas características para avaliar se a resposta imunológica se desenvolve dessa forma. No entanto, a resposta apresentada por esse paciente e os resultados mostrando o impacto na ocorrência de RMA, disfunção e perda do enxerto quando o paciente apresenta grupos de subclasses com fixação de C1q podem indicar que a resposta humoral evolui durante o tempo a partir de uma ativação do sistema imune gerando as lesões características de RMA que levam a perda do enxerto. A definição de tempo e mecanismos associados a essas trocas podem ajudar na elaboração de protocolos mais eficazes de tratamento e de seguimento de paciente transplantados renais.

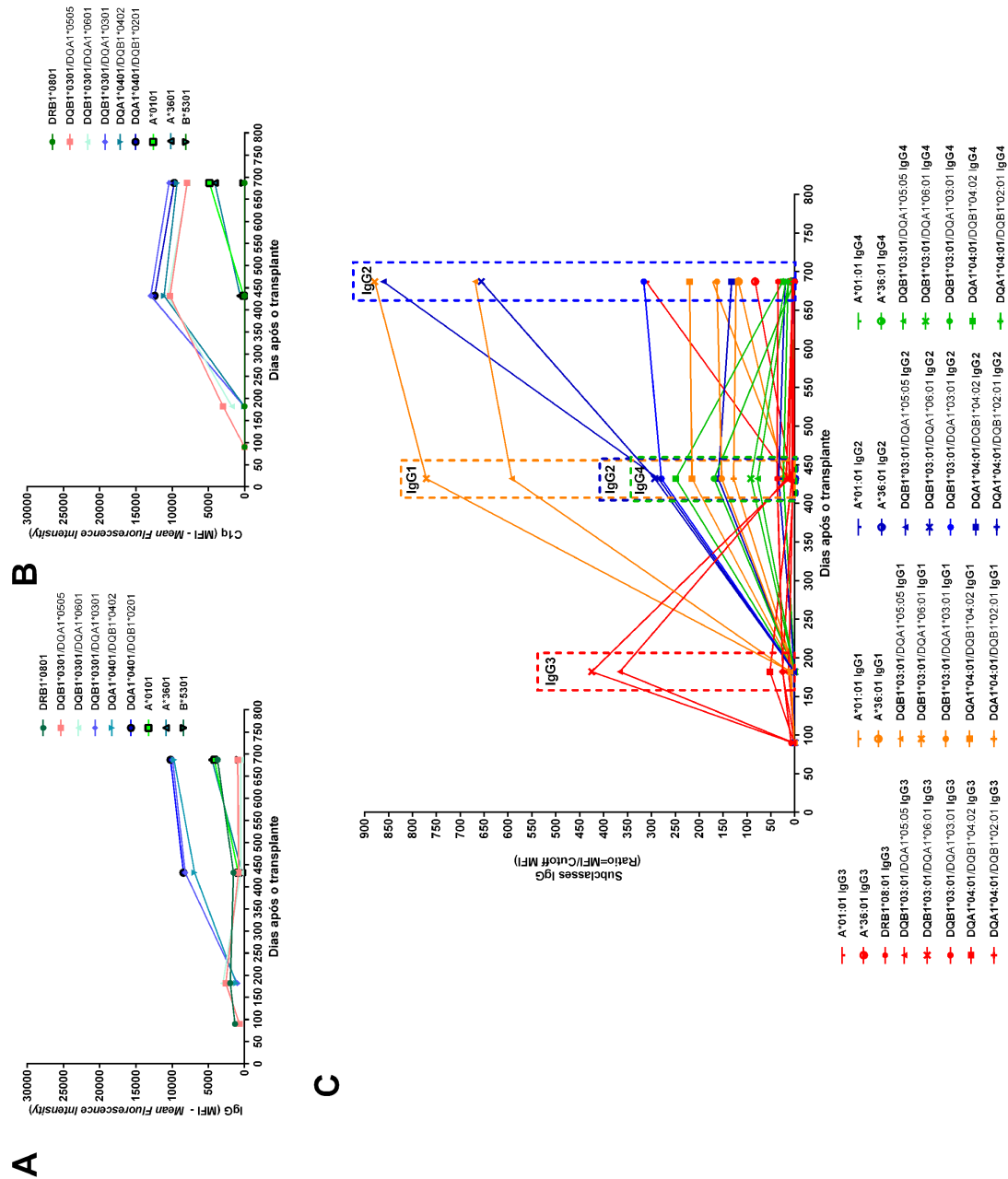


Figura 10. Evolução da resposta humoral após o transplante renal. A. Resultados de detecção de anticorpos anti-HLA por SAB e valores de MFI para IgG total. B. Resultados da detecção de fixação de C1q e valores de MFI. C. Resultados da detecção de subclasses de IgG apresentadas em *ratio* (MFI/Valor de corte MFI).

7 CONCLUSÕES

- A presença de um perfil de subclasses de IgG composto por fixadores e não fixadores de complemento, as mudanças de padrão de reação durante o tempo, e a habilidade em fixar C1q de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA) ocorreu principalmente em pacientes que tiveram rejeição mediada por anticorpos (RMA). Esses pacientes também apresentaram menor taxa de filtração glomerular.
- As modificações na metodologia de detecção de anticorpos anti-HLA por SAB (*Single Antigen Beads*) para detecção de subclasses de IgG apresentaram resultados satisfatórios, avaliando principalmente nas reações negativas. As subclasses de IgG estão presentes no soro de pacientes transplantados renais em diferentes concentrações e combinações. IgG1 foi a subclasse mais frequente nas reações positivas de IgG total.
- A ligação de C1q ao anticorpo anti-HLA ocorreu apenas na presença da subclasse do tipo 1, ou combinações com mais de três subclasses, especialmente com valores mais elevados de MFI (*Mean Fluorescence Intensity*).
- Não foi observada correspondência entre o valor de intensidade de fluorescência da IgG total com a positividade das subclasses ou com a ligação de C1q. No entanto, os valores de intensidade de fluorescência da ligação de C1q ao anticorpo estão associados aos valores de fluorescência da detecção de IgG1, mas não de IgG3 e IgG total.
- As mudanças no perfil de subclasses, assim como, a mudança na habilidade em fixar complemento parecem estar relacionadas à ocorrência de RMA. Assim, é importante o monitoramento sequencial de anticorpos para identificar mudanças de perfil.
- Pacientes que tiveram um diagnóstico de RMA e função renal diminuída apresentaram DSA com aumento na média de intensidade de fluorescência, mudança de perfil de subclasses e mudança na habilidade em fixar complemento durante o tempo de monitoramento e

antes do diagnóstico de RMA. A identificação dessas características específicas do DSA e suas mudanças ao longo do tempo podem levar a um diagnóstico mais preciso de RMA.

8 REFERÊNCIAS

ALBRECHT, E. A. et al. C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. **Am J. Pathol.**, v. 164, n. 3, p. 849–59, 2004.

ALBRECHT, E. A.; WARD, P. A. Complement-induced Impairment of the Innate Immune System During Sepsis. **Curr Infect Dis Rep**, v. 7, n. 5, p. 349–54, 2005.

AMICO, P. et al. Detection of HLA-antibodies prior to renal transplantation: prospects and limitations of new assays. **Swiss Med Wkly**, v. 138, n. 33-34, p. 472–76, 2008.

ARNOLD, M.-L. et al. Prevalence and specificity of immunoglobulin G and immunoglobulin A non-complement-binding anti-HLA alloantibodies in retransplant candidates. **Tissue antigens**, v. 72, n. 1, p. 60–66, 2008.

ARNOLD, M.-L. et al. Donor specific HLA antibodies: Evaluating the risk for graft loss in renal transplant recipients with isotype switch from complement fixing IgG1/IgG3 to non-complement fixing IgG2/IgG4 anti HLA alloantibodies. **Transpl Int**, v. 27, n. 3, p. 253–61, 2013.

AYNA, T. K. et al. Comparison of complement-dependent cytotoxic and flow-cytometry crossmatch results before cadaveric kidney transplantation. **Transplant Proc.**, v. 45, n. 3, p. 878-80, 2013.

BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Doença Renal Crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. **J Bras de Nefrol.**, v. 33, n. 1, p. 380–84, 2010.

BEARDEN, C. M. et al. Pronase treatment facilitates alloantibody flow cytometric and cytotoxic crossmatching in the presence of rituximab. **Hum Immunol.**, v. 65, n.8, p. 803–9, 2004.

BECKER, L. E.; SÜSAL, C.; MORATH, C. Kidney transplantation across HLA and ABO antibody barriers. **Curr Opin Organ Transplant.**, v. 18, n. 4, p. 445–54, 2013.

BENTALL, A. et al. Five-year outcomes in living donor kidney transplants with a positive crossmatch. **Am J Transplant.**, v. 13, n. 1, p. 76–85, 2013.

BINGAMAN, A W. et al. Single-center kidney paired donation: the Methodist San Antonio experience. **Am J Transplant.**, v. 12, n. 8, p. 2125–32, 2012.

BOSCH, A. et al. Low median fluorescence intensity could be a nonsafety concept of immunologic risk evaluation in patients with shared molecular eplets in kidney transplantation. **Hum Immunol.**, v. 73, n. 5, p. 522–25, 2012.

BRAY, R. A.; GEBEL, H. M.; ELLIS, T. M. Flow cytometric assessment of HLA alloantibodies. In ROBINSON, J. P. (Ed.) *Current protocols in cytometry*, Hoboken, NJ., Wiley Publishing, 2004. p.275-92.

BRÜGGEMANN, M. et al. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. **J Exp Med.**, v. 166, n. 5, p. 1351–61, 1987.

CHEN, G.; CHEN, S.; CHEN, X. Role of complement and perspectives for intervention in transplantation Immunobiology. **Immunobiology**, v. 218, n. 5, p. 817-27, 2013.

CHEN, G.; SEQUEIRA, F.; TYAN, D. B. Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. **Hum Immunol.**, v. 72, n. 10, p. 849–58, 2011.

CHIN, C. et al. Clinical usefulness of a novel C1q assay to detect immunoglobulin G antibodies capable of fixing complement in sensitized pediatric heart transplant patients. **J Heart Lung Transplant.**, v. 30, n. 2, p. 158–63, 2011.

COLLINS, A. B. et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. **J Am Soc Nephrol.**, v. 10, n. 10, p. 2208–14, 1999.

COLLINS, A. M.; JACKSON, K. J. L. A Temporal Model of Human IgE and IgG Antibody Function. **Front Immunol.**, v. 4, p. 235, 2013.

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

CORESH, J. et al. Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States. **JAMA**, v. 298, n. 17, p. 2038-47, 2007.

DIEBOLDER, C. A et al. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. **Science**, v. 343, n. 6176, p. 1260–3, 2014.

DJAMALI, A. et al. Diagnosis and Management of Antibody-Mediated Rejection: current status and novel approaches. **Am J Transplant.**, v. 14, n. 2, p. 255–71, 2014.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Res.**, v. 20, n. 1, p. 34–50, 2010.

DUNN, T. B. et al. Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. **Am J Transplant.**, v. 11, n. 10, p. 2132–43, 2011.

EINECKE, G. et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. **Am J Transplant.**, v. 9, n. 11, p. 2520–31, 2009.

FEUCHT, H. E. et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. **Clin Exp Immunol.**, v. 86, n. 3, p. 464–70, 1991.

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, n. 9, p. 1113–9, 2013.

FULLER, T. C. et al. HLA alloantibodies and the mechanism of the antiglobulin-augmented lymphocytotoxicity procedure. **Hum Immunol.**, v. 56, n. 1-2, p. 94–105, 1997.

GEBEL, H. M. et al. Donor-reactive HLA antibodies in renal allograft recipients: considerations, complications, and conundrums. **Hum Immunol.**, v. 70, n. 8, p. 610–7, 2009.

GIBNEY, E. M. et al. Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 21, n. 9, p. 2625–9, 2006.

GRENZY, P. C. et al. Antibodies against denatured HLA class II molecules detected in luminex-single antigen assay. **Hum Immunol.**, v. 74, n. 10, p. 1300–3, 2013.

HAAS, M. Pathologic features of antibody-mediated rejection in renal allografts: an expanding spectrum. **Curr Opin Nephrol Hypertens.**, v. 21, n. 3, p. 264–71, 2012.

HAAS, M. Pathology of C4d-negative antibody-mediated rejection in renal allografts. **Curr Opin Organ Transplant.**, v. 18, n. 3, p. 319–26, 2013.

HAAS, M. et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. **Am J Transplant.**, v. 14, n. 2, p. 272–83, 2014.

HAAS, M.; MIROCHA, J. Early ultrastructural changes in renal allografts: Correlation with antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. **Am J Transplant.**, v. 11, n. 10, p. 2123–31, 2011.

HALLORAN, P. L. et al. Real Time Central Assessment of Kidney Transplant Indication Biopsies by Microarrays: The INTERCOMEX Study. **Am J Transplant.**, v. 17, n. 11, p. 2851–2862, 2017.

HAYDE, N. et al. The clinical and molecular significance of C4d staining patterns in renal allografts. **Transplantation**, v. 95, n. 4, p. 580–8, 2013.

HEINEMANN, F. M. et al. Immunoglobulin isotype-specific characterization of anti-human leukocyte antigen antibodies eluted from explanted renal allografts. **Hum Immunol.**, v. 68, n. 6, p. 500–6, 2007.

HIGGINS, R. et al. Rises and falls in donor-specific and third-party HLA antibody levels after antibody incompatible transplantation. **Transplantation**, v. 87, n. 6, p. 882–8, 2009.

HÖNGER, G. et al. Pretransplant IgG subclasses of donor-specific human leukocyte antigen antibodies and development of antibody-mediated rejection. **Transplantation**, v. 92, n. 1, p. 41–7, 2011.

HÖNGER, G. et al. Frequency and determinants of pregnancy-induced child-specific sensitization. **Am J Transplant.**, v. 13, n. 3, p. 746–53, 2013.

HOSHINO, J. et al. Impact of the presence and duration of donor-specific antibodies on renal function. **Transplant Proc.**, v. 46, n. 1, p. 75–80, 2014.

HOURLMANT, M. et al. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. **J Am Soc Nephrol.**, v. 16, n. 9, p. 2804–12, 2005.

HUANG, C. C. et al. IgG subclass staining in renal biopsies with membranous glomerulonephritis indicates subclass switch during disease progression. **Mod Pathol.**, v. 26, n. 6, p. 799–805, 2013.

HYUN, J. et al. Effects of different sensitization events on HLA alloimmunization in solid organ transplantation patients. **Transplant Proc.**, v. 44, n. 1, p. 222–5, 2012.

KANEKU, H. et al. Donor-Specific Human Leukocyte Antigen Antibodies of the Immunoglobulin G3 Subclass Are Associated With Chronic Rejection and Graft Loss After Liver Transplantation. **Liver Transpl.**, v. 18, n. 8, p. 984–92, 2012.

KHODADADI, L.; ADIB, M.; POURAZAR, A. Immunoglobulin Class (IgG, IgM) Determination by Dithiothreitol in Sensitized Kidney Transplant Candidates. **Transplant Proc.**, v. 38, n. 9, p. 2813–15, 2006.

LACHMANN, N. et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. **Transplantation**, v. 87, n. 10, p. 1505–13, 2009.

LACHMANN, N.; SCHÖNEMANN, C. The differential pathogenicity of HLA antibodies: what a large cross-sectional study can tell us. **Clin Transpl.**, p. 377–84, 2013.

LEE, A. J. et al. Characterisation and comparison of health-related quality of life for patients with renal failure. **Curr Med Res Opin**, v. 21, n. 11, p. 1777–83, 2005.

LEFAUCHEUR, C. et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. **J Am Soc Nephrol.**, v. 21, n. 8, p. 1398–406, 2010.

LEFAUCHEUR, C. et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: A population-based study. **Lancet**, v. 381, n. 9863, p. 313–9, 2013.

LEFAUCHEUR, C. et al. IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. **J Am Soc Nephrol.**, v. 27, n. 1, p. 293-304, 2016.

LEVEY, A. S. et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. **Kidney Int.**, v. 80, n. 1, p. 17–28, 2011.

LI, F.; ATZ, M. E.; REED, E. F. Human leukocyte antigen antibodies in chronic transplant vasculopathy-mechanisms and pathways. **Curr Opin Immunol.**, v. 21, n. 5, p. 557-62, 2009.

LOBO, P. I. et al. The use of pronase-digested human leukocytes to improve specificity of the flow cytometric crossmatch. **Transpl Int.**, v. 8, n. 6, p. 472–80, 1995.

LOUPY, A et al. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). **Am J Transplant.**, v. 11, n. 1, p. 56–65, 2011.

LOUPY, A. et al. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. **Am J Transplant.**, v. 9, n. 11, p. 2561–70, 2009.

LOUPY, A. et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. **N Engl J Med.**, v. 369, n. 13, p. 1215–26, 2013.

LOUPY, A.; HILL, G. S.; JORDAN, S. C. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. **Nat Rev Nephrol.**, v. 8, n. 6, p. 348-57, 2012.

LOWE, D. et al. Significant IgG subclass heterogeneity in HLA-specific antibodies: Implications for pathogenicity, prognosis, and the rejection response. **Hum Immunol.**, v. 74, n. 5, p. 666–72, 2013.

MARKIEWSKI, M. M.; LAMBRIS, J. D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. **Am J Pathol.**, v. 171, n. 3, p. 715–27, 2007.

MENGEL, M. et al. Phenotypes of antibody-mediated rejection in organ transplants. **Transpl Int.**, v. 25, n. 6, p. 611–22, 2012.

MONSINJON, T. et al. Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. **FASEB J.**, v. 17, n. 9, p. 1003–14, 2003.

MONTGOMERY, R. A. et al. Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival. **N Engl J Med.**, v. 365, n. 4, p. 318-26, 2012a.

MONTGOMERY, R. A. et al. HLA incompatible renal transplantation. **Curr Opin Organ Transplant.**, v. 17, n. 4, p. 386-92, 2012b.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. **Science**, v. 310, n. 5753, p. 1510–12, 2005.

OTTEN, H. G. et al. The significance of pretransplant donor-specific antibodies reactive with intact or denatured human leucocyte antigen in kidney transplantation. **Clin Exp Immunol.**, v. 173, n. 3, p. 536-43, 2013.

KIDNEY DISEASE: IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO) CKD WORK GROUP. Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Kidney Int Suppl.**, v. 3, n. 1, p. 1–150, 2013.

PATEL, R.; TERASAKI, P. I. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. **N Eng J Med.**, v. 280, n. 14, p. 735–9, 1969.

PAUL, W. E. *Fundamental Immunology*. 5ª edição. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. p. 1603.

PECOITS-FILHO, R. Diagnóstico de Doença Renal Crônica: Avaliação da Função Renal. **J Bras Nefrol.**, v. XXVI, n. 3, p. 5–6, 2004.

PEI, R. et al. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. **Hum Immunol.**, v. 60, n. 12, p. 1293–302, 1999.

PEI, R. et al. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. **Transplantation**, v. 75, n. 1, p. 43–9, 2003.

PÖGE, U. et al. MDRD equations for estimation of GFR in renal transplant recipients. **Am J Transplant.**, v. 5, n. 6, p. 1306–11, 2005.

PORT, F. K. et al. Comparison of survival probabilities for dialysis patients vs cadaveric renal transplant recipients. **JAMA.**, v. 270, n. 11, p. 1339–43, 1993.

QU, Z. et al. The distribution of IgG subclass deposition on renal tissues from patients with anti-glomerular basement membrane disease. **BMC immunol.**, v. 14, n. 19, 2013.

- RACUSEN, L. C.; HALLORAN, P. F.; SOLEZ, K. Banff 2003 meeting report: New diagnostic insights and standards. **Am J Transplant.**, v. 4, n. 10, p. 1562-6, 2004
- RAVETCH, J. V; CLYNES, R. A. Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo. **Annu Rev Immunol.**, v. 16, p. 421–32, 1998.
- RICKLIN, D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat Immunol.**, v. 11, n. 9, p. 785–97, 2010.
- RIELLA, L. V et al. Long-term outcomes of kidney transplantation across a positive complement-dependent cytotoxicity crossmatch. **Transplantation**, v. 97, n. 12, p. 1247–52, 2014.
- ROELEN, D. L.; DOXIADIS, I. I. N.; CLAAS, F. H. J. Detection and clinical relevance of donor specific HLA antibodies: a matter of debate. **Transpl Int.**, v. 25, n. 6, p. 604–10, 2012.
- ROOS, A. et al. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. **J Immunol.**, v. 167, n. 5, p. 2861–68, 2001.
- SAADI, S. et al. Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. **J Exp Med.**, v. 182, n. 6, p. 1807–14, 1995.
- SASORITH, S.; LEFRANC, M.-P. **Human IgG class and subclass**. Disponível em: <<http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials>. Acesso em outubro de 2014.
- SCHAUB, S. et al. Determinants of C1q Binding in the Single Antigen Bead Assay. **Transplantation**, v. 98, n. 4, p. 387-93, 2014.
- SCHAUB, S.; HÖNGER, G.; AMICO, P. The complexity of the humoral immune response against HLA antigens. **Transpl Int.**, v. 27, n. 3, p. 249–50, 2014.
- SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 125, n. 2, p. S41–52, 2010.
- SCHWAIGER, E. et al. Complement Component C3 Activation: the Leading Cause of the Prozone Phenomenon Affecting HLA Antibody Detection on Single-Antigen Beads. **Transplantation**, v. 97, n. 12, p. 1279-85, 2014.
- SCORNIK, J. C.; MEIER-KRIESCHE, H.-U. Blood transfusions in organ transplant patients: mechanisms of sensitization and implications for prevention. **Am J Transplant.**, v. 11, n. 9, p. 1785–91, 2011.
- SELLARÉS, J. et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. **Am J Transplant.**, v. 12, n. 2, p. 388–99, 2012.
- SIS, B. et al. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates Antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. **Am J Transplant.**, v. 9, n. 10, p. 2312–23, 2009.

SIS, B. et al. A new diagnostic algorithm for antibody-mediated microcirculation inflammation in kidney transplants. **A, J Transplant.**, v. 12, n. 5, p. 1168–79, 2012.

STASTNY, P. et al. Role of immunoglobulin (Ig)-G and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients. **Hum Immunol.**, v. 70, n. 8, p. 600–4, 2009.

STAVNEZER, J. Immunoglobulin class switching. **Curr Opin Immunol.**, v. 8, n. 2, p. 199-205, 1996.

STAVNEZER, J.; GUIKEMA, J. E. J.; SCHRADER, C. E. Mechanism and regulation of class switch recombination. **Ann Rev Immunol.**, v. 26, p. 261–292, 2008.

SUTHERLAND, S. M. et al. Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. **Pediatr Transplant.**, v. 16, n. 1, p. 12–7, 2012.

TAIT, B. D. et al. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. **Nephrology (Carlton)**, v. 14, n. 2, p. 247–54, 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. 19–47, 2013.

TAKEMOTO, S. K. et al. National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. **Am J Transplant.**, v. 4, n. 7, p. 1033–41, 2004.

TANGYE, S. G. et al. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. **J Immunol.**, v. 169, n. 8, p. 4298-306, 2002.

THERNEAU, T. M.; GRAMBSCH, P. M. **Modeling Survival Data: Extending the Cox Model**. 1ª edição. Nove lorque: Springer Science and Business Media, 2000. p. 350

TINCKAM, K. J.; CHANDRAKER, A. Mechanisms and role of HLA and non-HLA alloantibodies. **Clin J Am Soc Nephrol.**, v. 1, n. 3, p. 404-14, 2006.

TOUZOT, M. et al. Complement modulation in solid-organ transplantation. **Transplant Rev. (Orlando)**, v. 28, n. 3, p. 119–25, 2014.

TYAN, D. B.; CHEN, G. Technical Foundation of the C1q Assay and its Clinical Significance for Transplant Outcomes. **ASHI Quartely**, 1st quarter, p. 24–29, 2013.

VAISBICH, M. H. Hemolytic-Uremic Syndrome in childhood. **J Bras Nefrol.**, v. 36, n. 2, p. 208–220, 2014.

VALENZUELA, N. M.; REED, E. F. The link between major histocompatibility complex antibodies and cell proliferation. **Transplant Rev. (Orlando)**, v. 25, n. 4, p. 154–66, 2011.

VISENTIN, J. et al. Denatured class I human leukocyte antigen antibodies in sensitized kidney recipients: prevalence, relevance, and impact on organ allocation. **Transplantation**, v. 98, n. 7, p. 738-44, 2014.

WAHRMANN, M. et al. Flow cytometry based detection of HLA alloantibody mediated classical complement activation. **J Immunol Methods**, v. 275, n. 1-2, p. 149–60, 2003.

WIEBE, C. et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. **Am J Transplant.**, v. 12, n. 5, p. 1157–67, 2012.

WILLIAMS, G. M. et al. “Hyperacute” renal-homograft rejection in man. **N Engl J Med**, v. 279, n. 12, p. 611–8, 1968.

WOLFE, R. A. et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. **N Engl J Med.**, v. 341, n. 23, p. 1725–30, 1999.


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, n. 3, p. 342–7, 2011.

ZACHARY, A. A. et al. Characterization of HLA class I specific antibodies by ELISA using solubilized antigen targets: II. Clinical relevance. **Hum Immunol.**, v. 62, n. 3, p. 236–46, 2001.

ZEEVI, A. et al. Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. **J Heart Lung Transplant.**, v. 32, n. 1, p. 98–105, 2013.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

	ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA	Central de Relacionamento
	HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CAJURU	Fone: (41) 3271-1741
	Laboratório de Imunogenética	Fax: (41) 3334-1139
		Data:

Cliente: _____
CPF: _____
Data nasc: _____
Fone res: _____

Médico: Dr(a) _____
Hospital: _____
Entidade: _____

Coleta: _____
Responsável pela coleta: _____

Exames solicitados: Protocolo Número: _____

Data Atendimento	Data Prevista de liberação dos exames
<input type="checkbox"/> 1º TRIAGEM (HLA* + PROVA CRUZADA + PRA)**	05 Dias úteis
<input type="checkbox"/> PRÉ TRANSPLANTE (PROVA CRUZADA + PRA)**	02 Dias úteis
<input type="checkbox"/> MONITORAMENTO PÓS-TRANSPLANTE (PRA)**	07 Dias úteis
<input type="checkbox"/> RAPAMICINA	07 Dias úteis
<input type="checkbox"/> HLA*	04 Dias úteis
<input type="checkbox"/> COLETA DE SOROTECA	

*HLA: Antígenos Leucocitários Humanos
**PRA: Painel Reativo de Anticorpos

Os prazos de entrega dos resultados estão sujeitos a imprevistos de ordem técnica.
Os resultados são encaminhados diretamente ao médico ou entidade responsável

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____
Portador do CPF de número _____ autorizo o uso dos resultados dos exames de histocompatibilidade sorológicos e de biologia molecular realizado no laboratório de imunogenética para estudos com o objetivo de identificação de genes e proteínas que possam estar envolvidos direta ou indiretamente nos processos imunológicos que possam levar 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 e ter recebido informações referentes à coleta e resultado de exames.

(Assinatura)

2ª via - Laboratório

Laboratório de Imunogenética: CRBIO 0089/07E
Rua Guabirota, s/número - Bloco 4 do Parque tecnológico - Prado Velho - Curitiba - Paraná - Brasil - CEP: 80215-200
Fone: (41) 3271-1741 - Fax (41) 3334-1139 - e-mail: imunog@pucpr.br

9.2 ANEXO II - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR

projeto em qualquer versão
via internet.

Accesse o endereço:
<http://www.pucpr.br/sep>



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética em Pesquisa
Ciência com Consciência

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0003319/09**

Protocolo CEP Nº **5187**

Título do projeto **Avaliação da relevância clínica de aloanticorpos detectados por citometria de fluxo em pacientes transplantados renais**

Grupo **III**

Protocolo CONEP **0321.0.084.000-09**

Pesquisador responsável **Vanessa Santos Sotomaio**

Versão **9**

Instituição

Objetivos

- Avaliar a relevância clínica, pela funcionalidade do enxerto de pacientes transplantados renais com doador vivo, de anticorpos anti-HLA específicos contra antígenos do doador não detectáveis pela PC-CDC-AGH, porém, detectados por CFFS usando micro-esferas ligadas a um único antígeno HLA em plataforma multiplex.
- Estabelecer correlação entre os resultados obtidos por CFFS e FCXM.
- Determinar as classes e subclasses de imunoglobulinas presentes nos anti-soros pré- e pós-transplante de pacientes transplantados renais e estabelecer se estes anticorpos fixam ao não complemento. Correlacionar estes resultados à funcionalidade do enxerto.

Comentários e considerações

Este trabalho de pesquisa será realizado no Laboratório de Imunogenética da PUCPR que fornecerá toda a infra-estrutura necessária. A maior parte do material de consumo para os experimentos já está disponível neste laboratório e sob responsabilidade do orientador. Material complementar, se necessário, será adquirido através do Laboratório Biogen, o qual manifesta, através de documento anexado ao protocolo, sua disposição em custear o estudo. Os pacientes selecionados como sujeitos deste estudo são transplantados renais, com doador vivo, que seguem em monitoramento pós-transplante no Laboratório de Imunogenética da PUCPR e que não apresentam HLA idêntico ao do doador serão recrutados para este estudo. Estes pacientes devem ter realizado o transplante depois de outubro de 2007, quando foi estabelecido o protocolo pós-transplante neste laboratório. As amostras dos pacientes serão as coletadas para a realização dos exames de histocompatibilidade pré- e pós-transplante. Por outro lado, será necessário coletar sangue periférico dos doadores para a FCXM, que também assinarão TCLE, se concordarem com os termos desta pesquisa. O investigador informa em carta anexada à esta versão do protocolo, que as amostras já foram coletadas, porém que quando da coleta das amostras, os pacientes assinaram termo de consentimento, no qual declaram sua aquiescência ao uso das amostras para investigações científicas futuras.

Termo de consentimento livre e esclarecido e/ou Termo de compromisso para uso de dados.

Adequado ao propósito da pesquisa.
O documento foi obtido no momento da coleta de sangue com aplicações clínicas, porém neste documento existe o consentimento dos pacientes para o uso da amostra em pesquisas científicas posteriores.



Parecer Nº **0003319/09**

Título do projeto **Avaliação da relevância clínica de aloanticorpos detectados por citometria de fluxo em pacientes transplantados renais**

Protocolo CONEP **0321.0.084.000-09**

Instituição

Pesquisador responsável **Vanessa Santos Sotomaior**

Protocolo CEP Nº **5187**

Grupo **III**

Versão **9**

Conclusões

Tendo em vista o esclarecimento por escrito de que apesar da coleta das amostras ter precedido a apreciação do CEP, a investigadora demonstra que no momento da obtenção das amostras, utilizadas em procedimentos laboratoriais correntes e referentes à condição clínica dos pacientes, estes consentiram através de TCLE assinado no momento da coleta, com a utilização do material para pesquisas científicas posteriores.

Deste modo e considerando o esclarecimento da investigadora, o CEP PUCPR reconsidera o parecer anterior e aceitando o recurso interposto pela mesma considera o projeto apto a progredir, desde o ponto de vista ético.

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **16/09/2009**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.

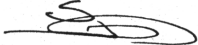
Situação Aprovado

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Saliemos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 16 de Setembro de 2009.


Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
PUC PR

