

**Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Médicas : Nefrologia**

Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul

2004

# TESE DE DOUTORADO

**Aluno :** Luiz Alberto Michet da Silva  
**Orientador :** Prof. Dr. David Saitovitch  
**Co – Orientador :** Prof. Dr. Luiz Fernando Jobim

Porto Alegre, dezembro de 2004

## DEDICATÓRIAS

À Lucília, ao Daniel, ao Tiago, ao André e à Raquel, pela maravilha do amor que nos une, nos fortalece e nos permite compartilhar juntos a vida, os momentos felizes e os de dificuldades, as alegrias e as tristezas, as brincadeiras e as preocupações, os esforços e as conquistas. Agradeço a Deus, por ser Ele a fonte desse amor que existe entre nós, que nos revigora as forças como família, em cada novo dia.

À memória de meu pai, Manoel Hipólito da Silva, e de minha mãe, Maria Rosa Michet da Silva, que deram o melhor de si por seus filhos, em dedicação, cuidado e orientação, procurando sempre mostrar-lhes o melhor caminho, sem medir esforços de qualquer tipo para lhes proporcionar as melhores condições possíveis para seu crescimento, desenvolvimento e educação.

Ao Walmir, que não é somente irmão de nascimento, mas de alma e de coração, e aos seus familiares, que são também irmãos para mim.

À minha sogra, Maria Ferreira Melchiades, que, muito mais do que sogra, é companheira, avó e amiga, e aos seus familiares, que, há muito tempo, tornaram-se meus familiares também.

À memória de meu sogro, Dolmy Rodrigues Melchiades, pela dedicação e companheirismo que sempre teve para com todos de sua família.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na pessoa de seu Coordenador, Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro, e também de todos seus professores e funcionários, de quem recebi todo apoio e orientação necessários durante o Programa de Doutorado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Ministério da Educação, Brasília, DF, pela concessão de Bolsa de Doutorado no Brasil, e, posteriormente, Bolsa para Estágio de "Doutorado Sanduíche" durante um ano na Universidade de Oxford, Inglaterra. É importante salientar a maneira educada e atenciosa com que sempre fui atendido por todos funcionários da CAPES, nas diversas vezes em que necessitei entrar em contacto com aquela Instituição. Também cumpre salientar a regularidade e a pontualidade com que foram pagas todas as parcelas da Bolsa, tanto no Brasil quanto no exterior.

Ao Professor Dr. David Saitovitch, por seu companheirismo, disponibilidade e amizade, pelas discussões sobre o tema da pesquisa, por suas valiosas sugestões e sua orientação no desenvolvimento do Programa de Doutorado e na elaboração da Tese.

Ao Professor Dr. Luiz Fernando Jobim, por seu apoio, sua co-orientação e suas sugestões, que colaboraram para o detalhamento de pontos importantes na elaboração da Tese.

Ao Professor Peter J. Friend, Diretor do Oxford Transplant Centre, Churchill Hospital, Nuffield Department of Surgery, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, pela maneira cordial com que me recebeu, possibilitando-me acompanhar todas atividades clínicas e acadêmicas daquele Centro durante o período de agosto de 2003 até julho de 2004.

À Dra. Susan V. Fuggle, Diretora do Laboratório de Imunologia Clínica do Transplante do Oxford Transplant Centre, sob cuja orientação tive a oportunidade de desenvolver pesquisa sobre Prova Cruzada por Citometria de Fluxo Pré-Transplante, Compatibilidade HLA, Medicamentos Imunossupressores de Indução e Manutenção e Sobrevida do Órgão Transplantado, estudando 657 casos de pacientes que receberam transplante de rim de cadáver naquela Instituição.

A todos professores, médicos e funcionários da Imunologia Clínica do Transplante, do Oxford Transplant Centre e do Nuffield Department of Surgery, pelo apoio e pela atenção recebidos.

Ao Departamento de Clínica Médica, ao Centro de Ciências da Saúde, à Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa e à Reitoria da Universidade Federal de Santa Maria, que proporcionaram apoio decisivo e fundamental para a realização do presente Programa de Doutorado. Cumpre salientar a atenção e a boa vontade que recebi de todos integrantes dos referidos setores, em diversas etapas do desenvolvimento do programa.

A todos médicos, pessoal de enfermagem e todos funcionários do Serviço de Nefrologia do Hospital Universitário de Santa Maria, por seu companheirismo e sua amizade.

A todos os médicos e funcionários do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por sua atenção e seu apoio.

À Realdete Toresan e à Fernanda de Paris, do Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por seu apoio.

A todos amigos e companheiros, médicos, pessoal de enfermagem e funcionários da Clínica Renal de Santa Maria, por sua amizade, seu companheirismo e seu apoio constantes.

**ANTICORPOS ANTIDADOR EM BAIXOS NÍVEIS DETECTADOS POR  
MEIO DE PROVA CRUZADA POR CITOMETRIA DE FLUXO PRÉ-  
TRANSPLANTE : INFLUÊNCIA NA SOBREVIDA DO ENXERTO EM  
TRANSPLANTES DE RIM DE CADÁVER**

## **1 – LISTA DE FIGURAS :**

### **A ) – INTRODUÇÃO**

**Figura 1.** Histograma de prova cruzada por citometria de fluxo. ( página 20 )

### **B ) – ANTICORPOS ANTIDADOR EM BAIXOS NÍVEIS DETECTADOS POR MEIO DE PROVA CRUZADA POR CITOMETRIA DE FLUXO PRÉ - TRANSPLANTE : INFLUÊNCIA NA SOBREVIDA DO ENXERTO EM TRANSPLANTES DE RIM DE CADÁVER**

**Figura 1** . Sobrevida do enxerto para receptores de rim de cadáver com prova cruzada por citometria de fluxo positiva e negativa na coorte total. ( página 58)

**Figura 2** . Sobrevida do enxerto para receptores de rim de cadáver com mais elevada sensibilização de 15 a 100%. Comparação entre pacientes com prova cruzada por citometria de fluxo positiva e negativa. ( página 64 )

### **C ) – LOW LEVELS OF DONOR – REACTIVE ANTIBODIES DETECTED BY PRE – TRANSPLANT FLOW CYTOMETRY CROSSMATCH IN CADAVERIC KIDNEY TRANSPLANTATION – INFLUENCE ON GRAFT SURVIVAL**

**Figure 1** . Graft survival for positive and negative flow cytometry crossmatch patients in the whole cohort. ( page 103 )

**Figure 2** . Graft survival for recipients with highest pre - transplant sensitization from 15 through 100 %. Comparison between positive and negative flow cytometry crossmatch patients. ( page 109 )

.



## **2 – LISTA DE TABELAS :**

**A ) – ANTICORPOS ANTIDOADOR EM BAIXOS NÍVEIS DETECTADOS POR MEIO DE PROVA CRUZADA POR CITOMETRIA DE FLUXO PRÉ - TRANSPLANTE : INFLUÊNCIA NA SOBREVIDA DO ENXERTO EM TRANSPLANTES DE RIM DE CADÁVER**

### **TABELA 1**

**Centro de Transplantes de Oxford (Oxford Transplant Centre)**

**Transplantes com Rim de Cadáver 1993 – 2003 ( n = 657 )** (página 52)

### **TABELA 2**

**Transplantes Primários x Retransplantes** (página 53)

### **TABELA 3**

**Distribuição dos pacientes de acordo com sua mais elevada sensibilização (anticorpos IgG) pré-transplante (reatividade contra painel – RCP – IgG) (0 – 84 %) vs. (85 – 100 %) (página 54)**

### **TABELA 4**

**Influência de diversas variáveis na ocorrência de Rejeição Esteróide-Resistente ( Regressão Logística ) (página 56)**

### **TABELA 5**

**Influência de diversas variáveis na Sobrevida do Enxerto Modelo de Azares Proporcionais da Regressão de Cox ( Cox Regression Proportional Hazard Model ) (página 57)**

### **TABLE 6**

**Prova Cruzada por Citometria de Fluxo (PCCF) com o soro mais reativo Receptores com teste negativo x Receptores com teste positivo (página 60)**

**TABELA 7**

**Distribuição dos pacientes de acordo com sua mais elevada sensibilização (anticorpos IgG) pré-transplante (reatividade contra painel – RCP – IgG)**  
**(0 – 14 %) - (15 – 50 %) - (51 – 100 %) (página 62)**

**TABELA 8**

**Influência de diversas variáveis na Sobrevida do Paciente**  
**Modelos de Azares Proporcionalis da Regressão de Cox**  
*( Cox Regression Proportional Hazard Model ) (página 65)*

**B ) – LOW LEVELS OF DONOR – REACTIVE ANTIBODIES DETECTED BY PRE – TRANSPLANT FLOW CYTOMETRY CROSSMATCH IN CADAVERIC KIDNEY TRANSPLANTATION – INFLUENCE ON GRAFT SURVIVAL**

**TABLE 1**

**Oxford Transplant Centre**  
**Cadaveric Kidney Transplants 1993 – 2003 ( n = 657 )** (page 98)

**TABLE 2**

**First Transplants x Re-Grafts** (page 99)

**TABLE 3**

**Distribution of patients according to their**  
**Highest Pre-Transplant Sensitization**  
**(0 – 84 %) vs. (85 – 100 %) (page 100)**

**TABLE 4**

**Influence of several variables on the occurrence of**  
**Steroid – Resistant Rejection ( Logistic Regression )** (page 101)

**TABLE 5****Influence of several variables on Graft Survival****( Cox Regression Proportional Hazard Model ) (page 102)****TABLE 6****Highest Serum Flow Cytometry Crossmatch (FCXM)****Recipients with negative test x Recipients with positive test (page 105)****TABLE 7****Distribution of patients according to their****highest pre-transplant sensitization (IgG-PRA)****(0 – 14 %) – (15 – 50 %) – (51 – 100 %) (page 107)****TABLE 8****Influence of Several Variables on Patient Survival****( Cox Regression Proportional Hazard Model ) (page 110)**

## INTRODUÇÃO

Cada vez mais enfatiza-se a importância da detecção precoce e do manejo adequado de doença renal crônica, pois há probabilidade de que essa situação evolua para insuficiência renal crônica e, posteriormente, para doença renal avançada ou doença renal em estado terminal, com necessidade de métodos de substituição da função esgotada dos rins nativos, por meio de hemodiálise, diálise peritoneal ou transplante renal (1).

As estatísticas de diversos países mostram que o número de pacientes com insuficiência renal crônica avançada (IRCA) tem crescido constantemente, representando um problema de magnitude cada vez maior, pela morbidade e mortalidade que acarreta e pelos elevados custos do tratamento.

Os dados publicados pelo Sistema de Dados Renais dos Estados Unidos (*United States Renal Data System - USRDS*), por exemplo, mostram na atualidade uma incidência de cerca de 100 mil novos casos de IRCA por ano, nos EUA, e projetam uma incidência em torno de 165 mil novos casos por ano, em 2010 e cerca de 285 mil novos casos por ano, em 2020. Em relação à prevalência, descrevem a existência de cerca de 400 mil pacientes em tratamento na atualidade, e projetam um número superior a 2 milhões naquele país em 2030 (2).

Os dados relativos à epidemiologia da doença renal crônica no Brasil mostram os seguintes números de pacientes com IRCA em terapia renal substitutiva (hemodiálise ou diálise peritoneal): no ano 2000, em torno de 46.500; em 2001, 48.800; em 2003, 54.500, e em 2004, cerca de 58.400 pacientes (3).

Embora os métodos de diálise desempenhem papel fundamental para manutenção da vida de um grande número de pacientes, diversos estudos de vários países indicam que um transplante renal bem sucedido representa a forma de tratamento que melhor reabilitação oferece a pacientes urêmicos crônicos, não

apenas para recuperação de saúde e bem-estar físico, como também em relação à qualidade de vida de uma forma global (4-9).

Entretanto, da mesma forma que aumenta o número de pacientes com insuficiência renal crônica, também ocorre um constante aumento do número de candidatos aguardando transplante renal. Nos EUA, por exemplo, o número de pacientes em lista de espera por transplante renal aumentou de 30000, em 1995, para 60000, em 2004 (dados de 13 de outubro de 2004 – *OPTN – The Organ Procurement and Transplantation Network – United Network for Organ Sharing - UNOS*) (10). Já os dados publicados no Registro Brasileiro de Transplantes mostram que existiam 30423 pacientes em lista de espera para transplante renal no Brasil no ano de 2003 (11).

Existe, dessa maneira, uma ênfase em procurar aumentar o número de transplantes realizados, para disponibilizar ao maior número possível de pacientes esta forma de tratamento reconhecidamente custo-efetiva; paralelamente, existe também a preocupação em otimizar os resultados obtidos, a fim de se atingir cada vez mais índices melhores de sobrevida de pacientes e enxertos, melhor reabilitação física, psicológica e social, e melhor qualidade de vida para os doentes portadores de insuficiência renal crônica avançada.

Muitos fatores são responsáveis pela melhora progressiva dos resultados do transplante renal nas últimas décadas, incluindo expansão de conhecimentos e experiência, melhores cuidados gerais aos pacientes, mais eficientes recursos diagnósticos, aperfeiçoamento de técnicas e procedimentos, e novas abordagens terapêuticas, com medicamentos mais eficazes para profilaxia e tratamento de rejeição e infecção. Melhores taxas de sobrevida para enxertos e pacientes têm sido obtidas pelo efeito combinado dos citados fatores, associados aos benefícios de constante pesquisa em relação aos mecanismos de agressão imunológica, os quais podem ser responsáveis por injúria aguda ou crônica e por diminuição ou perda completa de função do órgão transplantado.

O efeito da compatibilidade doador-receptor, avaliada pelo número de antígenos compartilhados por eles no complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex – MHC*) ou sistema de antígenos leucocitários

humanos (*human leukocyte antigens – HLA*), tem sido estudado por diversos grupos de pesquisadores. As evidências indicam um efeito positivo à sobrevida do enxerto relacionado a uma maior compatibilidade, ou seja, quanto menor o número de antígenos desiguais ou incompatibilidades (*mismatches*), melhores sobrevidas de enxerto são obtidas (12, 13).

Exposição antigênica prévia (gestações, transfusões sanguíneas e/ou transplantes) deve sempre ser pesquisada ao se incluir pacientes em lista de espera para transplante renal, pois pode ocasionar sensibilização imunológica contra aloantígenos. Existe uma considerável proporção de pacientes transplantados renais que, no momento do transplante, já apresentam algum grau de sensibilização prévia a aloantígenos: o Registro de Transplantes Renais dos EUA (*United Network for Organ Sharing - UNOS*) mostra que, em torno de 50% dos receptores de rim de cadáver, apresentam alguma reatividade (anticorpos) contra antígenos de potenciais doadores (“painel de doadores”) (14).

Como a realização de transplantes prévios pode agir como elemento indutor de sensibilização, é de interesse que se saiba que fração do total de candidatos em lista de espera está aguardando por um novo enxerto após falência de um órgão transplantado no passado. Nesse sentido, pode-se observar que a proporção de retransplantes em relação ao número total de transplantes renais realizados tem aumentado progressivamente. Por exemplo, de acordo com os dados do UNOS, os retransplantes representavam menos de 1% do total de transplantes renais realizados nos EUA no início dos anos 90, e passaram a representar em torno de 10% entre os anos 2000 e 2003 (10).

A importância clínica e epidemiológica de tais fatos decorre da observação de que de modo geral retransplantes e transplantes em pacientes altamente sensibilizados mostram sobrevida menor do enxerto do que transplantes primários ou transplantes em pacientes não sensibilizados (14).

Há vários anos constatou-se que é possível a ocorrência de determinadas incompatibilidades HLA entre doador e receptor sem que as mesmas desempenhem papel antigênico, ou seja, sem induzirem à formação de anticorpos específicos, sendo denominadas incompatibilidades aceitáveis (*acceptable*

*mismatches*). Por isso, certos programas de transplante, como o Programa Europeu de Incompatibilidades Aceitáveis (*Eurotransplant Acceptable Mismatch Program*), identificam tais incompatibilidades, principalmente para pacientes com mais elevada sensibilização, procurando oferecer órgãos com menor número de incompatibilidades inaceitáveis para pacientes altamente sensibilizados, com o objetivo de alcançar melhor sobrevida de enxerto (15).

O programa de alocação de órgãos do Serviço de Transplante do Reino Unido (*United Kingdom Transplantation Service*) procura oferecer órgãos em três níveis de prioridade: o primeiro corresponde aos transplantes com compatibilidade ideal entre doador e receptor, ou seja, com zero incompatibilidades nos loci A, B e DR ("000"); o segundo refere-se aos transplantes com as compatibilidades consideradas favoráveis, que não incluem incompatibilidades em DR, mas apenas no locus A e/ou no locus B ("100" ou "010" ou "110"); o terceiro corresponde aos transplantes com as compatibilidades consideradas menos favoráveis, com a presença de incompatibilidades em DR. Dentro de cada nível, existe a prioridade para pacientes pediátricos e para pacientes altamente sensibilizados. Tal programa tem permitido oferecer a pacientes que apresentam elevado grau de sensibilização órgãos com melhor compatibilidade HLA, e a sobrevida de seus enxertos tem sido equivalente à obtida em pacientes menos sensibilizados (16-20).

Partindo do princípio de que as unidades antigênicas das moléculas de classe I dos loci A e B podem ser correspondentes a tríades de aminoácidos localizadas nas porções das moléculas acessíveis aos anticorpos, tem se demonstrado que determinadas desigualdades em antígenos dos loci A e B, consideradas previamente como incompatibilidades, podem na verdade ser encaradas como totalmente compatíveis, por não exibirem entre si diferenças nas referidas seqüências e combinações de aminoácidos, não desempenhando então papel na indução da formação de anticorpos específicos (21, 22).

A descoberta de alvos moleculares imunológicos diferentes dos clássicos antígenos HLA, como as moléculas de cadeia A e B relacionadas à classe I do complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility class – MHC –*

*I – related chain A – MICA and major histocompatibility class – MHC – I – related chain B – MICB*), que podem ser expressas no endotélio da microvasculatura renal, indicam que respostas imunológicas contra tais antígenos podem estar associadas a rejeição e perda de enxerto, mesmo na presença de compatibilidade em relação aos antígenos HLA tradicionalmente determinados (23-25).

Diversos estudos demonstram a participação de mecanismos celulares e humorais (anticorpos contra antígenos do doador) no conjunto de respostas imunológicas que constituem o processo de rejeição aos aloenxertos (26-29).

Embora anticorpos reativos contra antígenos HLA do doador tenham sido frequentemente encontrados no soro de pacientes com enxertos sendo rejeitados, a detecção e o tratamento da rejeição têm historicamente sido focados, basicamente, nos processos mediados por células, cujas evidências histológicas são mais facilmente pesquisadas e detectadas.

Somente em época recente, demonstrou-se a existência de um elemento específico nas biópsias de rim transplantado, cuja presença desempenha papel de marcador histológico confiável de rejeição aguda mediada por anticorpos. Tal achado corresponde especificamente à detecção de depósitos da fração C4d do complemento nos capilares peritubulares, evidência que se tornou disponível apenas nos anos 90 (30). Esse item diagnóstico foi posteriormente incluído como critério de rejeição humoral ou mediada por anticorpos na classificação de Banff da rejeição de aloenxertos renais (31); também foi demonstrado que, em biópsias realizadas por rotina de protocolo no sétimo dia pós-transplante, a presença de depósitos de C4d em capilares peritubulares é um marcador específico da presença de rejeição humoral, estando significativamente associada à detecção de anticorpos específicos contra o doador e a achados histológicos de rejeição aguda (32).

Por outro lado, alguns estudos recentes têm demonstrado que depósito de C4d em capilares peritubulares pode também ser um marcador de injúria imunológica crônica, contribuindo para nefropatia crônica do enxerto (33, 34).

A detecção de anticorpos anti-HLA no soro do receptor tem sido associada com maior perda de enxerto em alguns estudos observacionais multicêntricos (35)



e em alguns estudos de caso-controle (38). A pesquisa de tais anticorpos tem sido realizada por meio do uso isolado ou combinado de linfocitotoxicidade dependente de complemento, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e citometria de fluxo, em diversas séries publicadas (35-37, 74, 75).

O grau de sensibilização pré-transplante tem sido tradicionalmente avaliado testando-se a reatividade do soro do receptor contra células de um painel de doadores (*panel reactive antibody – PRA*) (14); entretanto, muitas vezes é difícil obter-se um painel que seja realmente representativo da população de potenciais doadores. Desse modo, o soro de um mesmo paciente testado contra diferentes painéis poderá resultar proporções bem diferentes de reatividade. Em virtude disso, tem sido enfatizada a importância de procurar definir em cada receptor não apenas a existência, mas também a especificidade dos anticorpos anti-HLA presentes, pois quanto mais completa for tal informação, haverá maior probabilidade de se antecipar o possível grau de reatividade do receptor considerado contra potenciais doadores de uma população da qual se conhece a prevalência das especificidades antigênicas HLA (20).

Paralelamente ao conhecimento do perfil de anticorpos anti-HLA do receptor, é mandatório e fundamental o resultado da prova cruzada específica pré-transplante realizada entre uma amostra de soro do receptor e linfócitos do doador.

Os métodos e técnicas desenvolvidos para detectar anticorpos reativos contra o doador têm tido sua precisão e sensibilidade aumentadas e melhoradas ao longo de vários anos.

O fato de que rejeição hiperaguda e perda precoce do enxerto podem ser causadas por anticorpos fixadores de complemento pré-formados e prevenidas ao serem rejeitadas as combinações doador-receptor com prova cruzada positiva por linfocitotoxicidade (ou citotoxicidade) dependente de complemento (PCCDC) é bem conhecido desde os anos 60 (39-41). O trabalho pioneiro publicado por Patel e Terasaki, em 1969, (41) descreveu o significado de uma prova cruzada positiva por linfocitotoxicidade entre receptor e doador, e demonstrou inequivocamente que a presença de anticorpos no soro do receptor contra antígenos expressados em

leucócitos do doador constituíam um fator de risco da maior importância para perda imediata do enxerto.

Na realização da PCCDC, são utilizados linfócitos do doador, obtidos do sangue periférico, de linfonodos ou do baço, que são incubados com amostras do soro do receptor antes e após adição de complemento, sendo a positividade da prova indicada por lise dos linfócitos, que desempenham o papel de células-alvo a serem agredidas pelos anticorpos (41-43).

Algumas técnicas modificadas de PCCDC, tais como tempo de incubação mais prolongado e provas cruzadas para linfócitos T e B potencializadas pelo uso de imunoglobulina anti-humana (*antihuman immunoglobulin - AHG*), foram desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sensibilidade e detectar níveis mais baixos de imunoglobulinas reativas contra o doador (42-48). A utilização de agentes como o Dithiothreitol (DTT) possibilitou descartar reações positivas causadas por anticorpos de classe IgM, permitindo determinar quais provas cruzadas deviam realmente sua positividade a anticorpos antidoador de classe IgG; demonstrou-se que pacientes que apresentavam provas cruzadas inicialmente positivas, mas que se tornavam negativas após redução de anticorpos IgM por DTT, podiam ser transplantados com sucesso (49, 50).

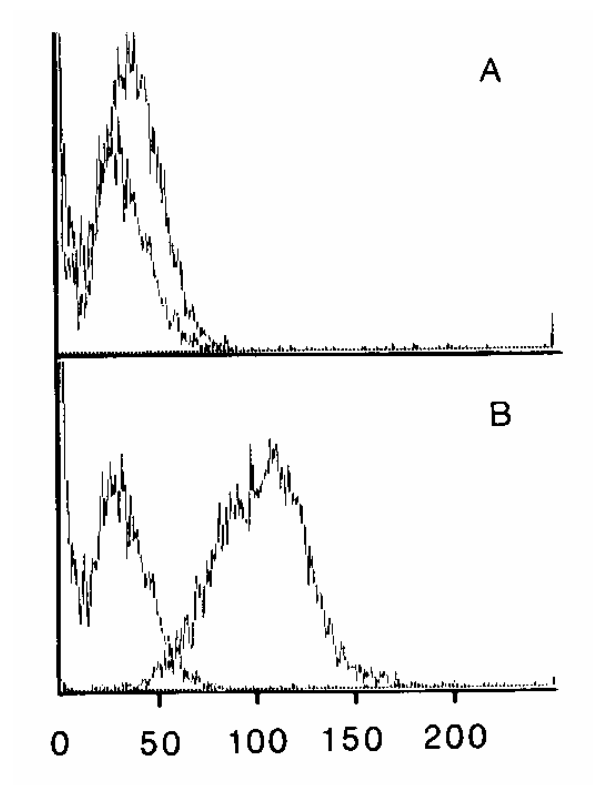
O emprego rotineiro desses procedimentos na realização da PCCDC virtualmente eliminou a ocorrência de rejeição hiperaguda de aloenxertos renais.

A prova cruzada por meio de citometria de fluxo (PCCF), originalmente descrita por Garovoy et al. (51), não depende de fixação de complemento, é menos subjetiva do que a avaliação da morte celular nos testes dependentes de complemento, já que utiliza um anticorpo secundário fluorescente para fornecer uma medida semi-quantitativa dos anticorpos ligados à superfície dos linfócitos, e tem maior sensibilidade do que as provas que empregam citotoxicidade para detectar baixos níveis de anticorpos antidoador (52-60).

Na citometria de fluxo, linfócitos do doador, após incubação com soro do receptor, são lavados com solução salina tamponada com fosfato contendo 0,1% de azida sódica. Recebem posteriormente tratamento com um conjugado marcado com fluoresceína F (ab')<sub>2</sub> anti-IgG humana, que se ligará aos anticorpos de

classe IgG aderidos à superfície linfocitária. A seguir, tais células-alvo, injetadas em uma corrente de líquido, atravessarão um feixe de luz, interagirão com o mesmo e produzirão dois fenômenos : difusão da luz recebida e emissão de fluorescência, a qual será proporcional à quantidade de conjugado fluorescente aderido a cada linfócito, e assim, à quantidade de anticorpos a ele fixados. Tanto a luz difundida como a emissão fluorescente serão convertidas em sinais eletrônicos que permitirão contagem das células e avaliação da intensidade da fluorescência, que representará uma medida semi-quantitativa dos anticorpos IgG aderidos aos linfócitos. Tal quantidade de anticorpos é avaliada em uma escala, geralmente logarítmica, de canais de intensidade fluorescente (habitualmente, o número de canais corresponde a 256 ou 1024). A incubação dos linfócitos do doador com um soro sabidamente não possuidor de anticorpos (geralmente de indivíduos masculinos não transfundidos do grupo sanguíneo AB) fornecerá o controle negativo; o controle positivo será obtido pelo uso de soro de pacientes altamente sensibilizados, com reconhecidos altos títulos de anticorpos, com elevada reatividade contra um painel de doadores. A existência de anticorpos IgG no soro do receptor será detectada por um aumento da fluorescência em relação ao controle negativo, o que será indicado por um deslocamento para a direita na escala de canais de intensidade fluorescente, ocasionando uma diferença entre o valor médio de fluorescência entre as duas amostras (*medium channel shift*) (44, 48, 49, 51, 52, 54, 56).

Os resultados são apresentados na forma de histograma, no qual a intensidade de fluorescência/célula está representada no eixo horizontal (  $x$  ), e a porcentagem de células com fluorescência positiva/canal, no eixo vertical (  $y$  ). A Figura 1 mostra resultados de uma prova cruzada por citometria de fluxo, na qual células tratadas com soro controle negativo são comparadas a células tratadas com o soro em teste (**A**) e a células tratadas com soro controle positivo (**B**).



**Figura 1. Histograma de prova cruzada por citometria de fluxo.** O eixo *x* indica a intensidade de fluorescência/célula (escala de 256 canais); o eixo *y* indica a porcentagem de células contadas com fluorescência positiva/canal. Em **A**, o pico menor corresponde a células tratadas com soro controle negativo (69,4% de células com fluorescência positiva; intensidade média de fluorescência em canal 34), e o maior corresponde a células tratadas com soro teste (87% de células com fluorescência positiva; intensidade média de fluorescência em canal 44). Em **B**, o mesmo pico correspondente ao controle negativo é comparado com células tratadas com soro positivo (99,8% de células com fluorescência positiva; intensidade média de fluorescência em canal 109). O deslocamento da média de canais de intensidade de fluorescência (*medium channel shift*) corresponde a 10 em **A** e a 75 em **B**.

A prova cruzada por citometria de fluxo pode ser realizada com linfócitos totais ou com separação de linfócitos T e B; resultado negativo simultâneo para células T e B indica a inexistência de anticorpos. Um resultado positivo para linfócitos B, mas negativo para linfócitos T, sugere a existência de anticorpos contra moléculas de classe II ou quantidades muito pequenas de anticorpos contra moléculas de classe I. Um resultado positivo para linfócitos T e B pode indicar a presença de anticorpos contra as duas classes mencionadas. Já o resultado positivo somente para linfócitos T sugere a existência de anticorpos contra antígenos não HLA, pois a expressão de antígenos HLA não se limita apenas às células T (72).

Alguns pesquisadores demonstraram que pacientes selecionados para retransplante renal cadavérico por prova cruzada negativa por citometria de fluxo apresentavam melhor sobrevida do enxerto do que aqueles selecionados apenas por uma prova cruzada negativa por citotoxicidade dependente de complemento potencializada por imunoglobulina anti-humana (61).

Diversos estudos têm indicado que a presença de anticorpos anti-antígenos HLA do doador detectados por uma PCCF positiva podem estar associados com mais freqüente perda precoce do enxerto (< 3 meses) em transplantes primários (62, 63), em retransplantes (64) ou em séries incluindo transplantes primários e retransplantes (65, 66). Esses anticorpos têm também sido associados com um aumento da ocorrência de episódios de rejeição aguda (67-71) e com sobrevida menor do enxerto (62, 69, 72, 73), tanto considerando PCCF contra linfócitos T como contra linfócitos B (72, 73). Alguns pesquisadores relataram que a detecção de tais anticorpos, após transplante renal, depende do tipo de drogas imunossupressoras usadas (35, 74), podendo os mesmos estar associados com rejeição aguda (74, 75) e com falência do enxerto (35, 75). Entretanto, outros estudos não detectaram nenhuma diferença em relação à ocorrência de rejeição aguda (76-78) ou em relação à sobrevida do enxerto (70, 71, 76, 77) entre pacientes com PCCF negativa e positiva.

As dificuldades para se alcançar uniformidade na técnica da prova cruzada por citometria de fluxo e a conseqüente falta de padronização de um ponto de

corde definido entre testes positivos e negativos representam pontos desfavoráveis para uma interpretação mais adequada dos resultados e para estabelecimento de comparação entre diferentes séries. Desse modo, o valor mínimo de deslocamento da média de canais de intensidade de fluorescência necessário para considerar uma PCCF como positiva varia entre diversos autores: 10/256 (71), 20/256 (77), 40/1024 (66, 69, 76) e 50/1024 (62). Por outro lado, alguns autores não utilizam valores numéricos específicos do deslocamento em si, mas estabelecem um valor médio  $\pm$  desvio-padrão para controle negativo, considerando a PCCF positiva se a intensidade de fluorescência do teste é maior que a do controle negativo excedendo dois (61, 79) ou três desvios-padrão (67, 78).

Dessa maneira, a verdadeira relevância clínica de anticorpos IgG detectados por citometria de fluxo, mas não por prova cruzada por linfocitotoxicidade dependente de complemento, não foi, até agora, claramente estabelecida; embora não seja necessariamente uma contraindicação ao transplante, a presença desses anticorpos parece trazer um significativo risco adicional que não pode ser desconsiderado (80).

Para maior esclarecimento e entendimento a respeito dessa questão, é necessário que o papel desses baixos níveis de anticorpos antidoador na evolução do transplante seja mais amplamente estudado. Também é de interesse avaliar a relação entre sua presença e a existência de outros fatores de risco para falência do órgão transplantado, como nível de sensibilização pré-transplante, número de incompatibilidades HLA e protocolo de imunossupressão utilizado.

Analizamos neste estudo uma coorte de receptores de rim de cadáver transplantados em um único centro durante um período de 11 anos, com o objetivo de testar a hipótese de que a existência pré-transplante de anticorpos reativos contra o doador somente detectados por PCCF e não por PCCDC está associada com menor sobrevida do enxerto. Também analisamos o impacto da presença de uma PCCF positiva na sobrevida do enxerto em diferentes níveis de sensibilização pré-transplante, para testar a hipótese de que esse efeito é diferente em pacientes não sensibilizados ou pouco sensibilizados em relação

àqueles com grau médio ou alto de sensibilização. Estudamos ainda, por Análise Multivariada por meio do Modelo de Azares Proporcionais da Regressão de Cox (*Cox Regression Proportional Hazard Model*), a interação entre esses baixos níveis de anticorpos antidoador e outros fatores de risco para falência do enxerto, como número de incompatibilidades HLA e tipo de medicamentos imunossupressores utilizados, com o objetivo de testar a hipótese de que a presença ou a ausência de tais anticorpos não deve ser considerada isoladamente, mas sim integrada em análise multifatorial, com outros elementos imunológicos, clínicos e terapêuticos .

## REFERÊNCIAS

1. National Kidney Foundation – Kidney Disease Outcomes Quality Initiative - K/DOQI GUIDELINES 2000; Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. [www.kidney.org/](http://www.kidney.org/)
2. Gilbertson D, Solid C, Xue JL, Collins AJ. Projecting the U.S ESRD population to 2030 – United States Renal Data System (USRDS). [www.usrds.org/](http://www.usrds.org/)
3. Romão Junior JE. Epidemiologia da Doença Renal Crônica no Brasil – 2004. Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN). [www.sbn.org.br/censo](http://www.sbn.org.br/censo)
4. McDonald SP, Russ GR. Survival of recipients of cadaveric kidney transplants compared with those receiving dialysis treatment in Australia and New Zealand, 1991-2001. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17:2212-2219.

5. Rabbat CG, Thorpe KE, Russell JD, Churchill DN. Comparison of mortality risk for dialysis patients and cadaveric first renal transplant recipients in Ontario, Canada. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11: 917-922.

6. Reimer J, Franke GH, Lutkes P, Kohnle M, Gerken G, Philipp T, Heemann U. Quality of life in patients before and after kidney transplantation. *Psychother Psychosom Med Psychol* 2002; 52:16-23.

7. Tomasz W, Piotr S. A trial of objective comparison of quality of life between chronic renal failure patients treated with hemodialysis and renal transplantation. *Ann Transplant* 2003; 8: 47-53.

8. Oniscu GC, Brown H, Forsythe JL. How great is the survival advantage of transplantation over dialysis in elderly patients? *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 945-951.

9. Glanton CW, Kao TC, Cruess D, Agodoa LY, Abbott KC. Impact of renal transplantation on survival in end-stage renal disease patients with elevated body mass index. *Kidney Int* 2003; 63: 647-653.

10. United Network for Organ Sharing (UNOS): Organ Donation and Transplantation 2004; <http://www.unos.org/>

11. Registro Brasileiro de Transplantes (RBT) – Órgão Oficial Semestral da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos – ABTO – Ano X – N<sup>o</sup> 1 – Janeiro/ Junho 2004.

12. Opelz G, Wujciak T, Dohler B, Scherer S, Mytilineos J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet* 1999; 1: 334-342.



13. Bresnahan BA, Johnson CP, McIntosh MJ, Stablein D, Hariharan S. A comparison between recipients receiving matched kidney and those receiving mismatched kidney from the same cadaver donor. *Am J Transplant* 2002; 2 : 366-372.

14. Cecka JM. The UNOS Renal Transplant Registry. In: Cecka and Terasaki, ed. *Clinical Transplants UCLA Immunogenetics Center, Los Angeles, CA* 2001: 1-18.

15. Claas FH, van Leeuwen A, van Rood JJ. Hyperimmunized patients do not need to wait for an HLA identical donor. *Tissue Antigens* 1989 ; 34 : 23-29.

16. Fuggle SV, Belger MA, Johnson RJ, Ray TC, Morris PJ. A new national allocation scheme for adult kidneys in the United Kingdom. United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA) Users' Kidney Advisory Group and its Task Forces. *Clin Transpl* 1998;;:107-113.

17. Morris PJ, Johnson RJ, Fuggle SV, Belger MA, Briggs JD. Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force of the Kidney Advisory Group of the United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA). *Lancet* 1999; 354: 1147-1152.

18. Johnson RJ, Belger MA, Briggs JD, Fuggle SV, Morris PJ; UK Transplant Kidney and Pancreas Advisory Group. Renal transplantation in the UK and Republic of Ireland. *Clin Transpl* 2000;;:105-13.

19. Fuggle SV, Johnson RJ, Rudge CJ, Forsythe JL. Human leukocyte antigen and the allocation of kidneys from cadaver donors in the United Kingdom. *Transplantation* 2004; 77: 618-620.

20. Fuggle SV, Martin S. Toward performing transplantation in highly sensitized patients. *Transplantation* 2004; 78: 186-189.

21. Duquesnoy RJ. HLAMatchmaker : a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. *Hum Immunol.* 2002; 63 : 339-352.

22. Duquesnoy RJ, Takemoto S, de Lange P, Doxiadis II, Schreuder GM, Persijn GG, Claas FH. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. III. Effect of matching at the HLA-A,B amino acid triplet level on kidney transplant survival. *Transplantation.* 2003; 75: 884-889.

23. Sumitran-Holgersson S, Wilczek HE Holgersson J, Soderstrom K. Identification of the nonclassical HLA molecules, MICA, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation* 2002; 74: 268 – 277.

24. Quiroga I, Sweeney D, Sutton PM, Chapple SD, Souto-Grando JP, Barnardo MC, Fuggle SV. Identification of a novel MICA allele: MICA\*051. *Tissue Antigens* 2004; 63 : 466-469.

25. Quiroga I, Sweeney D, Sutton PM, Chapple SD, Souto-Grando JP, Barnardo MC, Fuggle SV. A novel major histocompatibility complex class I-related chain allele. *Tissue Antigens* 2004; 64: 74-77.

26. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et al.

The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713-723.

27. Braun WE. Renal transplantation: basic concepts and evolution of therapy. *Clin Apheresis* 2003; 18: 141-152.

28. Michaels PJ, Fishbein MC, Colvin RB. Humoral rejection of human organ transplants. *Springer Semin Immunopatho* 2003;25:119-140.

29. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 242-249.

30. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmuller G, Land W, Albert E. Department of Internal Medicine, Klinikum Innenstadt; Institute of Immunology, Munich, Germany. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int.* 1993 ; 43 : 1333-1338.

31. Racusen LC, Colvin RB, Solez K et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant.* 2003 ; 3 : 708-714.

32. Koo DD, Roberts IS, Quiroga I, Procter J, Barnardo MC, Sutton M, Cerundolo L, Davies DR, Friend PJ, Morris PJ, Fuggle SV. C4d deposition in early renal allograft protocol biopsies. *Transplantation* 2004; 78: 398-403.

33. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection (CR) by C4d deposits in peritubular capillaries (PTC). *J Am Soc Nephrol* 2001 ; 12 : 574-582.

34. Regele H, Bohmig GA, Habicht A et al. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2002 ; 13 : 2371-2380.

35. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting Kidney Graft Failure by HLA Antibodies: a Prospective Trial. *Am J Transplant* 2004; 4 : 438-443.

36. Lucas DP, Paparounis ML, Myers L, Hart JM, Zachary AA. Detection of HLA class I-specific antibodies by the QuikScreen enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997 ; 4 : 252-257.

37. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 2000; 69: 319-326.

38. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RWG. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 2003; 75: 1034-1040.

39. Kissmayer-Nielsen F, Olsen F, Peterson V, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966; 2: 662-665.

40. Williams GM, Hume DM, Hudson RP, Morris PJ, Kano K, Milgrom F. "Hyperacute" renal homograft rejection in man. *N Engl J Med* 1968; 279: 611-618.

41. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280: 735-739.

42. Amos DB, Bashir H, Boyle W, MacQueen M, Tiilikainen A. A simple microtoxicity test. *Transplantation* 1970; 7: 220-223.

43. Johnson AH, Rossen RD, Butler WT. Detection of alloantibodies using a microcytotoxicity test: identification of low levels of preformed antibodies in accelerated allograft rejection. *Tissue Antigens* 1972; 2: 215-226.

44. Cross DE, Whittier FC, Weaver P, Foxworth J. A comparison of the antiglobulin versus extended incubation time crossmatch results in 223 renal transplants. *Transplant Proc* 1977; 9: 1803-1806.

45. Fuller TC, Cosimi AB, Russell PS. Use of an antiglobulin-ATG reagent for detection of low levels of alloantibody-improvement of allograft survival in presensitized recipients. *Transplant Proc* 1978; 10: 463-466.

46. Gebel HM, Oldfather JW, Karr RW, Rodey GE. Antibodies directed against HLA-DR gene products exhibit the CYNAP phenomenon. *Tissue Antigens* 1984; 23: 135-140.

47. Kerman RH, Kimball PM, Van Buren CT, Lewis RM, DeVera V, Baghdasarian V, Heydari A, Kahan BD . AHG and DTE/AHG procedure identification of cross-match-appropriate donor-recipient pairings that result in improved graft survival. *Transplantation* 1991; 51: 316-320.

48. Fuller TC, Fuller AA, Golden M, Rodey GE. HLA alloantibodies and the mechanism of the antiglobulin-augmented lymphocytotoxicity procedure. *Hum Immunol* 1997; 56: 94-105.

49. Chapman JR, Taylor CJ, Ting A, Morris PJ. Immunoglobulin class and specificity of antibodies causing positive T cell crossmatches. Relationship to renal transplant outcome. *Transplantation* 1986; 42: 608-613.

50. Tellis VA, Matas AJ, Senitzer D, Louis P, Glicklich D, Soberman R, Veith

FJ. Successful transplantation after conversion of a positive crossmatch to negative by dissociation of IgM antibody. *Transplantation* 1989; 47 : 127-129.

51. Garovoy MR, Rheinschmidt MA, Bigos M, Perkins H, Colombe B, Feduska N, Salvatierra O. Flow cytometry analysis: a high technology crossmatch technique facilitating transplantation. *Transplant Proc* 1983; 15: 1939-1944.

52. Chapman JR, Deierhoi MH, Carter NP. Analysis of flow cytometry and cytotoxicity crossmatches in renal transplantation. *Transplant Proc* 1985; 17: 2480-2481.

53. Talbot D, Givan AL, Shenton BK, Stratton A, Proud G, Taylor RM. Rapid detection of low levels of donor specific IgG by flow cytometry with single and dual colour fluorescence in renal transplantation. *J Immunol Methods* 1988; 112: 279 -283.

54. Bray RA, Lebeck LK, Gebel HM. The flow cytometric crossmatch: dual color analysis of T cell and B cell reactivities. *Transplantation* 1989; 48: 834-840.

55. Scornik JC, LeFor WM, Cicciarelli JC, Brunson ME, Bogaard T, Howard RJ, Ackermann JRW, Mendez R, Shires DL, Pfaff WW. Hyperacute and acute kidney graft rejection due to antibodies against B cells. *Transplantation* 1992; 54: 61-64.

56. Karuppan SS, Ohlman S, Moller E. The occurrence of cytotoxic and non-complement-fixing antibodies in the crossmatch serum of patients with early acute rejection episodes. *Transplantation* 1992; 54: 839-843.

57. Talbot D, Cavanagh G, Coates E, Givan AL, Shenton BK, Lennard TWJ, Proud G, Taylor RMR. Improved graft outcome and reduced complications due to

flow cytometric crossmatching and DR matching in renal transplantation. *Transplantation* 1992; 53: 925-928.

58. Scornik JC, Brunson ME, Schaub B, Howard RJ, Pfaff WW. The crossmatch in renal transplantation. *Transplantation* 1994; 57: 621-625.

59. Lazda VA. Identification of patients at risk for inferior renal allograft outcome by a strongly positive B cell flow cytometry crossmatch. *Transplantation* 1994; 57: 964-969.

60. Cook DJ. Role of antibodies pretransplantation and posttransplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2002; 7: 157-160.

61. Bryan CF, Baier KA, Nelson PW, Luger AM, Martinez J, Pierce GE, Ross G, Shield CF III, Warady BA, Aeder MI, Helling TS, Muruve N. Long-term graft survival is improved in cadaveric renal retransplantation by flow cytometric crossmatching. *Transplantation* 1998; 66: 1827-1832.

62. Ogura K, Terasaki PI, Johnson C, Mendez R, Rosenthal JT, Ettenger R, Martin DC, Dainko E, Cohen L, Mackett T, Berne T, Barba L, Lieberman E. The significance of a positive flow cytometry crossmatch test in primary kidney transplantation. *Transplantation* 1993; 56: 294-298.

63. Karpinski M, Rush D, Jeffery J, Exner M, Regele H, Dancea S, Pochinco D, Birk P, Nickerson P. Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2807-2814.

64. Mahoney RJ, Norman DJ, Colombe BW, Garovoy MR, Leeber DA. Identification of high- and low-risk second kidney grafts. *Transplantation* 1996; 61: 1349-1355.

65. Thistlethwaite JR, Buckingham M, Stuart JK, Gaber AO, Mayes JT, Stuart FP. T cell immunofluorescence flow cytometry cross-match results in cadaver donor renal transplantation. *Transplant Proc* 1987; 19:722-724.

66. Mahoney RJ, Ault KA, Given SR, Adams RJ, Breggia AC, Paris PA, Palomaki GE, Hitchcox SA, White BW, Himmelfarb J, Leeber DA. The flow cytometric crossmatch and early renal transplant loss. *Transplantation* 1990; 49: 527-535.

67. Talbot D, Givan AL, Shenton BK, Stratton A, Proud G, Taylor RMR. The relevance of a more sensitive crossmatch assay to renal transplantation. *Transplantation* 1989; 47: 552-555.

68. Karuppan SS, Lindholm A, Möller E. Fewer acute rejection episodes and improved outcome in kidney-transplanted patients with selection criteria based on crossmatching. *Transplantation* 1992; 53: 666-673.

69. Kimball P, Rhodes C, King A, Fisher R, Ham J, Posner M. Flow cross-matching identifies patients at risk for postoperative elaboration of cytotoxic antibodies. *Transplantation* 1998; 65: 444-446.

70. Scornik JC, Clapp W, Patton PR, VanDerWerf WJ, Hemming AW, Reed AI, Howard RJ. Outcome of kidney transplants in patients known to be flow cytometry crossmatch positive. *Transplantation* 2001; 71: 1098-1102.

71. O'Rourke RW, Osorio RW, Freise CE, Lou CD, Garovoy MR, Bacchetti P, Ascher NL, Melzer JS, Roberts JP, Stock PG. Flow cytometry crossmatching as a predictor of acute rejection in sensitized recipients of cadaveric renal transplants. *Clin Transplant* 2000;14:167-173.



72. Cho YW, Cecka JM. Crossmatch tests – an analysis of UNOS data from 1991-2000. In: Cecka and Terasaki, ed. *Clinical Transplants*. UCLA Immunogenetics Center, Los Angeles, CA 2001: 237-246.

73. El Fettouh HA, Cook DJ, Bishay E, Flechner S, Goldfarb D, Modlin C, Dennis V, Novick AC. Association between a positive flow cytometry crossmatch and the development of chronic rejection in primary renal transplantation. *Urology* 2000; 56: 369-372.

74. Van Der Nast BJ, Besouw NM, Witvliet MD, Kuiper PD, Gregoor PS, Van Gelder T, Weimar W, Claas HJ. Formation of donor-specific human leukocyte antigen antibodies after kidney transplantation: correlation with acute rejection and tapering of immunosuppression. *Transplantation* 2003; 75: 871-877.

75. Piazza A, Borrelli L, Monaco PI, Poggi E, Pisani E, Valeri M, Fraboni D, Servetti S, Casciani CU, Adorno D. Posttransplant donor-specific antibody characterization and kidney graft survival. *Transplant Int* 2000; 13: 439-443.

76. Pelletier RP, Orosz CG, Adams PW, Bumgardner GL, Davies EA, Elkhammas EA, Henry ML, Ferguson RM. Clinical and economic impact of flow cytometry crossmatching in primary cadaveric kidney and simultaneous pancreas-kidney transplant recipients. *Transplantation* 1997; 63: 1639-1645.

77. Kerman RH, Susskind B, Buyse I, Pryzbylowski P, Ruth J, Warnell S, Gruber SA, Katz S, Van Buren CT, Kahan BD. Flow cytometry-detected IgG is not a contraindication to renal transplantation. IgM may be beneficial to outcome. *Transplantation* 1999; 68: 1855-1858.

78. Christiaans MH, Overhof R, Ten Haaft A, Nieman F, Van Hooff JP, Van Den Berg-Loonen EM. No advantage of flow cytometry crossmatch over

complement-dependent cytotoxicity in immunologically well-documented renal allograft recipients. *Transplantation* 1996; 62: 1341-1347.

79. Utzig MJ, Blumke M, Wolff-Vorbeck G, Lang H, Kirste G. Flow cytometry cross-match: a method for predicting graft rejection. *Transplantation* 1997; 63: 551-554.

80. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant* 2003; 3: 1488-1500.

## OBJETIVOS

### **a) - Primários :**

Avaliar o impacto de uma prova cruzada pré-transplante positiva por citometria de fluxo, mas negativa por linfocitotoxicidade, na sobrevida do enxerto, em pacientes transplantados com rim de cadáver.

Avaliar o impacto de uma prova cruzada pré-transplante positiva por citometria de fluxo, mas negativa por linfocitotoxicidade, na sobrevida do enxerto, em diferentes níveis de sensibilização pré-transplante, em pacientes transplantados com rim de cadáver.

### **b) - Secundários :**

Avaliar a interação entre a presença pré-transplante de baixos níveis de anticorpos antidoador somente detectados por prova cruzada por citometria de fluxo, mas não por linfocitotoxicidade, o número de incompatibilidades DR e A+B+DR e o tipo de medicamentos imunossupressores utilizados, quanto à sua influência conjunta na sobrevida do enxerto.

Avaliar a relação entre a presença desses baixos níveis de anticorpos antidoador, o grau de sensibilização pré-transplante, o número de incompatibilidades DR e A+B+DR, o tipo de medicamentos imunossupressores utilizados e o número de episódios de rejeição aguda por paciente, o tempo entre o transplante e a ocorrência da primeira rejeição aguda e a ocorrência de rejeição esteróide-resistente.

Analisar o papel que pode ter a citometria de fluxo, como forma mais sensível de detectar anticorpos específicos antidoador, na alocação de órgãos, na avaliação de cada conjunto doador-receptor e na escolha dos medicamentos imunossupressores utilizados para indução e manutenção.

**ANTICORPOS ANTIDOADOR EM BAIXOS NÍVEIS DETECTADOS POR  
MEIO DE PROVA CRUZADA POR CITOMETRIA DE FLUXO PRÉ-  
TRANSPLANTE : INFLUÊNCIA NA SOBREVIDA DO ENXERTO EM  
TRANSPLANTES DE RIM DE CADÁVER**

Michet da Silva LA,<sup>1</sup> Friend PJ,<sup>2</sup> Sutton M,<sup>2</sup> Fuggle SV<sup>2</sup>

Centro de Transplantes de Oxford, Hospital Churchill, Universidade de Oxford, Reino Unido  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>1</sup> Programa de Pós - Graduação em Ciências Médicas : Nefrologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup> Centro de Transplantes de Oxford, Hospital Churchill, Universidade de Oxford, Reino Unido

## RESUMO

**Introdução** . A realização de prova cruzada pré-transplante por linfocitotoxicidade dependente de complemento tem permitido, há muitos anos, detectar a presença de anticorpos linfocitotóxicos no soro do receptor contra linfócitos do doador, que se associam com rejeição hiperaguda ou acelerada e perda precoce do enxerto. O desenvolvimento de métodos de maior sensibilidade, como a citometria de fluxo, passou a permitir que se detectassem níveis mais baixos de anticorpos antidoador, não fixadores de complemento e, portanto, não detectáveis por linfocitotoxicidade. O efeito de tais anticorpos, somente detectados por prova cruzada por citometria de fluxo, na evolução dos transplantes de rim de cadáver, não está adequadamente determinado, pois os resultados de diversos estudos não são uniformes em mostrar número de episódios de rejeição aguda ou sobrevida do enxerto significativamente diferentes em sua presença. Desconhece-se, também, a interação que possa existir entre tais anticorpos e outros elementos, como grau de compatibilidade HLA, nível de hipersensibilização prévia e esquema imunossupressor utilizado.

**Métodos.** No presente estudo, foram analisados 657 transplantes consecutivos de rim de cadáver com prova cruzada negativa por linfocitotoxicidade realizados em um único centro, durante um período de 11 anos. Prova cruzada por citometria de fluxo (PCCF) prospectiva pré-transplante resultou positiva em 130 e negativa em 527 casos. A informação sobre PCCF positiva foi utilizada paralelamente a outros dados imunológicos na alocação órgãos e na escolha dos imunossupressores. Análise retrospectiva permitiu obter dados relativos a número de incompatibilidades HLA, hipersensibilização prévia, ocorrência de função retardada do enxerto, episódios de rejeição aguda, episódios de rejeição esteróide-resistente e sobrevida de enxertos e pacientes.

**Resultados.** Pacientes de retransplante e pacientes com sensibilização > 84% receberam órgãos com menor número de incompatibilidades DR e A+B+DR e imunossupressão mais intensa, e sua sobrevida de enxerto não foi

estatisticamente diferente de pacientes de transplantes primários ou com menores graus de sensibilização. O único fator que se associou significativamente à ocorrência de rejeição esteróide-resistente foi a existência de incompatibilidades em DR. Os fatores que trouxeram risco relativo significativamente maior em relação à sobrevida do enxerto foram: receptor feminino, presença de PCCF positiva, isquemia fria prolongada e presença de função retardada do enxerto. Em relação à sobrevida do paciente, idade mais avançada do receptor, isquemia fria prolongada, presença de função retardada do enxerto e imunossupressão de manutenção mais intensa trouxeram risco relativo significativamente aumentado, enquanto que cada ano subsequente do calendário trouxe risco relativo significativamente menor.

Na coorte global, pacientes com PCCF positiva receberam órgãos com melhor compatibilidade DR e mais intensa imunossupressão, tanto em indução como manutenção, mas apresentaram sobrevida do enxerto significativamente inferior àqueles com PCCF negativa em 1 ano (87% vs. 92%), 2 anos (83% vs. 91%) e em 5 anos (75% vs. 87%) (Risco Relativo: 1,7; IC 95%: 1,1 – 2,6; p = 0,028). Não houve diferença em número de episódios de rejeição aguda ou proporção de casos com rejeições esteróide-resistentes.

Para pacientes com sensibilização prévia entre 0 e 14%, não houve diferença na sobrevida do enxerto entre casos com PCCF positiva e negativa. Para pacientes com sensibilização prévia entre 15 e 50%, a sobrevida do enxerto foi significativamente inferior para os casos com PCCF positiva do que para aqueles com PCCF negativa; não houve entre eles diferença estatisticamente significativa em relação a número de incompatibilidades DR ou A+B+DR ou em relação à intensidade de imunossupressão. Nos casos com sensibilização prévia entre 51 e 100%, os pacientes com PCCF positiva receberam órgãos com número significativamente menor de incompatibilidades DR e A+B+DR e imunossupressão mais intensa do aqueles com PCCF negativa e não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida do enxerto entre eles.

**Conclusões.** A presença de PCCF positiva teve impacto negativo estatisticamente significativo na sobrevida do enxerto na coorte global de

pacientes transplantados com rim de cadáver. Considerando-se somente pacientes com sensibilização entre 0 e 14%, não houve diferença na sobrevida do enxerto entre casos com PCCF negativa ou positiva. Para pacientes com graus maiores de sensibilização, a presença de PCCF positiva associou-se a sobrevida significativamente inferior do enxerto quando não houve diferença em relação a número de incompatibilidades HLA ou intensidade de imunossupressão; quando os pacientes com PCCF positiva receberam benefício de melhor compatibilidade DR e A+B+DR e mais intensa imunossupressão, a sobrevida de seus enxertos, embora tendendo a ser mais baixa, não foi significativamente diferente da apresentada por aqueles com PCCF negativa. Na atualidade, apesar dos eficientes imunossupressores disponíveis, a compatibilidade HLA continua desempenhando papel de grande importância para a obtenção de melhores resultados nos transplantes de rim de cadáver.

## INTRODUÇÃO

Muitos fatores são responsáveis pela melhora progressiva dos resultados do transplante renal nas últimas décadas, incluindo expansão de conhecimentos e experiência, melhores cuidados gerais aos pacientes, mais eficientes recursos diagnósticos, aperfeiçoamento de técnicas e procedimentos, e novas abordagens terapêuticas, com medicamentos mais eficazes para profilaxia e tratamento de rejeição e infecção. Melhores taxas de sobrevida para enxertos e pacientes têm sido obtidas pelo efeito combinado de diversas variáveis imunológicas, clínicas e terapêuticas.

Um estudo com grande número de pacientes realizado no Reino Unido mostrou que o ano de realização do transplante, a idade do doador, a causa de óbito do doador, a idade do receptor, a presença de diabetes no receptor, o tempo de isquemia fria, o transporte do rim, o efeito do centro de transplantes em si e a compatibilidade HLA estavam significativamente associados com a evolução do enxerto, em uma análise multifatorial. Considerando o grau de compatibilidade HLA, a melhor evolução foi obtida com rins que não apresentavam incompatibilidades nos loci HLA-A, HLA-B e HLA-DR (incompatibilidades 000); a seguinte evolução mais favorável foi obtida com uma incompatibilidade em locus A ou locus B ou uma incompatibilidade em cada um deles, mas sem incompatibilidades no locus DR (incompatibilidades 100, 010, 110) (1).

Existe, de modo geral, uma preocupação maior a respeito de retransplantes e transplantes em pacientes altamente sensibilizados, já que sua sobrevida de enxerto tem sido menor do que a obtida em primeiros transplantes ou transplantes em pacientes não sensibilizados, em algumas séries com grande número de casos (2).

Por outro lado, alguns pesquisadores têm publicado que, pela oferta de rins com melhor compatibilidade HLA para pacientes altamente sensibilizados, sua sobrevida de enxerto pode se tornar semelhante àquela obtida por pacientes menos sensibilizados (3-8).

Algumas novas abordagens a respeito da compatibilidade doador-receptor, como a avaliação da compatibilidade HLA a nível molecular pela comparação de especificidades antigênicas representadas por tríades de aminoácidos (9, 10) e a descoberta de determinados alvos imunológicos previamente desconhecidos (11,12), provavelmente trarão ainda maiores benefícios às estratégias já utilizadas com o objetivo de realizar transplantes com a melhor compatibilidade possível.

Diversos estudos demonstram a participação de mecanismos celulares e humorais (anticorpos contra antígenos do doador) no conjunto de respostas imunológicas que constituem o processo de rejeição aos aloenxertos (13-16).

Embora anticorpos reativos contra antígenos HLA do doador tenham sido frequentemente encontrados no soro de pacientes com enxertos sendo rejeitados,



a detecção e o tratamento da rejeição têm historicamente sido focados, basicamente, nos processos mediados por células, cujas evidências histológicas são mais facilmente pesquisadas e detectadas.

Somente em época recente, demonstrou-se a existência de um elemento específico nas biópsias de rim transplantado, cuja presença desempenha papel de marcador histológico confiável de rejeição aguda mediada por anticorpos. Tal achado corresponde especificamente à detecção de depósitos da fração C4d do complemento nos capilares peritubulares, evidência que se tornou disponível apenas nos anos 90 (17). Esse ítem diagnóstico foi posteriormente incluído como critério de rejeição humoral ou mediada por anticorpos na classificação de Banff da rejeição de aloenxertos renais (18); também foi demonstrado que em biópsias realizadas por rotina de protocolo no sétimo dia pós-transplante, a presença de depósitos de C4d em capilares peritubulares é um marcador específico da presença de rejeição humoral, estando significativamente associada à detecção de anticorpos específicos contra o doador e a achados histológicos de rejeição aguda (19).

Por outro lado, alguns estudos recentes têm demonstrado que depósito de C4d em capilares peritubulares pode também ser um marcador de injúria imunológica crônica, contribuindo para nefropatia crônica do enxerto (20, 21).

A detecção de anticorpos anti-HLA no soro do receptor tem sido associada com maior perda de enxerto em alguns estudos observacionais multicêntricos (22) e em alguns estudos de caso-controle (23). A pesquisa de tais anticorpos tem sido realizada por meio de linfocitotoxicidade dependente de complemento, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e citometria de fluxo (22-25, 57). Embora o grau de sensibilização pré-transplante tenha sido tradicionalmente avaliado por meio da reatividade contra um painel de doadores (2), a reatividade de um paciente específico pode variar substancialmente de acordo com a composição do painel utilizado. A determinação do perfil completo de anticorpos anti-HLA poderia permitir um melhor conhecimento da provável reatividade de cada receptor contra uma população de potenciais doadores na qual a prevalência das especificidades antigênicas HLA é conhecida (8).

Paralelamente ao conhecimento do perfil de anticorpos anti-HLA do receptor, é mandatário e fundamental o resultado da prova cruzada específica pré-transplante realizada entre uma amostra de soro do receptor e linfócitos do doador.

Os métodos e técnicas desenvolvidos para detectar anticorpos reativos contra o doador têm tido sua precisão e sensibilidade aumentadas e melhoradas ao longo de vários anos.

O fato de que rejeição hiperaguda e perda precoce do enxerto podem ser causadas por anticorpos fixadores de complemento pré-formados e prevenidas por meio de prova cruzada por linfocitotoxicidade dependente de complemento (PCCDC) é bem conhecido desde os anos 60 (27-29).

Algumas técnicas modificadas de PCCDC, tais como tempo de incubação mais prolongado, provas cruzadas para linfócitos T e B potencializadas pelo uso de imunoglobulina anti-humana (*antihuman immunoglobulin - AHG*), e uso de Dithiothreitol (DTT) para reduzir anticorpos IgM, foram desenvolvidas com o objetivo de detectar níveis mais baixos de imunoglobulinas reativas contra o doador e de aumentar a especificidade do teste (30-38).

O emprego rotineiro desses procedimentos na realização da PCCDC virtualmente eliminou a ocorrência de rejeição hiperaguda de aloenxertos renais.

A prova cruzada por meio de citometria de fluxo (PCCF), originalmente descrita por Garovoy et al. (39), não depende de fixação de complemento, é menos subjetiva do que a avaliação da morte celular nos testes dependentes de complemento, já que utiliza um anticorpo secundário fluorescente para fornecer uma medida semi-quantitativa dos anticorpos ligados à superfície dos linfócitos, e tem maior sensibilidade do que as provas que empregam citotoxicidade para detectar baixos níveis de anticorpos antidoador (40-48).

Alguns pesquisadores demonstraram que pacientes selecionados para retransplante renal cadavérico por prova cruzada negativa por citometria de fluxo apresentavam melhor sobrevida do enxerto do que aqueles selecionados apenas por uma prova cruzada negativa por linfocitotoxicidade dependente de complemento potencializada por imunoglobulina anti-humana (49).

Diversos estudos têm indicado que a presença de anticorpos anti-antígenos HLA do doador detectados por uma PCCF positiva podem estar associados com mais freqüente perda precoce do enxerto (< 3 meses) em transplantes primários (50, 51), em retransplantes (52) ou em séries incluindo transplantes primários e retransplantes (53, 54). Esses anticorpos têm também sido associados com um aumento da ocorrência de episódios de rejeição aguda (55-59) e com sobrevida menor do enxerto (50, 57, 60, 61), tanto considerando PCCF contra linfócitos T como contra linfócitos B (60, 61). Alguns pesquisadores relataram que a detecção de tais anticorpos, após transplante renal, depende do tipo de drogas imunossupressoras usadas (22, 62), podendo os mesmos estar associados com rejeição aguda (62) e com falência do enxerto (22).

Entretanto, outros estudos não detectaram nenhuma diferença em relação à ocorrência de rejeição aguda (63-65) ou em relação à sobrevida do enxerto (58, 63, 64) entre pacientes com PCCF negativa e positiva.

As dificuldades para se alcançar uniformidade e padronização na técnica da prova cruzada por citometria de fluxo e o variável ponto de corte entre testes negativos e positivos adotado por diferentes autores (49, 50, 54, 55, 57, 59, 63-66) representam pontos desfavoráveis para uma interpretação mais adequada dos resultados e para estabelecimento de comparação entre diferentes séries.

Dessa maneira, a verdadeira relevância clínica de anticorpos IgG detectados por citometria de fluxo, mas não por prova cruzada por linfocitotoxicidade dependente de complemento, não foi, até agora, claramente estabelecida; embora não seja necessariamente uma contraindicação ao transplante, a presença desses anticorpos parece trazer um significativo risco adicional que não pode ser desconsiderado (67).

Existe necessidade de mais dados e mais evidências a respeito do efeito desses baixos níveis de anticorpos antidoador na sobrevida do enxerto e a respeito de sua relação com outros fatores de risco para falência do órgão transplantado, como grau de sensibilização pré-transplante, número de incompatibilidades HLA e protocolo de imunossupressão.

As sobrevidas de enxerto e paciente são instrumentos de grande utilidade para a análise dos resultados do transplante renal e para estudar o impacto positivo ou negativo de diversos fatores. Entretanto, como muitas variáveis atuam simultaneamente, podem interagir entre si, influenciando a sobrevida de forma independente ou associada. Assim, é mandatário o uso de análise multivariada, especificamente da Regressão de Cox de Riscos ou Azares Proporcionais (*Cox Regression Proportional Hazard Model*), para estudar esta interação e para avaliar o papel individual de cada fator (68). Nesse contexto, a presença ou ausência de uma prova cruzada positiva por citometria de fluxo deve ser incluída na análise, simultaneamente a outras variáveis imunológicas, clínicas e terapêuticas.

Analizamos neste estudo uma coorte de receptores de rim de cadáver transplantados em um único centro durante um período de 11 anos, com o objetivo de testar a hipótese de que a existência pré-transplante de anticorpos reativos contra o doador somente detectados por PCCF e não por PCCDC está associada com menor sobrevida do enxerto. Também procuramos avaliar a possível relação entre esses anticorpos e outros fatores de risco para falência do enxerto, como nível de sensibilização pré-transplante, número de incompatibilidades HLA e tipo de medicamentos imunossupressores utilizados.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Pacientes e Coleta de Dados*

O estudo analisou uma coorte de 657 receptores consecutivos de rim de cadáver transplantados com prova cruzada IgG – CDC negativa, no Centro de Transplantes de Oxford (*Oxford Transplant Centre, Churchill Hospital, Oxford*

*Radcliffe Hospitals, University of Oxford, Oxford, United Kingdom*), entre janeiro de 1993 e dezembro de 2003. Todos pacientes tiveram também uma prova cruzada realizada prospectivamente no pré-transplante por citometria de fluxo com amostras de soro atual (pré-transplante) e de soro de maior reatividade contra painel (atual ou histórico).

A decisão de prosseguir ou não a realização do transplante, em cada conjunto específico doador-receptor, foi tomada considerando-se diversos elementos clínicos do potencial receptor, seu risco cirúrgico, seu provável grau de risco imunológico relacionado com sensibilização prévia, as características do doador e o grau de compatibilidade HLA. Uma PCCF positiva como elemento isolado, na presença de uma prova cruzada IgG-CDC negativa, não foi considerada contra-indicação ao transplante, mas esta informação foi levada em conta, com outros dados clínicos e imunológicos relevantes, na alocação de órgãos, na avaliação de cada paciente e no processo de escolha dos medicamentos imunossupressores.

A avaliação do grau de sensibilização pré-transplante incluiu reatividade contra painel e pesquisa do perfil de anticorpos anti-HLA do receptor, por uma combinação de linfocitotoxicidade dependente de complemento, ELISA e citometria de fluxo.

Uma análise retrospectiva foi realizada nas fichas de controle da evolução do transplante e no prontuário hospitalar de cada paciente, e também na base de dados computadorizada do Centro de Transplantes, para obter as seguintes informações: dados demográficos de doadores e receptores, causa da insuficiência renal crônica, número do transplante (primeiro ou retransplante), datas de transplante, falência do enxerto e óbito, resultados de sensibilização ("reatividade contra painel") pré-transplante (atual) e mais elevada ("pico" de reatividade) do paciente (atual ou histórica), número de incompatibilidades HLA – A, B e DR, resultado de prova cruzada por linfocitotoxicidade, resultado de prova cruzada por citometria de fluxo com soro atual e também com o soro de maior reatividade do paciente, ocorrência ou não de função retardada do enxerto (FRE – definida neste estudo como a necessidade de diálise dentro da primeira semana

pós-transplante), medicamentos imunossupressores de indução e de manutenção, ocorrência ou não de rejeição aguda, tempo entre o transplante e o primeiro episódio de rejeição aguda, número de episódios de rejeição aguda dentro dos três primeiros meses e ocorrência ou não de rejeição esteróide-resistente.

Os desfechos estudados foram sobrevida do enxerto e do paciente, número de episódios de rejeição aguda, tempo até a primeira rejeição aguda e ocorrência de rejeição esteróide-resistente. Estudou-se o efeito da existência ou não de uma PCCF positiva e de outros fatores clínicos, imunológicos e terapêuticos sobre os desfechos descritos.

O teste do Qui-Quadrado foi utilizado para comparação de variáveis categóricas; para variáveis contínuas, as avaliações comparativas foram feitas por meio de Teste T (tratando-se de dois grupos) ou Análise da Variância (tratando-se de três grupos). A sobrevida de enxertos e pacientes foi determinada pelo método de Kaplan-Meier; comparação de sobrevida entre diferentes grupos foi realizada pelo teste Log-Rank (*Log-Rank Test*). Na análise da sobrevida do órgão transplantado, pacientes que morreram com rim funcionante não foram considerados como falência do enxerto (*graft survival censored for death*). A influência de diversas variáveis contínuas e categóricas na sobrevida foi estudada por meio do Modelo de Azares Proporcionais da Regressão de Cox (*Cox Regression Proportional Hazard Model*), o que permitiu obter valores de Razão de Densidades de Incidência, ou, simplesmente, Risco Relativo (RR) (*Hazard Ratio – HR*).

As análises estatísticas foram desenvolvidas por meio de programa computadorizado (*Statistical Package for the Social Sciences – SPSS – version 12.0*). Foram determinados valor  $p$  e Intervalo de Confiança (IC) de 95% para cada teste estatístico realizado.

### *Medicamentos Imunossupressores*

A imunossupressão de manutenção incluiu Ciclosporina A, Azatioprina e Prednisolona para todos pacientes, desde janeiro de 1993 até maio de 2001, com exceção de alguns pacientes que participaram de grupos de avaliação de novas drogas, como Micofenolato Mofetil (MMF) e Sirolimus.

A partir de junho de 2001 até dezembro de 2003, um novo protocolo de imunossupressão foi estabelecido, com três níveis de intensidade: o Nível de Intensidade Baixo (receptores com 0-2 incompatibilidades A+B+DR, sem rejeição de enxertos prévios, e sem hipersensibilização) incluía Ciclosporina A, Azatioprina e Prednisolona; o Nível de Intensidade Médio (receptores com 3-4 incompatibilidades A+B+DR e/ou perda prévia de enxerto por rejeição, mas com mais alta sensibilização pré-transplante inferior a 85%) incluía Ciclosporina A, MMF e Prednisolona, com conversão de MMF para Azatioprina após 3 a 12 meses, dependendo do número e severidade de episódios de rejeição; o Nível de Intensidade Alto (receptores com 5-6 incompatibilidades A+B+DR e/ou mais elevada sensibilização pré-transplante igual ou acima de 85%) incluía indução com 14 dias de Anti-Timoglobulina (ATG) ou 10 dias de Muromonab-CD3 (OKT3) ou duas doses de Basiliximab, com imunossupressão de manutenção com Tacrolimus, MMF e Prednisolona. Sirolimus foi empregado fundamentalmente como uma alternativa para pacientes com comprovada nefrotoxicidade por inibidores da calcineurina (Ciclosporina A ou Tacrolimus), com o objetivo de evitar este tipo de drogas imunossupressoras.

A dose inicial foi de 8 mg/Kg/dia para Ciclosporina A e 0.2 mg/Kg/dia para Tacrolimus, com metade da dose diária administrada de 12 em 12 horas. As doses de Ciclosporina A, Tacrolimus e Sirolimus foram ajustadas para se obterem níveis sanguíneos de vale (nível pré-administração da dose matinal) respectivamente entre 150 – 300 ng/mL, 10 – 15 ng/mL e 10 – 15 ng/mL durante os primeiros 6 meses, e respectivamente entre 75 – 150 ng/mL, 5 – 10 ng/mL e 6

– 10 ng/mL após 6 meses. Azatioprina foi iniciada a 1.5 mg/Kg/dia e MMF, a 1g (com Ciclosporina A) ou 0,5g (com Tacrolimus ou Sirolimus) 2 vezes por dia, com posteriores ajustes, conforme necessário, para manter contagem de leucócitos superior a 4000/microL. Prednisolona foi administrada em dose inicial de 20 mg por dia para pacientes com peso igual ou superior a 60 Kg; pacientes com peso inferior a esse valor receberam 15 mg por dia. Diminuição lenta da dose de Prednisolona foi iniciada a partir do segundo mês pós-transplante, tendo sido seu uso descontinuado na maioria dos pacientes até o final do segundo ano.

Pacientes com FRE, definida no protocolo do Centro de Transplantes de Oxford como a necessidade de diálise ou a não-redução da creatinina plasmática em pelo menos 10%, nas primeiras 24 horas pós-transplante, tiveram a dose do inibidor de calcineurina reduzida pela metade e ajustada para se obter nível sanguíneo equivalente à metade dos descritos anteriormente, e, se o paciente estava recebendo Azatioprina, esta era substituída por MMF. Se a FRE persistia por mais de 7 dias, o inibidor de calcineurina era suspenso durante 10 a 14 dias, e ATG era empregada durante esse período. ATG foi administrada em dose de 2mg/Kg; de acordo com monitoramento diário da contagem de linfócitos CD3, a dose de ATG era repetida quando necessário, com o objetivo de manter a contagem de tais células inferior a 50/microL. Durante o período de janeiro de 1993 até maio de 2001, não havia alteração no protocolo de imunossupressão na presença de FRE.

Os episódios de rejeição aguda foram tratados com três pulsos diários de 500 mg de Metilprednisolona e as rejeições esteróide-resistentes, com 10 a 14 dias de ATG ou OKT3.

Para os objetivos deste estudo, consideramos a imunossupressão de manutenção como "moderada" se o paciente recebeu apenas Ciclosporina A, Azatioprina e Prednisolona, e "intensa", se o protocolo incluiu MMF e/ou Tacrolimus e/ou Sirolimus em adição às drogas anteriores ou em substituição a alguma delas. Qualquer um dos medicamentos imunossupressores de manutenção, se utilizado apenas temporariamente, por um período inferior a 30 dias, não foi considerado.



### *Prova Cruzada Pré-Transplante*

#### **Linfocitotoxicidade Dependente de Complemento (CDC):**

Prova cruzada por linfocitotoxicidade foi realizada para detectar a presença de anticorpos IgG citotóxicos fixadores de complemento contra linfócitos do doador no soro do receptor.

Linfócitos T e B do doador foram isolados de linfócitos do sangue periférico ou de linfócitos obtidos do baço, utilizando-se micropartículas imunomagnéticas (DynaI, UK). Prova cruzada por CDC foi realizada com células T e B isoladas, empregando as técnicas diagnósticas atualmente em uso no Centro de Transplantes de Oxford (69).

Resumidamente, utilizou-se o seguinte procedimento: 1 µl de linfócitos T e B ( $2,0 \times 10^6/\text{ml}$ ) foram incubados com amostras de soro do receptor por 30 minutos a  $22^{\circ}\text{C}$  na presença e na ausência de Dithiothreitol (DTT). Após a adição de 5 µl de complemento de coelho, procedeu-se incubação por mais 90 minutos para linfócitos T e 75 minutos para linfócitos B.

A leitura das placas foi realizada com microscópio ultravioleta, utilizando-se laranja de acridina e brometo de etídio para diferenciar células vivas e mortas. O critério adotado para considerar positiva uma prova cruzada por linfocitotoxicidade dependente de complemento correspondeu a uma proporção de lise celular superior a 10%.

#### **Citometria de Fluxo (CF):**

Prova cruzada por citometria de fluxo foi realizada para detectar anticorpos IgG reativos contra linfócitos do doador no soro do receptor.

Em síntese, 10 µl de soro foram incubados com 40 µl de suspensão de células (concentração de  $2,0 \times 10^6/\text{ml}$ ) a  $22^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Após lavagem em solução salina tamponada com fosfato (SSTF) contendo 0,1% de azida sódica e

0,1% de albumina sérica bovina (*PBS - phosphate buffered saline*), adicionou-se a cada tubo 50 µl de conjugado fluorescente F(ab')<sub>2</sub> de coelho anti-IgG humana (DAKO Ltd), diluído a 1:20 em meio de Terasaki (*Terasaki Park medium*) contendo 0,1% de azida sódica, incubando-se então por 45 minutos a 4°C. A fração do marcador que permaneceu livre foi removida por lavagem com SSTF, sendo as células re-suspensas em 500 µl de SSTF para análise em citômetro de fluxo (*FACScan flow cytometer - Becton Dickinson*). Soro normal AB, de homens não transfundidos, foi utilizado como controle negativo e uma mistura de soro anti-HLA-Bw4 e anti-Bw6, como controle positivo. Uma diluição do controle positivo foi empregada como marcador da sensibilidade do teste (69). O anticorpo de coelho anti-IgG humana de coelho utilizado não apresenta reação cruzada com a anti-timoglobulina (ATG) utilizada para indução, para tratamento de rejeição esteróide-resistente ou para manejo de pacientes com FRE superior a sete dias. Foram consideradas positivas as provas cruzadas por citometria de fluxo nas quais o deslocamento da média de canais de intensidade de fluorescência (*medium channel shift*) foi superior a 10 em uma escala logarítmica de 256 canais, em relação ao controle negativo.

#### *Diagnóstico de Rejeição Aguda – Biópsia do Enxerto*

Biópsias de rotina do enxerto foram realizadas, de acordo com o protocolo do Centro, no sétimo e no vigésimo oitavo dias pós-transplante; além disso, biópsias foram também realizadas sempre que houve indicação clínica, por suspeita de rejeição ou por aumento inexplicado da creatinina. Todos episódios de rejeição aguda foram comprovados por biópsia; o estudo histopatológico para diagnóstico e avaliação da severidade da rejeição foi realizado de acordo com os critérios de Banff (13). Um episódio de rejeição foi considerado esteróide-resistente se, após três pulsos diários de 500 mg de Metilprednisolona, os níveis

de creatinina plasmática continuaram em elevação e o paciente recebeu tratamento com ATG ou OKT3 durante 10 a 14 dias.

## RESULTADOS

A causa da insuficiência renal crônica foi glomerulonefrite crônica em 164 pacientes (25%), doença renal policística autossômica dominante em 110 (16.7%), nefropatia diabética em 74 (11.3%), pielonefrite crônica em 72 (11%), hipertensão arterial em 33 (5%), outras doenças em 105 (16%) e desconhecida em 99 (15%).

Eram do sexo masculino 385 receptores (58,6%) e 339 doadores (51,6%). A média  $\pm$  desvio-padrão das idades dos doadores foi  $43 \pm 15$  anos e a dos receptores,  $46 \pm 13$  anos. O rim transplantado originou-se de um hospital local em Oxford, em 411 casos (63%) e de outro centro do Serviço de Transplante do Reino Unido (*United Kingdom Transplant Service – UKTS*) em 246 casos (37%). Houve 551 primeiros transplantes (84%) e 106 re-transplantes (16%). Nos re-transplantes, houve 87 segundos transplantes, 17 terceiros transplantes e 2 quartos transplantes. O tempo (média  $\pm$  desvio-padrão) de isquemia fria foi  $20,4 \pm 8$  horas e o de anastomose,  $41 \pm 12$  minutos.

A Tabela 1 mostra o número de incompatibilidades DR e A+B+DR, a imunossupressão utilizada, tanto para indução como para manutenção, a proporção de casos com função retardada do enxerto, a proporção de casos com rejeição aguda, o número de episódios de rejeição aguda por paciente nos 3 primeiros meses pós-transplante, o tempo desde o transplante até o primeiro episódio de rejeição aguda, a proporção de pacientes com rejeição esteróide-resistente e a sobrevivência de enxertos e pacientes, considerando-se a totalidade da coorte.

**TABELA 1**  
**Centro de Transplantes de Oxford (Oxford Transplant Centre)**  
**Transplantes com Rim de Cadáver 1993 – 2003 ( n = 657 )**

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| Incompatibilidades DR ( 0 – 1 – 2 )            | N = 370 – 267 – 20                    |
| <b>Incompatibilidades DR / Paciente</b>        | <b>0,47 ± 0,56</b>                    |
| Incompatibilidades A+B+DR (0-1-2-3-4-5-6)      | N= 63 – 75 – 190 – 199 – 109 – 20 – 1 |
| <b>Incompatibilidades A+B+DR / Paciente</b>    | <b>2,43 ± 1,3</b>                     |
| <b>Imunossupressão – Indução :</b>             |                                       |
| ATG (n=66) OKT3 (n=4) Basiliximab (n=30)       | 100 ( 16 % )                          |
| <b>Imunossupressão – Manutenção :</b>          |                                       |
| “moderada” : CyA + Aza + Pred                  | 401 ( 61 % )                          |
| “intensa” : CyA/Tac + Aza/MMF/Sirolimus + Pred | 256 ( 39 % )                          |
| <b>Função Retardada do Enxerto</b>             | 222 ( 34 % )                          |
| <b>Rejeição Aguda</b>                          | 269 ( 41 % )                          |
| <b>Episódios de Rejeição Aguda / Paciente</b>  | 0,51 ± 0,67                           |
| <b>Rejeição Esteróide – Resistente</b>         | 63 ( 9,6 % )                          |
| <b>Tempo até a 1ª Rejeição (dias)</b>          | 16 ± 15                               |
| Sobrevida do Enxerto: 1 ano – 2 anos – 5 anos  | 91 % - 89 % - 85 %                    |
| Sobrevida do Paciente: 1 ano – 2 anos – 5 anos | 94 % - 92 % - 87 %                    |
| Pacientes em risco : 1 ano – 2 anos – 5 anos   | 546 – 460 – 258                       |

ATG = Anti-tioglobulina      OKT3 = Muromonab-CD3      CyA = Ciclosporina A  
 Aza = Azatioprina      Tac = Tacrolimus      Pred = Prednisona      MMF = Micofenolato Mofetil

Uma comparação entre primeiros transplantes (n = 551) e retransplantes (n = 106) não mostrou diferença em relação à idade do doador ( $43 \pm 15$  vs.  $41 \pm 15$  anos;  $p = 0,280$ ), sexo do doador (doadores femininos: 49% vs. 45%;  $p = 0,548$ ), sexo dos receptores (receptores femininos: 41% vs. 43%;  $p = 0,649$ ) e tempo de isquemia fria ( $21 \pm 8$  vs.  $20 \pm 8$  horas;  $p = 0,199$ ).

De acordo com a Tabela 2, os receptores de retransplante eram significativamente mais jovens (apesar de provavelmente essa diferença não ter relevância clínica), apresentavam maior sensibilização pré-transplante, tanto atual como de “pico”, tinham uma proporção significativamente maior de pacientes com PCCF positiva, tanto considerando testes realizados com soro atual como com soro mais reativo, e também uma maior proporção de pacientes com função retardada do enxerto. Por outro lado, pacientes do grupo retransplante receberam rins com um número significativamente menor de incompatibilidades DR e A+B+DR, e entre eles, a proporção de receptores que receberam indução com anticorpos monoclonais ou policlonais foi significativamente maior que entre os

que receberam primeiros transplantes; a intensidade da imunossupressão de manutenção, entretanto, não foi diferente entre os dois grupos. A proporção de pacientes com rejeição aguda e o número de episódios de rejeição aguda por paciente foram menores entre os retransplantes do que entre os primeiros transplantes; o tempo até a primeira rejeição foi mais longo para os re-transplantes do que para os primeiros transplantes; a proporção de casos com rejeição esteróide-resistente foi a mesma entre eles. A sobrevida do enxerto foi equivalente para retransplantes e primeiros transplantes.

**TABELA 2**  
**Transplantes Primários x Retransplantes**

|   | Tx primários      | Retransplantes    | p             |
|---|-------------------|-------------------|---------------|
| <b>N</b>                                    | <b>551</b>        | <b>106</b>        |               |
| <b>Idade do receptor</b>                    | <b>46 ± 13</b>    | <b>44 ± 12</b>    | <b>0,045</b>  |
| <b>RCP atual (pré-Tx)</b>                   | <b>8 ± 12 %</b>   | <b>36 ± 33 %</b>  | <b>0,0001</b> |
| <b>RCP mais elevada ("pico")</b>            | <b>14 ± 19 %</b>  | <b>53 ± 34 %</b>  | <b>0,0001</b> |
| <b>PCCF + c/soro atual (pré-Tx)</b>         | <b>14 %</b>       | <b>26 %</b>       | <b>0,003</b>  |
| <b>PCCF + c/soro do "pico"</b>              | <b>18 %</b>       | <b>29 %</b>       | <b>0,01</b>   |
| <b>FRE</b>                                  | <b>32 %</b>       | <b>45 %</b>       | <b>0,007</b>  |
| <b>Incompatibilidades DR / Paciente</b>     | <b>0,5 ± 0,6</b>  | <b>0,29 ± 0,5</b> | <b>0,0001</b> |
| <b>Incompatibilidades A+B+DR / Paciente</b> | <b>2,6 ± 1,2</b>  | <b>1,8 ± 1,3</b>  | <b>0,0001</b> |
| <b>Indução</b>                              | <b>11 %</b>       | <b>36 %</b>       | <b>0,0001</b> |
| <b>IMM manutenção "intensa"</b>             | 39 %              | 40%               | 0,856         |
| <b>Rejeição Aguda</b>                       | <b>43 %</b>       | <b>31 %</b>       | <b>0,022</b>  |
| <b>Rejeições Agudas/Paciente</b>            | <b>0,54 ± 0,7</b> | <b>0,32 ± 0,5</b> | <b>0,0001</b> |
| <b>Tempo até a 1ª Rejeição (Dias)</b>       | <b>15 ± 14</b>    | <b>23 ± 18</b>    | <b>0,018</b>  |
| <b>Rejeição Esteróide-Resistente</b>        | 9,6 %             | 9,4 %             | 0,940         |
| <b>Sobrevida do enxerto</b>                 |                   |                   |               |
| 1 ano                                       | 91 %              | 91 %              | 0,711         |
| 2 anos                                      | 89 %              | 90 %              | 0,711         |
| 5 anos                                      | 84 %              | 86 %              | 0,711         |

RCP = Reatividade contra painel      PCCF = Prova cruzada por citometria de fluxo

RCP mais elevada ("pico") = RCP mais elevada (pré-transplante ou histórica)

PCCF + = Prova cruzada por citometria de fluxo positiva

FRE = Função retardada do enxerto      IMM = Imunossupressão      Tx = Transplante

Os receptores hipersensibilizados (mais elevada reatividade contra painel entre 85 e 100 %; n = 42) não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação aos demais pacientes (mais elevada reatividade contra painel entre 0 e

84 %; n = 615) quanto à idade do doador ( $43 \pm 15$  vs  $43 \pm 18$  anos;  $p = 0,894$ ) e sexo do doador (doadores femininos: 48% vs. 50%;  $p = 0,874$ ).

Conforme pode ser observado na Tabela 3, os receptores hipersensibilizados apresentavam idade significativamente menor, uma proporção significativamente maior de retransplantes e de casos com PCCF positiva, um tempo de isquemia fria significativamente mais longo, e uma proporção significativamente maior de casos com função retardada do enxerto. Por outro lado, os pacientes hipersensibilizados receberam transplantes com um número significativamente menor de incompatibilidades DR e A+B+DR e tiveram uma proporção significativamente maior de receptores que receberam indução com anticorpos monoclonais ou policlonais. Não houve diferença em relação à proporção de pacientes que receberam imunossupressão de manutenção "intensa" nos dois grupos.

**TABELA 3**

**Distribuição dos pacientes de acordo com sua mais elevada sensibilização (anticorpos IgG) pré-transplante (reatividade contra painel – RCP – IgG)**  
(0 – 84 %) vs. (85 – 100 %)

|   | Sensibilização<br>0 – 84 %       | Sensibilização<br>85 – 100 %     | p             |
|---|----------------------------------|----------------------------------|---------------|
| <b>N</b>                                    | <b>615</b>                       | <b>42</b>                        |               |
| <b>Idade do receptor</b>                    | <b><math>47 \pm 13</math></b>    | <b><math>42 \pm 11</math></b>    | <b>0,026</b>  |
| <b>RCP mais elevada ("pico")</b>            | <b><math>16 \pm 18</math> %</b>  | <b><math>95 \pm 5</math> %</b>   | <b>0,0001</b> |
| <b>PCCF positiva c/soro do "pico"</b>       | <b>19 %</b>                      | <b>33 %</b>                      | <b>0,028</b>  |
| <b>Retransplantes</b>                       | <b>13 %</b>                      | <b>69 %</b>                      | <b>0,0001</b> |
| <b>Incompatibilidades DR / Paciente</b>     | <b><math>0,48 \pm 0,6</math></b> | <b><math>0,24 \pm 0,4</math></b> | <b>0,001</b>  |
| <b>Incompatibilidades A+B+DR / Paciente</b> | <b><math>2,5 \pm 1,2</math></b>  | <b><math>1,1 \pm 1,0</math></b>  | <b>0,0001</b> |
| <b>Tempo de Isquemia Fria (horas)</b>       | <b><math>20 \pm 8</math></b>     | <b><math>24 \pm 10</math></b>    | <b>0,027</b>  |
| <b>FRE</b>                                  | <b>32 %</b>                      | <b>64 %</b>                      | <b>0,0001</b> |
| <b>Indução</b>                              | <b>12 %</b>                      | <b>64 %</b>                      | <b>0,0001</b> |
| <b>IMM manutenção "intensa"</b>             | 38 %                             | 48%                              | 0,856         |
| <b>Rejeição Aguda</b>                       | 42 %                             | 33 %                             | 0,333         |
| <b>Rejeições Agudas/Paciente</b>            | $0,5 \pm 0,7$                    | $0,4 \pm 0,5$                    | 0,139         |
| <b>Tempo até a 1ª Rejeição (Dias)</b>       | $15 \pm 15$                      | $22 \pm 15$                      | 0,086         |
| <b>Rejeição Esteróide-Resistente</b>        | 9,5 %                            | 9,5 %                            | 0,995         |
| <b>Sobrevida do enxerto</b>                 |                                  |                                  |               |
| 1 ano                                       | 92 %                             | 85 %                             | 0,131         |
| 2 anos                                      | 90 %                             | 83 %                             | 0,131         |
| 5 anos                                      | 85 %                             | 77 %                             | 0,131         |

RCP = Reatividade contra painel      PCCF = Prova cruzada por citometria de fluxo

RCP mais elevada ("pico") = RCP mais elevada (pré-transplante ou histórica)

FRE = Função retardada do enxerto      IMM = Imunossupressão      Tx = Transplante

A sobrevida do enxerto para os pacientes hipersensibilizados não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à sobrevida dos demais pacientes. A proporção de receptores que tiveram rejeição aguda, o número de episódios de rejeição aguda por paciente, o tempo entre o transplante e o primeiro episódio de rejeição aguda e a proporção de casos apresentando rejeição esteróide-resistente também não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.

Uma Análise Multivariada por meio de Regressão Logística, tendo como variável de desfecho a ocorrência ou não de rejeição esteróide-resistente, incluiu as seguintes variáveis independentes: nível de sensibilização, tanto pré-transplante como de "pico", número de incompatibilidades DR, número de incompatibilidades A+B+DR, número do transplante, resultado da prova cruzada por citometria de fluxo e uso ou não de indução na imunossupressão. Nessa análise, a única variável com influência estatisticamente significativa em relação à ocorrência de rejeição esteróide-resistente foi a presença de incompatibilidades DR (*odds ratio* : OR = 2,41; IC 95%: 1,37 – 4,24;  $p = 0,002$ ). O resultado dessa Regressão Logística é apresentado na Tabela 4. Verificamos que ocorreram 26 casos de rejeição esteróide-resistente entre 370 receptores com incompatibilidades DR = 0 (7%) e 37 casos entre 287 receptores com incompatibilidades DR > 0 (13%) ( $p = 0,01$ ). O número de incompatibilidades DR por paciente foi  $0,63 \pm 0,58$  em receptores com rejeição esteróide-resistente ( $n = 63$ ) e  $0,45 \pm 0,55$  em receptores sem rejeição aguda ou com rejeição aguda responsiva a esteróides ( $n = 594$ ) ( $p = 0,01$ ).

**TABELA 4**  
**Influência de diversas variáveis na ocorrência de**  
**Rejeição Esteróide-Resistente ( Regressão Logística )**

| Variável                      | Razão de Chances | IC 95 %            | p            |
|-------------------------------|------------------|--------------------|--------------|
| RCP atual (pré-transplante)   | 1,0              | 0,98 – 1,03        | 0,649        |
| Mais elevada RCP              | 0,99             | 0,97 – 1,01        | 0,335        |
| <b>Incompatibilidades DR</b>  | <b>2,41</b>      | <b>1,37 – 4,24</b> | <b>0,002</b> |
| Incompatibilidades A + B + DR | 0,78             | 0,60 – 1,03        | 0,075        |
| Tx primário / Retransplante   | 1,35             | 0,57 – 3,19        | 0,493        |
| PCCF com soro do "pico"       | 1,59             | 0,84 – 3,01        | 0,156        |
| Indução                       | 0,54             | 0,21 – 1,37        | 0,191        |

Razão de Chances = *Odds Ratio (OR)*

RCP = Reatividade contra painel

Tx = Transplante PCCF = Prova cruzada por citometria de fluxo IC = intervalo de confiança

Nas provas cruzadas realizadas por citometria de fluxo houve 555 pacientes com teste negativo e 102 com teste positivo, considerando-se PCCF realizadas com soro pré-transplante; por outro lado, considerando-se PCCF realizadas com o soro de maior reatividade contra painel de cada paciente, houve 527 casos com resultado negativo e 130 casos com resultado positivo

Uma Análise Multivariada por meio do Modelo de Azares Proporcionais da Regressão de Cox foi utilizada para estudar a influência na sobrevida do enxerto das seguintes variáveis: resultado da prova cruzada por citometria de fluxo com soro atual e também com o soro de maior reatividade contra painel, sexo do doador, idade do doador, sexo do receptor, idade do receptor, causa da insuficiência renal crônica, ano de realização do transplante ("ano do transplante"), reatividade contra painel, tanto atual quanto mais elevada, número de incompatibilidades A+B+DR, tempo de isquemia fria, FRE, número do transplante e imunossupressão, considerando tanto os medicamentos usados para indução como para manutenção.

O modelo que atingiu o melhor desempenho foi aquele mostrado na Tabela 5, com nove variáveis: idade do doador, sexo do receptor, número do transplante, ano do transplante, número de incompatibilidades A+B+DR, resultado da prova cruzada por citometria de fluxo com o soro mais reativo, tempo de isquemia fria, FRE e intensidade da imunossupressão de manutenção. O desempenho global do modelo mostrou um Qui-Quadrado de 86,425 e um valor  $p < 0,0001$ . Dentre as



variáveis incluídas, as que demonstraram um risco relativo estatisticamente significativo foram: resultado da PCCF, sexo do receptor, tempo de isquemia fria e FRE.

**TABELA 5**  
**Influência de diversas variáveis na Sobrevida do Enxerto**  
**Modelo de Azares Proporcionais da Regressão de Cox**  
*( Cox Regression Proportional Hazard Model )*

| Variável                       | Risco Relativo (RR) | IC 95 %            | p             |
|--------------------------------|---------------------|--------------------|---------------|
| Idade do doador ( anos)        | 1,01                | 0,99 – 1,03        | 0,110         |
| <b>Sexo do Receptor (F/M)</b>  | <b>1,61</b>         | <b>1,08 – 2,42</b> | <b>0,02</b>   |
| Tx primário / Retransplante    | 0,69                | 0,39 – 1,23        | 0,209         |
| Ano do Transplante             | 0,92                | 0,82 – 1,02        | 0,100         |
| Incompatibilidades A + B + DR  | 1,02                | 0,87 – 1,20        | 0,807         |
| <b>PCCF com soro do "pico"</b> | <b>1,89</b>         | <b>1,15 – 3,11</b> | <b>0,012</b>  |
| <b>TIF ( horas )</b>           | <b>1,03</b>         | <b>1,01 – 1,05</b> | <b>0,004</b>  |
| <b>FRE</b>                     | <b>3,54</b>         | <b>2,27 – 5,51</b> | <b>0,0001</b> |
| Intensidade IMM manutenção     | 1,12                | 0,63 – 1,99        | 0,690         |

Pacientes: 657; Eventos: 97; Desempenho global do modelo: Qui-Quadrado = 86,425; p < 0,0001

RR = Risco Relativo ou Razão de Densidades de Incidência (*Hazard Ratio – HR*)

Sexo do Receptor (F/M) = Feminino / Masculino

Tx = Transplante PCCF = Prova cruzada por citometria de fluxo IC = Intervalo de confiança

Soro do "pico" = Soro de maior reatividade contra painel (pré-transplante ou histórico)

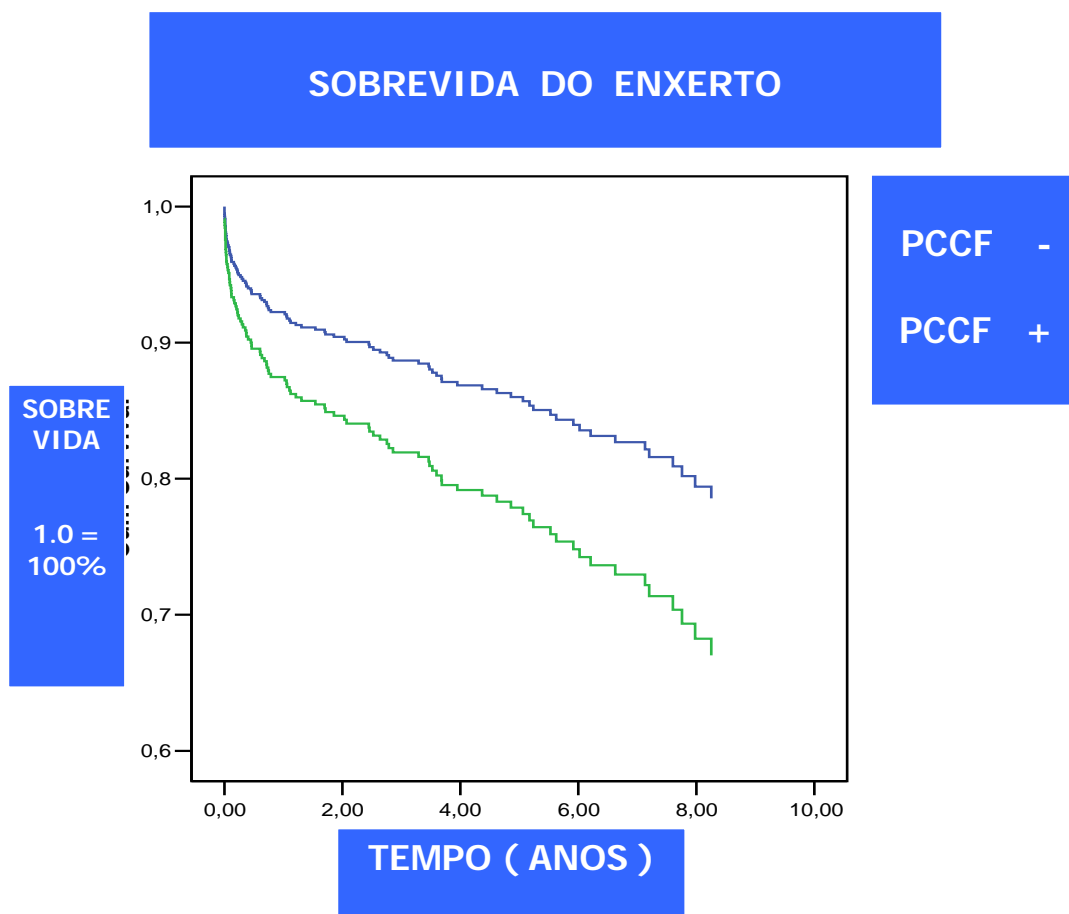
TIF = Tempo de isquemia fria FRE = Função retardada da enxerto IMM = Imunossupressão

Dessa maneira, considerando-se testes realizados com soro de maior reatividade, pacientes com PCCF positiva tiveram um Risco Relativo (RR) de 1,89 (IC 95%: 1,15 – 3,11; p = 0,012) em relação aos com PCCF negativa; receptores femininos tiveram um RR de 1,61 em relação aos masculinos (IC 95%: 1,08 – 2,42; p = 0,02); houve um RR de 1,03 (IC 95%: 1,01 – 1,05; p = 0,004) para cada hora que o tempo de isquemia era mais longo, e a presença de FRE trouxe um RR de 3,54 em relação à sua ausência (IC 95%: 2,27 – 5,51; p = 0,0001).

Utilizando-se no modelo anteriormente descrito o resultado da PCCF com o soro pré-transplante em vez do soro de maior reatividade, esta variável tornou-se não significativa (RR = 1,59; IC 95%: 0,9 – 2,81; p = 0,109) e o Qui-Quadrado global do conjunto de variáveis diminuiu para 82,987. Em virtude disso, todas as

análises subsequentes foram realizadas considerando-se os resultados da PCCF com a amostra de soro de maior reatividade de cada paciente.

Em análise univariada, o RR dos pacientes com PCCF positiva em relação aos com PCCF negativa foi 1,7 (IC 95%: 1,1 – 2,6;  $p = 0,028$ ) (Figura 1).



**Figura 1 . Sobrevida do enxerto para receptores de rim de cadáver com prova cruzada por citometria de fluxo positiva e negativa na coorte total.** Sobrevida do Enxerto para receptores de rim de cadáver com prova cruzada por citometria de fluxo (PCCF) positiva ( $n = 130$ ) (linha inferior) e negativa ( $n = 527$ ) (linha superior). Risco Relativo ou Razão de Densidades de Incidência dos pacientes com PCCF positiva em relação aos com PCCF negativa (*Hazard Ratio – HR*) = 1,7 ( IC 95% : 1,1 – 2,6;  $p = 0,028$  ). ( PCCF realizada com soro de maior reatividade contra painel, seja pré-transplante ou histórico ).

Não houve diferença entre pacientes com PCCF negativa (n = 527) e positiva (n = 130) em relação a sexo do doador (doadores femininos: 49% vs. 47%; p = 0,707), idade do doador ( $43 \pm 14$  vs.  $42 \pm 16$  anos; p = 0,523), sexo do receptor (receptores femininos: 40% vs. 49%; p = 0,069) e idade do receptor ( $47 \pm 13$  vs.  $46 \pm 13$  anos; p = 0,414).

O deslocamento da média de intensidade de canais fluorescentes foi significativamente maior para pacientes com PCCF positiva do que para aqueles com PCCF negativa, tanto considerando prova cruzada realizada com soro atual ( $14 \pm 12$  vs.  $2 \pm 3$ ; p = 0,0001) como com soro de maior reatividade ( $17 \pm 12$  vs.  $3 \pm 3$ ; p = 0,0001).

Conforme detalhado na Tabela 6, receptores com PCCF positiva apresentavam uma proporção maior de retransplantes e um grau maior de sensibilização prévia, tanto considerando soro pré-transplante como soro mais reativo, em relação aos pacientes com PCCF negativa. O número de incompatibilidades A+B+DR por paciente foi menor entre os receptores com PCCF positiva do que entre os com PCCF negativa, mas isso não foi estatisticamente significativo; por outro lado, o número de incompatibilidades DR por paciente foi significativamente menor entre os receptores com PCCF positiva, e eles receberam significativamente mais terapia de indução, além de mais intensa imunossupressão de manutenção, em relação aos receptores com PCCF negativa.

O tempo de isquemia fria foi significativamente menor entre os pacientes com PCCF positiva; a proporção de receptores com FRE foi a mesma para pacientes com PCCF positiva ou negativa.

A proporção de receptores com rejeição aguda, o número de episódios de rejeição aguda por paciente, o tempo entre o transplante e a primeira rejeição aguda, e a proporção de pacientes apresentando rejeição esteróide-resistente não foram estatisticamente diferentes para pacientes com PCCF positiva ou negativa.

A sobrevida do enxerto em 1 ano, 2 anos e 5 anos foi significativamente menor para pacientes com PCCF positiva do que para aqueles com PCCF

negativa (respectivamente 87% vs. 92%, 83% vs. 91% e 75% vs. 87%;  $p = 0,028$ ). A sobrevida do paciente não foi diferente entre esses dois grupos.

**TABELA 6**

**Prova Cruzada por Citometria de Fluxo com o soro mais reativo**

**Pacientes com prova negativa x Pacientes com prova positiva**

|   | PCCF negativa      | PCCF positiva      | P             |
|---|--------------------|--------------------|---------------|
| <b>N</b>                                | <b>527</b>         | <b>130</b>         |               |
| <b>DMCIF (soro atual)</b>               | <b>2 ± 3</b>       | <b>14 ± 12</b>     | <b>0,0001</b> |
| <b>DMCIF (soro do "pico")</b>           | <b>3 ± 3</b>       | <b>17 ± 12</b>     | <b>0,0001</b> |
| <b>Receptores de Retransplante</b>      | <b>14 %</b>        | <b>24 %</b>        | <b>0,01</b>   |
| <b>Reatividade pré-Tx Contra Painel</b> | <b>11 ± 18 %</b>   | <b>17 ± 26 %</b>   | <b>0,009</b>  |
| <b>Maior Reatividade Contra Painel</b>  | <b>19 ± 25 %</b>   | <b>27 ± 31 %</b>   | <b>0,01</b>   |
| Incompatibilidades A+B+DR               | 2,47 ± 1,26        | 2,25 ± 1,25        | 0,069         |
| <b>Incompatibilidades DR</b>            | <b>0,50 ± 0,57</b> | <b>0,35 ± 0,51</b> | <b>0,006</b>  |
| <b>Pacientes com Indução</b>            | <b>12 %</b>        | <b>27 %</b>        | <b>0,0001</b> |
| <b>IMM de manutenção "intensa"</b>      | <b>36 %</b>        | <b>49 %</b>        | <b>0,01</b>   |
| <b>Tempo de Isquemia Fria (horas)</b>   | <b>21 ± 8</b>      | <b>19 ± 7</b>      | <b>0,01</b>   |
| Função Retardada do Enxerto             | 33 %               | 36 %               | 0,496         |
| Rejeição Aguda                          | 42 %               | 38 %               | 0,418         |
| Rejeições Agudas / Paciente             | 0,52 ± 0,68        | 0,44 ± 0,61        | 0,225         |
| Tempo até a 1ª Rejeição (dias)          | 15 ± 15            | 17 ± 16            | 0,354         |
| Rejeição Esteróide-Resistente           | 9 %                | 12 %               | 0,391         |
| <b>Sobrevida do Enxerto – 1 ano</b>     | <b>92 %</b>        | <b>87 %</b>        | <b>0,028</b>  |
| <b>Sobrevida do Enxerto – 2 anos</b>    | <b>91 %</b>        | <b>83 %</b>        | <b>0,028</b>  |
| <b>Sobrevida do Enxerto – 5 anos</b>    | <b>87 %</b>        | <b>75 %</b>        | <b>0,028</b>  |
| Sobrevida do Paciente – 1 ano           | 94 %               | 93 %               | 0,882         |
| Sobrevida do Paciente – 2 anos          | 92 %               | 93 %               | 0,882         |
| Sobrevida do Paciente – 5 anos          | 87 %               | 86 %               | 0,882         |

PCCF = Prova cruzada por citometria de fluxo

Tx = Transplante

DMCIF = Deslocamento da média de canais de intensidade de fluorescência

Soro atual = Soro pré-transplante

IMM = Imunossupressão

Soro do "pico" = Soro de maior reatividade contra painel (atual ou histórico)

O achado de que a sensibilização pré-transplante foi significativamente maior entre pacientes com PCCF positiva do que entre aqueles com PCCF negativa levou-nos a procurar analisar o impacto de uma PCCF positiva em diferentes níveis de sensibilização pré-transplante.

Com esse objetivo, os pacientes foram agrupados de acordo com sua mais elevada sensibilização pré-transplante em: Grupo 1 (maior sensibilização pré-transplante 0 – 14 % ; n = 393), Grupo 2 (maior sensibilização pré-transplante 15 – 50 % ; n = 178) e Grupo 3 (maior sensibilização pré-transplante 51 – 100%; n = 86). A Tabela 7 mostra as características desses três grupos.

Os três grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação a sexo do doador (doadores femininos: 49% ; 46% e 49%; p = 0,797) e idade do doador ( $43 \pm 15$ ;  $42 \pm 14$  e  $42 \pm 16$  anos; p = 0,760). A idade do receptor foi significativamente menor (p = 0,02) no Grupo 3 ( $44 \pm 13$  anos) do que no Grupo 1 ou no Grupo 2 ( $46 \pm 19$  e  $48 \pm 13$  anos). No Grupo 3, houve uma proporção significativamente maior de receptores do sexo feminino, um número maior de transfusões sanguíneas prévias por paciente e uma proporção maior de mulheres com gestações prévias do que nos grupos 1 ou 2; a proporção de retransplantes e de pacientes previamente transfundidos aumentou significativamente do Grupo 1 para o Grupo 2 e deste para o Grupo 3. A proporção de receptores com PCCF positiva foi significativamente maior no Grupo 3 do que nos outros dois grupos.

Os pacientes do Grupo 3 receberam órgãos com um número significativamente menor de incompatibilidades DR e A+B+DR por paciente do que os dos grupos 1 ou 2, e a proporção de receptores que receberam indução aumentou significativamente do Grupo 1 para o Grupo 2 e deste para o Grupo 3.

O número de episódios de rejeição aguda por paciente foi significativamente menor no Grupo 3 do que no Grupo 1, mas o Grupo 2 não apresentou diferença estatisticamente significativa nesse parâmetro em relação a qualquer um dos outros dois grupos. O tempo entre o transplante e o primeiro episódio de rejeição aguda foi significativamente mais longo no Grupo 3 do que nos grupos 1 ou 2. A proporção de casos com rejeição esteróide-resistente não foi estatisticamente diferente entre os três grupos. O tempo de isquemia fria apresentou tendência a ser maior no Grupo 3 do que nos outros dois grupos, mas não houve significância estatística para essa diferença. O Grupo 3 mostrou uma

proporção significativamente maior de pacientes com função retardada do enxerto. A sobrevida do enxerto não foi estatisticamente diferente para os três grupos.

**TABELA 7**  
**Distribuição dos pacientes de acordo com sua mais elevada sensibilização (anticorpos IgG) pré-transplante (reatividade contra painel – RCP – IgG)**  
**(0 – 14 %) – (15 – 50 %) – (51 – 100 %)**

|                                  | <b>Grupo 1</b>                  | <b>Grupo 2</b>                  | <b>Grupo 3</b>                         |
|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|
| Mais elevada RCP pré-Tx          | <b>0 – 14 %</b>                 | <b>15 – 50 %</b>                | <b>51 – 100 %</b>                      |
| <b>N</b>                         | <b>393</b>                      | <b>178</b>                      | <b>86</b>                              |
| Sensibilização (RCP)             | 5 ± 4 % ***                     | 26 ± 10 % ***                   | 80 ± 17 % ***                          |
| Sexo do receptor( Feminino )     | 37 %                            | 43 %                            | 57 % **                                |
| Mulheres c/ gestações prévias    | 73 %                            | 70 %                            | 84 % ***                               |
| Retransplantes                   | 5 % ***                         | 16 % ***                        | 66 % ***                               |
| Pacientes c/ transfusões prévias | 41 % ***                        | 50 % ***                        | 76 % ***                               |
| Transfusões / paciente           | 3 ± 5 %                         | 4 ± 6 %                         | 14 ± 21 % ***                          |
| Pacientes c/ PCCF positiva       | 18 %                            | 18 %                            | 30 % *                                 |
| Incompat. DR/paciente            | 0,5 ± 0,6                       | 0,5 ± 0,6                       | 0,27 ± 0,45 **                         |
| Incompat. A+B+DR / Paciente      | 2,6 ± 1,2                       | 2,5 ± 1,2                       | 1,6 ± 1,3 ***                          |
| Tempo de isquemia fria (horas)   | 20 ± 7                          | 20 ± 9                          | 22 ± 9 ( NS )                          |
| Função retardada do enxerto      | 31 %                            | 32 %                            | 50 % *                                 |
| Indução                          | 8 % ***                         | 15 % ***                        | 48 % ***                               |
| Rejeição aguda                   | 43 %                            | 41 %                            | 31 % ( NS )                            |
| Rejeições agudas / Paciente      | 0,6 ± 0,7 *                     | 0,5 ± 0,6                       | 0,3 ± 0,5 *                            |
| Tempo Tx - 1ª rejeição (dias)    | 14 ± 14                         | 16 ± 16                         | 22 ± 18 *                              |
| Rejeição esteróide-resistente    | 10 %                            | 11 %                            | 6 % ( NS )                             |
| <b>Sobrevida do enxerto</b>      |                                 |                                 |  |
| 1 ano                            | 92 %                            | 92 %                            | 88 % ( NS )                            |
| 2 anos                           | 90 %                            | 91 %                            | 85 % ( NS )                            |
| 5 anos                           | 84 %                            | 88 %                            | 80 % ( NS )                            |
|                                  | <b>PCCF – / PCCF +</b>          | <b>PCCF – / PCCF +</b>          | <b>PCCF – / PCCF +</b>                 |
| <b>N</b>                         | <b>321 / 72</b>                 | <b>146 / 32</b>                 | <b>60 / 26</b>                         |
| Incompat. DR/paciente            | 0,5 ± 0,6 / 0,4 ± 0,5<br>( NS ) | 0,5 ± 0,6 / 0,3 ± 0,5<br>( NS ) | 0,3 ± 0,5 / 0,1 ± 0,3<br>( p = 0,01 )  |
| Incompat. A+B+DR/paciente        | 2,6 ± 1,2 / 2,6 ± 1,1<br>( NS ) | 2,5 ± 1,3 / 2,5 ± 1,1<br>( NS ) | 1,9 ± 1,3 / 0,9 ± 1,0<br>( p = 0,001 ) |
| Indução                          | 6 % / 20 %<br>( p=0,0001 )      | 15 % / 16 %<br>( NS )           | 42 % / 62 %<br>( NS )                  |
| IMM de manutenção “Intensa”      | 34 % / 44 %<br>( NS )           | 42 % / 50 %<br>( NS )           | 33% / 58%<br>( p=0,036 )               |
| <b>Sobrevida do enxerto</b>      |                                 |                                 |  |
| 1 ano                            | 91% vs. 94 %                    | 96 % vs. 75 %                   | 90 % vs. 84 %                          |
| 2 anos                           | 89% vs. 89 %                    | 95 % vs. 75 %                   | 88 % vs. 79 %                          |
| 5 anos                           | 85% vs. 81 %                    | 93 % vs. 67 %                   | 84 % vs. 71 %                          |
| Risco Relativo ( IC 95% )        | 1,1 (0,5 – 2,1)                 | 4,3 (1,8 – 10,1)                | 1,7 ( 0,6 – 4,7 )                      |
| Significância ( p )              | ( p = 0,882 )                   | ( p = 0,003 )                   | ( p = 0,274 )                          |

(\*\*\*) p = 0,0001 (\*\*\*) p = 0,001 (\*) p = 0,02 (\*) p = 0,04 ( NS ) = Não significativo

Tx = Transplante RCP = Reatividade contra painel Incompat. = Incompatibilidades

PCCF = Prova cruzada por citometria de fluxo

IMM = Imunossupressão

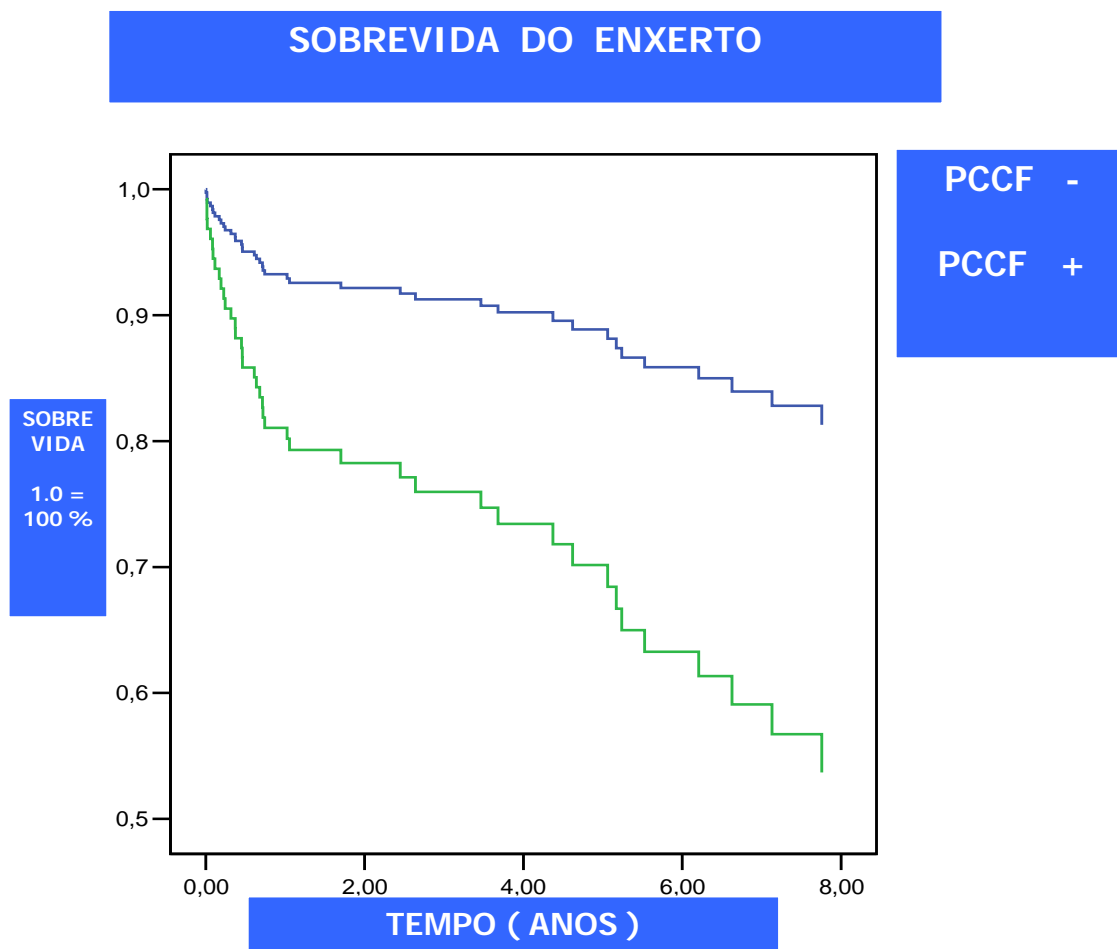
Risco Relativo (RR) = Razão de Densidades de Incidências (Hazard Ratio – HR)

No Grupo 1, receptores com PCCF negativa e positiva tiveram número equivalente de incompatibilidades DR e A+B+DR por paciente; eles também tiveram proporções similares de pacientes que receberam imunossupressão de manutenção "intensa"; entretanto, os pacientes com PCCF positiva nesse grupo receberam significativamente mais indução em sua imunossupressão. A sobrevida do enxerto não foi diferente entre pacientes com PCCF negativa e positiva no Grupo 1. Analisando-se somente os pacientes do Grupo 1 que não receberam indução (n = 369), não houve diferença estatisticamente significativa quanto à sobrevida do enxerto para receptores com PCCF negativa ou positiva, em 1 ano, 2 anos e 5 anos (91% vs. 95%; 89% vs. 88%; 84% vs. 82% ; p = 0.952).

No Grupo 2, o número de incompatibilidades DR ou A+B+DR por paciente, a proporção de receptores que receberam imunossupressão de manutenção "intensa" e a proporção de pacientes que receberam indução não foram diferentes para receptores com PCCF negativa e positiva. Nesse grupo, a sobrevida do enxerto foi significativamente mais baixa para pacientes com PCCF positiva do que para aqueles com PCCF negativa.

No Grupo 3, o número de incompatibilidades DR e A+B+DR por paciente foi significativamente menor nos receptores com PCCF positiva do que naqueles com PCCF negativa. Nesse grupo, os pacientes com PCCF positiva apresentaram uma proporção maior de casos recebendo indução, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa; entretanto, pacientes com PCCF positiva receberam significativamente mais imunossupressão de manutenção "intensa" do que os receptores com PCCF negativa. A sobrevida do enxerto mostrou tendência a ser mais baixa nos pacientes com PCCF positiva do que naqueles com PCCF negativa no Grupo 3, mas tal diferença não foi estatisticamente significativa.

Considerando os receptores do Grupo 2 e do Grupo 3 em conjunto, a sobrevida do enxerto foi significativamente mais baixa para pacientes com PCCF positiva do que para aqueles com PCCF negativa (RR = 3,0 ; IC 95%: 1,6 – 5,7; p = 0,001). Mostra-se isso na Figura 2.



**Figura 2.** Sobrevida do enxerto para recetores de rim de cadáver com mais elevada sensibilização de 15 a 100 %. Comparação entre pacientes com prova cruzada por citometria de fluxo positiva e negativa. Sobrevida do Enxerto para receptores de transplante de rim de cadáver com prova cruzada por citometria de fluxo positiva (n = 58) (linha inferior) e negativa (n = 206) (linha superior) incluindo o conjunto de todos pacientes do Grupo 2 e do Grupo 3 (mais elevada reatividade contra painel de 15 a 100 %) Risco Relativo ou Razão de Densidades de Incidência dos pacientes com PCCF Positiva em relação aos com PCCF negativa (*Hazard Ratio – HR*) = 3,0 (IC 95 %: 1,6 – 5,7; p = 0,001).



As mesmas variáveis que foram avaliadas por Regressão de Cox quanto à influência na sobrevida do enxerto foram também estudadas pelo mesmo tipo de regressão quanto à influência na sobrevida do paciente. Nessa análise, o modelo que apresentou melhor desempenho foi aquele mostrado na Tabela 8, o qual incluiu as seguintes variáveis: idade do receptor, sexo do receptor, ano do transplante, número de incompatibilidades A+B+DR, resultado da PCCF com o soro mais reativo, tempo de isquemia fria, função retardada do enxerto e intensidade da imunossupressão de manutenção. Dentro desse conjunto, mostraram um risco relativo estatisticamente significativo as seguintes variáveis: idade do receptor, ano do transplante, tempo de isquemia fria, função retardada do enxerto e intensidade da imunossupressão de manutenção.

**TABELA 8**  
**Influência de diversas variáveis na Sobrevida do Paciente**  
**Modelos de Azares Proporcionais da Regressão de Cox**  
*( Cox Regression Proportional Hazard Model )*

| Variável                          | Risco Relativo (RR) | IC 95 %              | p             |
|-----------------------------------|---------------------|----------------------|---------------|
| <b>Idade do Receptor</b>          | <b>1,05</b>         | <b>1,03 – 1,07</b>   | <b>0,0001</b> |
| Sexo do Receptor                  | 1,36                | 0,86 – 2,14          | 0,191         |
| <b>Ano do Transplante</b>         | <b>0,86</b>         | <b>0,77 – 0,96</b>   | <b>0,007</b>  |
| Incompatibilidades A+B+DR         | 1,15                | 0,96 – 1,38          | 0,137         |
| PCCF com soro do "pico"           | 1,16                | 0,59 – 2,25          | 0,660         |
| <b>TIF ( horas )</b>              | <b>1,03</b>         | <b>1,003 – 1,056</b> | <b>0,031</b>  |
| <b>FRE</b>                        | <b>1,62</b>         | <b>1,006 – 2,614</b> | <b>0,047</b>  |
| <b>Intensidade IMM manutenção</b> | <b>1,95</b>         | <b>1,13 – 3,35</b>   | <b>0,016</b>  |

Pacientes: 657; Eventos: 79; Desempenho global do modelo: Qui-Quadrado = 54,571;  $p < 0,0001$

RR = Risco Relativo ou Razão de Densidades de Incidência (*Hazard Ratio – HR*)

PCCF = Prova cruzada por citometria de fluxo TIF = Tempo de isquemia fria

Soro do "pico" = Soro de maior reatividade contra painel (pré-transplante ou histórico)

FRE = Função retardada do enxerto IMM = Imunossupressão

Desse modo, houve um RR em relação à sobrevida do paciente de 1,05 para cada ano a mais na idade do receptor (IC 95% : 1,03 – 1,07;  $p = 0,0001$ ), de 0,86 para cada ano subsequente do calendário (IC 95% : 0,77 – 0,96;  $p = 0,007$ ), de 1,03 para cada hora a mais no tempo de isquemia fria (IC 95% : 1,003 – 1,056;  $p = 0,031$ ), de 1,62 para a presença de função retardada do enxerto em relação a sua ausência (IC 95% : 1,006 – 2,614;  $p = 0,047$ ) e de 1,95 para pacientes que receberam imunossupressão de manutenção “intensa” em relação aos que receberam imunossupressão de manutenção “moderada” (IC 95% : 1,13 – 3,35;  $p = 0,016$ ).

## DISCUSSÃO

O fato de que nos pacientes deste trabalho um tempo de isquemia fria mais prolongado e a presença de função retardada do enxerto tiveram uma influência negativa estatisticamente significativa na sobrevida do enxerto está em concordância com outros estudos (70, 71) e enfatiza a importância clínica de maximizar esforços para reduzir o tempo de isquemia e a ocorrência de FRE, com o objetivo de diminuir o impacto desfavorável que estas variáveis exercem sobre a evolução do transplante.

Períodos mais prolongados de isquemia fria e função retardada do enxerto também exerceram influência negativa estatisticamente significativa na sobrevida do paciente, bem como idade mais avançada do receptor e uso de medicação imunossupressora mais intensa; por outro lado, cada ano subsequente dentro do período do estudo trouxe um risco progressivamente menor para óbito.

O fato de que imunossupressão de manutenção mais vigorosa teve influência negativa na sobrevida do paciente reforça a importância de se adequar a medicação imunossupressora a cada paciente, ajustando tipo e dose de

imunossupresores de acordo com fatores imunológicos e clínicos, com o objetivo de alcançar a melhor relação risco-benefício possível para sobrevida do enxerto e do paciente, expondo os receptores somente aos níveis adequados e necessários de imunossupressão.

O efeito positivo que cada ano subsequente do calendário teve na sobrevida do paciente, provavelmente, reflete o resultado global da melhora contínua dos recursos diagnósticos e terapêuticos e de muitos fatores envolvidos no cuidado aos doentes.

Os casos incluídos neste estudo constituem uma coorte com compatibilidade doador-receptor bastante adequada, com número de incompatibilidades por paciente de  $0,47 \pm 0,56$  em DR e  $2,43 \pm 1,3$  em A+B+DR.

O valor médio de deslocamento da média de canais de intensidade fluorescente dos pacientes com PCCF positiva foi significativamente maior do que o dos pacientes com PCCF negativa ( $p = 0,0001$ ). Entretanto, o valor numérico desse deslocamento nos pacientes com PCCF positiva, que correspondeu a  $14 \pm 12$  e  $17 \pm 12$ , respectivamente para soro pré-transplante e soro de maior reatividade contra painel, representou um valor não muito mais elevado do que 10 na escala de 256 canais, valor adotado como ponto de corte, equivalente ao menor valor adotado por outros autores (50, 54, 57, 59, 63, 64). Isso sugere a existência de um nível bastante modesto de anticorpos antidoador nos pacientes considerados portadores de uma PCCF positiva pré-transplante neste estudo.

Uma prova cruzada positiva por citometria de fluxo com o soro de maior reatividade contra painel teve um impacto negativo estatisticamente significativo na sobrevida do enxerto; entretanto, quando apenas resultados de provas cruzadas com soro pré-transplante foram analisadas, o impacto dessa variável tornou-se estatisticamente não significativo. Isso pode ser devido ao fato de que o número de pacientes com PCCF positiva foi menor considerando soro atual do que soro mais reativo; entretanto, isso também sugere que, provavelmente, a presença desses anticorpos pode não ser o fator de agressão direta ao enxerto, mas sua existência atual ou histórica poderia, na verdade, desempenhar o papel

de indicador de um estado de memória imunológica, como sugerido por outros pesquisadores (58). Por outro lado, isso reforça a importância de que se analisem resultados de provas cruzadas com soro de maior reatividade contra painel, em adição aos resultados obtidos com soro pré-transplante, com o objetivo de que não sejam excluídos pacientes para os quais o conhecimento de um resultado positivo seria estatisticamente significativo e clinicamente importante.

Pacientes de retransplante, embora tendo maior sensibilização e maior proporção de casos com FRE, mostraram um número menor de rejeições agudas por paciente, um tempo mais longo até a primeira rejeição aguda e uma sobrevivência do enxerto equivalente aos receptores de transplantes primários. Isso sugere que, provavelmente, sua melhor compatibilidade DR e A+B+DR e sua maior proporção de pacientes recebendo indução influenciou positivamente sua evolução em relação aos receptores de primeiros transplantes.

Os receptores com PCCF positiva mostraram níveis mais elevados de sensibilização (pré-transplante e de "pico"), e uma maior proporção de retransplantes; por outro lado, tais pacientes receberam transplantes com um número significativamente menor de incompatibilidades DR e tiveram uma proporção significativamente maior de receptores com indução e com imunossupressão de manutenção de maior intensidade.

Outros pesquisadores (55-59) relataram uma maior frequência de episódios de rejeição aguda para pacientes com PCCF pré-transplante positiva.

Em nosso estudo, a proporção de pacientes que apresentaram rejeição aguda, o número de episódios de rejeição aguda por paciente, o tempo entre o transplante e o primeiro episódio de rejeição aguda, e a proporção de rejeições esteróide-resistentes não foram diferentes para pacientes com PCCF positiva ou negativa. Como os receptores com prova cruzada por citometria de fluxo positiva tinham, entretanto, uma melhor compatibilidade DR e uma imunossupressão mais intensa, pode-se inferir que esses fatores, provavelmente, influenciaram positivamente os parâmetros acima descritos nesse grupo, explicando o porquê de tais pacientes não apresentarem mais episódios de rejeição aguda e mais rejeições esteróide-resistentes. Por outro lado, apesar de melhor compatibilidade

DR, mais intensa imunossupressão e de não terem apresentado mais rejeições agudas, os pacientes com PCCF positiva apresentaram sobrevida do enxerto significativamente inferior à dos pacientes com PCCF negativa, em nossa coorte.

Esse fato sugere que, mesmo não manifestando fenômenos imunológicos agudos, clinicamente evidentes, esse estado reativo antidoador pode estar associado a efeitos mais sutis a médio e longo-prazo sobre o rim transplantado, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto (mais especificamente, rejeição crônica) e, conseqüentemente, para diminuir sua sobrevida.

Um outro ponto a ser destacado é que nossos dados mostraram para a coorte global uma forte associação entre a ocorrência de rejeição esteróide-resistente e a existência de incompatibilidades DR. Considerando esse fato, poderíamos esperar que pacientes com PCCF positiva, que receberam transplantes com um número menor de incompatibilidades DR, apresentassem menos rejeições esteróide-resistentes; mas pelo contrário, a despeito disto, e apesar do fato de que receberam mais indução e mais intensa imunossupressão de manutenção, tais pacientes mostraram tendência a ter uma proporção maior de casos (embora sem diferença estatisticamente significativa) com rejeição esteróide-resistente (12% vs. 9%) do que receptores com PCCF negativa. Isso sugere que pacientes com resultado positivo em prova cruzada por citometria de fluxo realizada com uma amostra de seu soro de maior reatividade possam ser mais propensos a rejeições mais severas, esteróide-resistentes, e pode-se inferir que esta tendência tenha sido, pelo menos parcialmente, compensada por uma melhor compatibilidade e uma imunossupressão mais intensa nos pacientes com PCCF positiva incluídos em nosso estudo.

Com o objetivo de analisar o possível impacto de uma prova cruzada positiva por citometria de fluxo em diferentes níveis de sensibilização pré-transplante, nossa coorte foi subdividida em três grupos: Grupo 1 (maior sensibilização pré-transplante de 0 até 14 %), Grupo 2 (maior sensibilização pré-transplante de 15 a 50 %) e Grupo 3 (maior sensibilização pré-transplante de 51 a 100 %).

A sobrevida do enxerto não foi diferente para os três grupos. O Grupo 3 apresentou um número menor de episódios de rejeição aguda por paciente e um período mais longo entre o transplante e o primeiro episódio de rejeição aguda; entretanto, os receptores do Grupo 3, tiveram o benefício de um número significativamente menor de incompatibilidades DR e A+B+DR por paciente, e de um protocolo de imunossupressão mais intenso por meio de maior uso de indução, em relação aos outros dois grupos. Isso sugere que a alocação de órgãos com melhor compatibilidade, combinada com imunossupressão mais intensa, possa ser uma abordagem eficaz para possibilitar que pacientes altamente sensibilizados obtenham sobrevida do enxerto equivalente à obtida por pacientes com menores graus de sensibilização. Essa hipótese é corroborada pela análise do subgrupo de pacientes hipersensibilizados (maior sensibilização pré-transplante entre 85 e 100%), que receberam transplantes com número significativamente menor de incompatibilidades DR e A+B+DR, mais indução na imunossupressão e apresentaram sobrevida do enxerto sem diferença estatisticamente significativa em relação aos demais pacientes.

No Grupo 1, não houve diferença quanto à sobrevida do enxerto entre pacientes com PCCF positiva e negativa, mas os pacientes com PCCF positiva receberam significativamente mais indução do que aqueles com PCCF negativa. Entretanto, mesmo analisando-se somente os receptores que não receberam indução no Grupo 1, não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida do enxerto para pacientes com PCCF positiva ou negativa. Desse modo, isso sugere que os baixos níveis de anticorpos antidoador detectados por citometria de fluxo não exerceram efeito prejudicial nesses receptores não sensibilizados ou pouco sensibilizados. Já que o número de incompatibilidades DR e A+B+DR por paciente foi o mesmo para receptores com PCCF negativa ou positiva neste grupo, parece razoável considerar que esta variável não influenciou favoravelmente nenhum dos subgrupos em detrimento do outro.

No Grupo 2, houve uma sobrevida do enxerto significativamente menor para pacientes com PCCF positiva do que para aqueles com PCCF negativa. Nesse grupo, o número de incompatibilidades DR ou A+B+DR por paciente e a

proporção de pacientes recebendo indução não foram diferentes para receptores com PCCF negativa ou positiva. Esses fatos sugerem que, para pacientes com sensibilização de 15 a 50%, considerando-se compatibilidades HLA similares e protocolos de imunossupressão equivalentes, a presença de baixos níveis de anticorpos antidoador detectados por citometria de fluxo associou-se com menor sobrevida do enxerto. Desconhece-se se uma melhor compatibilidade DR ou A+B+DR e/ou um protocolo mais intenso de imunossupressão poderiam possibilitar que os pacientes com PCCF positiva deste grupo atingissem melhor sobrevida do enxerto, assemelhando-se àqueles com PCCF negativa.

No Grupo 3, os receptores com PCCF positiva receberam órgãos com um número significativamente menor de incompatibilidades DR e A+B+DR por paciente e tiveram uma proporção significativamente maior de casos recebendo imunossupressão de manutenção "intensa" em relação aos receptores com PCCF negativa. A sobrevida do enxerto, embora não significativamente diferente, mostrou tendência a ser mais baixa nos pacientes com PCCF positiva do que naqueles com PCCF negativa. Isso sugere que, em receptores com mais elevada sensibilização pré-transplante entre 51 e 100 %, o efeito combinado de uma melhor compatibilidade HLA e uma imunossupressão mais intensa pode ter possibilitado, pelo menos parcialmente, compensar o possível impacto negativo da presença de baixos níveis de anticorpos antidoador detectados por citometria de fluxo.

Neste estudo, como a PCCF foi realizada utilizando conjuntamente linfócitos T e B do doador, não houve definição de quais pacientes especificamente demonstraram reação contra células T ou B. Entretanto, como a presença de uma PCCF positiva teve um impacto negativo estatisticamente significativo na sobrevida do enxerto, isso sugere que o conhecimento da existência desses anticorpos é clinicamente mais importante do que a definição das células alvo contra as quais eles são dirigidos. Este aspecto está de acordo com outros pesquisadores, que, independentemente do fato de os anticorpos serem contra células T ou B, encontraram maior número de episódios de rejeição

aguda (58) ou sobrevida inferior do enxerto (60) para pacientes com prova cruzada por citometria de fluxo positiva, em relação àqueles com PCCF negativa.

Concluimos que a existência de baixos níveis de anticorpos antidoador detectados por uma prova cruzada pré-transplante positiva por citometria de fluxo, realizada com o soro de maior reatividade contra painel, desempenhou papel de marcador de um estado de reatividade específica contra o doador, com um impacto negativo estatisticamente significativo na sobrevida do enxerto, nos receptores de transplante de rim de cadáver da coorte estudada.

Para pacientes não sensibilizados ou pouco sensibilizados, com mais elevada reatividade contra painel entre 0 e 14%, a presença desses anticorpos em baixos níveis mostrou não ser prejudicial, em relação à sobrevida do enxerto.

Para pacientes com mais elevada sensibilização pré-transplante entre 15 e 50%, a sobrevida do enxerto foi menor para pacientes com PCCF positiva do que para aqueles com PCCF negativa, com incompatibilidades DR e A+B+DR por paciente e protocolos de imunossupressão similares para receptores com PCCF positiva ou negativa.

Para receptores com mais elevada sensibilização pré-transplante entre 51 e 100%, os pacientes portadores de PCCF positiva, que receberam órgãos com melhor compatibilidade DR e A+B+DR e imunossupressão mais intensa, obtiveram sobrevida de enxerto que não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à obtida pelos receptores com PCCF negativa.

Os resultados descritos sugerem que uma PCCF positiva pode exercer um impacto negativo estatisticamente significativo na sobrevida do enxerto em pacientes transplantados de rim de cadáver mesmo a partir de níveis razoavelmente baixos de sensibilização (>14%), e que esse efeito se evidencia quando não há diferença quanto ao número de incompatibilidades DR e A+B+DR e quanto à intensidade da imunossupressão para pacientes com PCCF positiva ou negativa. Entretanto, os resultados obtidos nos receptores com sensibilização de 51 a 100%, nos quais os pacientes com PCCF positiva receberam órgãos com melhor compatibilidade DR e A+B+DR e mais intensa imunossupressão, e tiveram sobrevida de enxerto sem diferença estatisticamente significativa em relação à



obtida pelos receptores com PCCF negativa, sugerem que o impacto negativo da presença desses baixos níveis de anticorpos antidoador poderia, pelo menos parcialmente, ser compensado por melhor compatibilidade HLA e imunossupressão mais efetiva.

Assim, pode-se inferir que, provavelmente, a abordagem mais adequada é considerar o resultado da prova cruzada por citometria de fluxo, não como elemento isolado, mas sim analisado em conjunto com outros fatores, como grau de sensibilização prévia, número de incompatibilidades DR e A+B+DR e protocolo de imunossupressão.

Desse modo, nossos resultados sugerem que a prova cruzada por citometria de fluxo pode ser um elemento valioso no processo de alocação de órgãos, na avaliação de cada par doador-receptor, e na tomada de decisão a respeito da melhor combinação de medicamentos imunossupressores para cada paciente.

Este estudo também nos permitiu concluir que, mesmo nos dias de hoje, com drogas muito efetivas disponíveis para imunossupressão, a compatibilidade HLA continua desempenhando um papel de grande importância para que se atinjam melhores resultados nos transplantes com rim de cadáver. Isso foi indicado pela forte associação entre rejeições esteróide-resistentes e incompatibilidades DR, e pela sobrevida do enxerto obtida nos casos de retransplante e em pacientes altamente sensibilizados, que não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à obtida em primeiros transplantes e em transplantes em pacientes menos sensibilizados, presumivelmente em decorrência de uma melhor compatibilidade DR e A+B+DR, bem como de um protocolo de imunossupressão mais intensa.

## REFERÊNCIAS

1. Morris PJ, Johnson RJ, Fuggle SV, Belger MA, Briggs JD. Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force of the Kidney Advisory Group of the United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA). *Lancet* 1999 ; 354: 1147-1152
2. Cecka JM. The UNOS Renal Transplant Registry. In: Cecka and Terasaki, ed. *Clinical Transplants*. UCLA Immunogenetics Center, Los Angeles, CA 2001: 1-18.
3. Claas FH, van Leeuwen A, van Rood JJ. Hyperimmunized patients do not need to wait for an HLA identical donor. *Tissue Antigens* 1989; 34: 23-29.
4. Claas FH, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis II. The acceptable mismatch program as a fast tool for highly sensitized patients awaiting a cadaveric kidney transplantation: short waiting time and excellent graft outcome. *Transplantation* 2004 ; 78: 190-193.
5. Fuggle SV, Belger MA, Johnson RJ, Ray TC, Morris PJ. A new national allocation scheme for adult kidneys in the United Kingdom. United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA) Users' Kidney Advisory Group and its Task Forces. *Clin Transpl* 1998; 12: 107-113.
6. Johnson RJ, Belger MA, Briggs JD, Fuggle SV, Morris PJ; UK Transplant Kidney and Pancreas Advisory Group. Renal transplantation in the UK and Republic of Ireland. *Clin Transpl* 2000; 14: 105-113.

7. Fuggle SV, Johnson RJ, Rudge CJ, Forsythe JL. Human leukocyte antigen and the allocation of kidneys from cadaver donors in the United Kingdom. *Transplantation* 2004;77: 618-620.

8. Fuggle SV, Martin S. Toward performing transplantation in highly sensitized patients. *Transplantation*. 2004; 78: 186-189.

9. Duquesnoy RJ. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. *Hum Immunol* 2002 ; 63: 339-352.

10. Duquesnoy RJ, Takemoto S, de Lange P, Doxiadis II, Schreuder GM, Persijn GG, Claas FH. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. III. Effect of matching at the HLA-A,B amino acid triplet level on kidney transplant survival. *Transplantation* 2003; 75: 884-889.

11. Somitran-Holgersson SS, Wilczek HE, Holgersson J, Soderstrom K. Identification of the nonclassical HLA molecules, MICA, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation* 2002; 74: 269-277.

12. Quiroga I, Sweeney D, Sutton PM, Chapple SD, Souto-Grando JP, Barnardo MC, Fuggle SV. Identification of a novel MICA allele: MICA\*051. *Tissue Antigens* 2004; 63: 466-469.

13. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713-723.

14. Braun WE. Renal transplantation: basic concepts and evolution of therapy. *Clin Apheresis* 2003; 18: 141-152.

15. Michaels PJ, Fishbein MC, Colvin RB. Humoral rejection of human organ transplants. *Springer Semin Immunopatho* 2003;25:119-140.

16. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 242-249.

17. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmuller G, Land W, Albert E. Department of Internal Medicine, Klinikum Innenstadt; Institute of Immunology, Munich, Germany. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int.* 1993 ; 43: 1333-1338.

18. Racusen LC, Colvin RB, Solez K et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant.* 2003 ; 3: 708-714.

19. Koo DD, Roberts IS, Quiroga I, Procter J, Barnardo MC, Sutton M, Cerundolo L, Davies DR, Friend PJ, Morris PJ, Fuggle SV. C4d deposition in early renal allograft protocol biopsies. *Transplantation* 2004; 78: 398-403.

20. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection (CR) by C4d deposits in peritubular capillaries (PTC). *J Am Soc Nephrol* 2001 ; 12: 574-582.

21. Regele H, Bohmig GA, Habicht A et al. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement

membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2002 ; 13: 2371-2380.

22. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting Kidney Graft Failure by HLA Antibodies: a Prospective Trial. *Am J Transplant* 2004; 4: 438-443.

23. Lucas DP, Paparounis ML, Myers L, Hart JM, Zachary AA. Detection of HLA class I-specific antibodies by the QuikScreen enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997 ; 4 : 252-257.

24. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 2000; 69: 319-326.

25. Piazza A, Borrelli L, Monaco PI, Poggi E, Pisani E, Valeri M, Fraboni D, Servetti S, Casciani CU, Adorno D. Posttransplant donor-specific antibody characterization and kidney graft survival. *Transplant Int* 2000; 13: 439-443.

26. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RWG. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 2003; 75: 1034-1040.

27. Kissmayer-Nielsen F, Olsen F, Peterson V, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966; 2: 662-665.

28. Williams GM, Hume DM, Hudson RP, Morris PJ, Kano K, Milgrom F. "Hyperacute" renal homograft rejection in man. *N Engl J Med* 1968; 279: 611-618.

29. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280: 735-739.

30. Amos DB, Bashir H, Boyle W, MacQueen M, Tiilikainen A. A simple microtoxicity test. *Transplantation* 1970; 7: 220-223.

31. Johnson AH, Rossen RD, Butler WT. Detection of alloantibodies using a microcytotoxicity test: identification of low levels of preformed antibodies in accelerated allograft rejection. *Tissue Antigens* 1972; 2: 215-226.

32. Cross DE, Whittier FC, Weaver P, Foxworth J. A comparison of the antiglobulin versus extended incubation time crossmatch results in 223 renal transplants. *Transplant Proc* 1977; 9: 1803-1806.

33. Fuller TC, Cosimi AB, Russell PS. Use of an antiglobulin-ATG reagent for detection of low levels of alloantibody-improvement of allograft survival in presensitized recipients. *Transplant Proc* 1978; 10: 463-466.

34. Gebel HM, Oldfather JW, Karr RW, Rodey GE. Antibodies directed against HLA-DR gene products exhibit the CYNAP phenomenon. *Tissue Antigens* 1984; 23: 135-140.

35. Kerman RH, Kimball PM, Van Buren CT, Lewis RM, DeVera V, Baghdasarian V, Heydari A, Kahan BD . AHG and DTE/AHG procedure identification of cross-match-appropriate donor-recipient pairings that result in improved graft survival. *Transplantation* 1991; 51: 316-320.

36. Fuller TC, Fuller AA, Golden M, Rodey GE. HLA alloantibodies and the mechanism of the antiglobulin-augmented lymphocytotoxicity procedure. *Hum Immunol* 1997; 56: 94-105.

37. Chapman JR, Taylor CJ, Ting A, Morris PJ. Immunoglobulin class and specificity of antibodies causing positive T cell crossmatches. Relationship to renal transplant outcome. *Transplantation* 1986; 42: 608-613.

38. Tellis VA, Matas AJ, Senitzer D, Louis P, Glicklich D, Soberman R, Veith FJ. Successful transplantation after conversion of a positive crossmatch to negative by dissociation of IgM antibody. *Transplantation* 1989; 47 : 127-129.

39. Garovoy MR, Rheinschmidt MA, Bigos M, Perkins H, Colombe B, Feduska N, Salvatierra O. Flow cytometry analysis: a high technology crossmatch technique facilitating transplantation. *Transplant Proc* 1983; 15: 1939-1944.

40. Chapman JR, Deierhoi MH, Carter NP. Analysis of flow cytometry and cytotoxicity crossmatches in renal transplantation. *Transplant Proc* 1985; 17: 2480-2481.

41. Talbot D, Givan AL, Shenton BK, Stratton A, Proud G, Taylor RM. Rapid detection of low levels of donor specific IgG by flow cytometry with single and dual colour fluorescence in renal transplantation. *J Immunol Methods* 1988; 112: 279 -283.

42. Bray RA, Lebeck LK, Gebel HM. The flow cytometric crossmatch: dual color analysis of T cell and B cell reactivities. *Transplantation* 1989; 48: 834-840.

43. Scornik JC, LeFor WM, Cicciarelli JC, Brunson ME, Bogaard T, Howard RJ, Ackermann JRW, Mendez R, Shires DL, Pfaff WW. Hyperacute and acute kidney graft rejection due to antibodies against B cells. *Transplantation* 1992; 54: 61-64.

44. Karuppan SS, Ohlman S, Moller E. The occurrence of cytotoxic and non-complement-fixing antibodies in the crossmatch serum of patients with early acute rejection episodes. *Transplantation* 1992; 54: 839-843.

45. Talbot D, Cavanagh G, Coates E, Givan AL, Shenton BK, Lennard TWJ, Proud G, Taylor RMR. Improved graft outcome and reduced complications due to flow cytometric crossmatching and DR matching in renal transplantation. *Transplantation* 1992; 53: 925-928.

46. Scornik JC, Brunson ME, Schaub B, Howard RJ, Pfaff WW. The crossmatch in renal transplantation. *Transplantation* 1994; 57: 621-625.

47. Lazda VA. Identification of patients at risk for inferior renal allograft outcome by a strongly positive B cell flow cytometry crossmatch. *Transplantation* 1994; 57: 964-969.

48. Cook DJ. Role of antibodies pretransplantation and posttransplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2002; 7: 157-160.

49. Bryan CF, Baier KA, Nelson PW, Luger AM, Martinez J, Pierce GE, Ross G, Shield CF III, Warady BA, Aeder MI, Helling TS, Muruve N. Long-term graft survival is improved in cadaveric renal retransplantation by flow cytometric crossmatching. *Transplantation* 1998; 66: 1827-1832.

50. Ogura K, Terasaki PI, Johnson C, Mendez R, Rosenthal JT, Ettenger R, Martin DC, Dainko E, Cohen L, Mackett T, Berne T, Barba L, Lieberman E. The significance of a positive flow cytometry crossmatch test in primary kidney transplantation. *Transplantation* 1993; 56: 294-298.

51. Karpinski M, Rush D, Jeffery J, Exner M, Regele H, Dancea S, Pochinco D, Birk P, Nickerson P. Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2807-2814.



52. Mahoney RJ, Norman DJ, Colombe BW, Garovoy MR, Leeber DA. Identification of high- and low-risk second kidney grafts. *Transplantation* 1996; 61: 1349-1355.

53. Thistlethwaite JR, Buckingham M, Stuart JK, Gaber AO, Mayes JT, Stuart FP. T cell immunofluorescence flow cytometry cross-match results in cadaver donor renal transplantation. *Transplant Proc* 1987; 19:722-724.

54. Mahoney RJ, Ault KA, Given SR, Adams RJ, Breggia AC, Paris PA, Palomaki GE, Hitchcox SA, White BW, Himmelfarb J, Leeber DA. The flow cytometric crossmatch and early renal transplant loss. *Transplantation* 1990; 49: 527-535.

55. Talbot D, Givan AL, Shenton BK, Stratton A, Proud G, Taylor RMR. The relevance of a more sensitive crossmatch assay to renal transplantation. *Transplantation* 1989; 47: 552-555.

56. Karuppan SS, Lindholm A, Möller E. Fewer acute rejection episodes and improved outcome in kidney-transplanted patients with selection criteria based on crossmatching. *Transplantation* 1992; 53: 666-673.

57. Kimball P, Rhodes C, King A, Fisher R, Ham J, Posner M. Flow cross-matching identifies patients at risk for postoperative elaboration of cytotoxic antibodies. *Transplantation* 1998; 65: 444-446.

58. Scornik JC, Clapp W, Patton PR, VanDerWerf WJ, Hemming AW, Reed AI, Howard RJ. Outcome of kidney transplants in patients known to be flow cytometry crossmatch positive. *Transplantation* 2001; 71: 1098-1102.

59. O'Rourke RW, Osorio RW, Freise CE, Lou CD, Garovoy MR, Bacchetti P, Ascher NL, Melzer JS, Roberts JP, Stock PG. Flow cytometry crossmatching as

a predictor of acute rejection in sensitized recipients of cadaveric renal transplants. *Clin Transplant* 2000;14:167-173.

60. Cho YW, Cecka JM. Crossmatch tests – an analysis of UNOS data from 1991-2000. In: Cecka and Terasaki, ed. *Clinical Transplants*. UCLA Immunogenetics Center, Los Angeles, CA 2001: 237-246.

61. El Fettouh HA, Cook DJ, Bishay E, Flechner S, Goldfarb D, Modlin C, Dennis V, Novick AC. Association between a positive flow cytometry crossmatch and the development of chronic rejection in primary renal transplantation. *Urology* 2000; 56: 369-372.

62. Van Der Nast BJ, Besouw NM, Witvliet MD, Kuiper PD, Gregoor PS, Van Gelder T, Weimar W, Claas HJ. Formation of donor-specific human leukocyte antigen antibodies after kidney transplantation: correlation with acute rejection and tapering of immunosuppression. *Transplantation* 2003; 75: 871-877.

63. Pelletier RP, Orosz CG, Adams PW, Bumgardner GL, Davies EA, Elkhammas EA, Henry ML, Ferguson RM. Clinical and economic impact of flow cytometry crossmatching in primary cadaveric kidney and simultaneous pancreas-kidney transplant recipients. *Transplantation* 1997; 63: 1639-1645.

64. Kerman RH, Susskind B, Buyse I, Pryzbylowski P, Ruth J, Warnell S, Gruber SA, Katz S, Van Buren CT, Kahan BD. Flow cytometry-detected IgG is not a contraindication to renal transplantation. IgM may be beneficial to outcome. *Transplantation* 1999; 68: 1855-1858.

65. Christiaans MH, Overhof R, Ten Haaft A, Nieman F, Van Hooff JP, Van Den Berg-Loonen EM. No advantage of flow cytometry crossmatch over complement-dependent cytotoxicity in immunologically well-documented renal allograft recipients. *Transplantation* 1996; 62: 1341-1347.

66. Ut zig MJ, Blumke M, Wolff-Vorbeck G, Lang H, Kirste G. Flow cytometry cross-match: a method for predicting graft rejection. *Transplantation* 1997; 63: 551-554.

67. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant* 2003; 3: 1488-1500.

68. Roodnat JI, Mulder PGH, Tielens ETH, Van Riemsdijk IC, Van Gelder T, Weimar W. The Cox Proportional Hazards Analysis in words: examples in the renal transplantation field. *Transplantation* 2004; 77: 483-488.

69. Sutton PM, Harmer AH, A.M. B, Welsh KI. The flow cytometric detection of alloantibodies in screening for renal transplantation. *Transplant Int* 1995; 8: 360-365.

70. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63: 968-974.

71. McLaren AJ, Jassem W, Gray DW, Fuggle SV, Welsh KI, Morris PJ. Delayed graft function: risk factors and the relative effects of early function and acute rejection on long-term survival in cadaveric renal transplantation. *Clin Transplant* 1999; 13: 266-272.

**LOW LEVELS OF DONOR – REACTIVE ANTIBODIES DETECTED BY PRE –  
TRANSPLANT FLOW CYTOMETRY CROSSMATCH IN CADAVERIC  
KIDNEY TRANSPLANTATION – INFLUENCE ON GRAFT SURVIVAL**

Michet da Silva LA,<sup>1</sup> Friend PJ,<sup>2</sup> Sutton M,<sup>2</sup> Fuggle SV<sup>2</sup>

Oxford Transplant Centre, Churchill Hospital, University of Oxford, United Kingdom  
Medical Science Post-Graduation Programme: Nephrology, Federal University of  
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>1</sup> Medical Science Post-Graduation Programme : Nephrology, Federal University of  
Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Oxford Transplant Centre, Churchill Hospital, University of Oxford, United Kingdom

## SUMMARY

**Introduction** . Since a long time ago, a pre-transplant complement-dependent lymphocytotoxicity crossmatch (CDC) has allowed to detect in recipient's serum lymphocytotoxic antibodies against donor cells, which are associated to hyperacute or accelerated rejection and early graft loss. The development of methods with greater sensitivity, like flow cytometry, brought the ability to detect lower levels of non complement-fixing anti-donor antibodies, which are not detected by lymphocytotoxicity. The impact of these antibodies, only detected by flow cytometry, on the outcome of cadaver kidney transplantation, is not clearly established, as several studies are not uniform about significant differences on number of acute rejection episodes and graft survival in their presence. Otherwise, there are no data on the possible interaction between these antibodies and other factors, as number of HLA mismatches, level of pre-transplant sensitization and immunosuppressive protocol.

**Methods.** In this study, we analysed 657 consecutive CDC negative cadaveric kidney transplants performed at a single Centre during a period of 11 years. Pre-transplant prospective flow cytometry crossmatch (FCXM) resulted positive in 130 and negative in 527 cases. The information about a positive FCXM was used along other immunologic data for organ allocation and for the decision about immunosuppressive drugs for each case. Retrospective analysis provided information on number of HLA mismatches, level of pre-transplant sensitization, occurrence of delayed graft function (DGF), acute rejection episodes, steroid-resistant rejections and patient and graft survival.

**Results.** Re-grafts and patients with pre-transplant sensitization > 84% received organs with smaller number of DR and A+B+DR mismatches and stronger immunosuppression, and their graft survival was not statistically different from first transplant cases or patients with lower levels of sensitization. The presence of DR mismatches was the only factor significantly associated with the occurrence of steroid-resistant rejections. The variables with a statistically

significant increased proportional hazard for graft survival were: female recipient, positive FCXM, longer cold ischaemia time and presence of DGF. For patient survival, older recipients, longer cold ischaemia time, presence of DGF and intense maintenance immunosuppression had a statistically significant increased proportional hazard, whereas each subsequent calendar year was associated with a statistically significant decreased proportional hazard.

Considering the whole cohort, positive FCXM recipients received organs with better DR match and stronger immunosuppression, both in induction and maintenance, but showed significantly lower graft survival than negative FCXM patients at 1 year (87% vs. 92%), 2 years (83% vs. 91%) and 5 years (75% vs. 87%) (Hazard Ratio: 1,7; 95% CI: 1,1 – 2,6;  $p = 0,028$ ). There was no difference in relation to number of acute rejection episodes or proportion of cases with steroid-resistant rejections.

In the group with pre-transplant sensitization from 0 through 14%, graft survival was not different between negative and positive FCXM patients. Considering recipients with pre-transplant sensitization from 15 through 50%, graft survival was significantly lower for positive than for negative FCXM patients; there was no statistically significant difference between them in relation to number of DR or A+B+DR mismatches or immunosuppression intensity. In the group of recipients with pre-transplant sensitization from 51 through 100%, positive FCXM patients were transplanted across a significantly lower number of DR and A+B+DR mismatches and received stronger immunosuppression than negative FCXM recipients; graft survival was not significantly different between them.

**Conclusions.** A positive FCXM had a statistically significant negative impact on graft survival in the whole cohort of cadaveric kidney transplant recipients. In the group of patients with pre-transplant sensitization from 0 through 14%, there was no difference on graft survival between positive and negative FCXM recipients. For patients with higher levels of sensitization, the presence of a positive FCXM was associated with a significantly lower graft survival, when there was no difference in relation to number of HLA mismatches or intensity of immunosuppression; when positive FCXM recipients from better HLA matching

and stronger immunosuppression, their graft survival, although displaying a trend to be lower, was not significantly different from the graft survival of negative FCXM patients. Nowadays, despite the availability of powerful immunosuppressive drugs, HLA matching continues to play a very important role in order to achieve better results in cadaveric kidney transplantation.

## INTRODUCTION

Many factors are responsible for the improving results of kidney transplantation over the last decades, including expanding experience and knowledge, improved general patient care, better diagnostic resources, improvements in techniques, and new drugs for prophylaxis and treatment of rejection and infection. Better survival for grafts and patients has been achieved through the simultaneous effects of several immunologic, clinical and therapeutic variables.

A large study from the UK has shown that year of graft, age of donor, cause of donor's death, age of recipient, presence of diabetes in the recipient, cold ischaemia time, transport of kidneys, transplant centre effect, and matching for HLA were significantly associated with graft outcome in a multifactorial analysis. Considering the degree of HLA matching, the best outcome was achieved with kidneys that had no mismatches at HLA-A, HLA-B, and HLA-DR loci (000 mismatches); the next most favourable outcome was achieved with one mismatch at either A or B loci or one mismatch at both the A and B , but no mismatch at the DR locus (100, 010, or 110 mismatches) (1).

There is generally a great concern about re-transplants and transplants in highly sensitized patients, as they have displayed lower graft survival than first transplants or transplants in nonsensitized recipients in some large series (2).

On the other hand, other researchers have published on that by offering to highly sensitized patients better HLA matched kidneys, their graft survival can become similar to that experienced by less sensitized recipients (3-8).

Some new ways of looking at donor-recipient compatibility, like the evaluation of HLA compatibility at the molecular level by comparison of immunogenic epitopes represented by amino acid triplets (9, 10) and the discovery of some previously unknown immunologic targets (11, 12) will probably add further improvements to the strategies to perform transplants across the best possible match.

There are cellular and humoral (anti-donor antibodies) factors involved in the recipient's immunologic response to an allograft and, therefore, in the rejection process (13-16).

Although antibodies reactive to donor HLA antigens have been regularly found in the sera of patients undergoing rejection, the detection and treatment of allograft rejection has historically focused upon cell-mediated processes, which display very well known and easily detected histologic evidences.

A reliable histologic marker to confirm antibody or humoral-mediated rejection, namely the C4d complement fragment deposition in peritubular capillaries, has only recently become available (17) and has been included as an antibody-mediated rejection criteria in the Banff classification of renal allograft rejection (18). In addition, a recent study has shown that in early posttransplant protocol biopsies, C4d is a specific marker for humoral rejection, as indicated by its association with donor specific antibodies and acute histologic rejection (19).

Some recent studies have shown that C4d deposition in peritubular capillaries may also be a marker of antibody-mediated chronic immunologic injury, contributing to chronic allograft nephropathy (20, 21).

Otherwise, the detection of anti-HLA antibodies has been associated with increased graft loss in some screening (22) and case-control (23) studies. The



methods for detecting these antibodies include complement-dependent cytotoxicity, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) and flow cytometry (22-25, 57).

Although the level of pre-transplant sensitization has been traditionally assessed through panel reactive antibody (2), the reactivity of a specific patient can change substantially according to the composition of panel lymphocytes. The evaluation of the complete anti-HLA antibody profile could improve the knowledge about each patient's probable reactivity against a potential donor population with known distribution of HLA specificities (8).

Along with the knowledge of the recipient's general HLA antibody profile, it is mandatory and fundamental to have the result of the specific pre-transplant crossmatch between a sample of recipient's serum and donor lymphocytes.

The methods and techniques developed to detect donor-reactive antibodies have had their precision and sensitivity increased and improved over several years.

The fact that hyperacute rejection and early graft loss can be caused by pre-formed complement-fixing antibodies and prevented by the complement-dependent cytotoxicity crossmatch (CDCXM) is very well known since the sixties (27-29).

Some modified CDCXM techniques, such as extended incubation tests, antihuman globulin (AHG) enhanced T cell and B cell crossmatches, and use of Dithiothreitol (DTT) for reducing IgM antibodies, were developed in an attempt to detect lower levels of anti-donor immunoglobulin reactivity and to increase specificity (30-38).

The routine application of these procedures has virtually eliminated the occurrence of hyperacute rejection of renal allografts.

The flow cytometry crossmatch (FCXM), originally reported by Garovoy et al (39), does not rely on complement fixation, is less subjective than the evaluation of cell death in complement-dependent tests, as it uses a fluorescent secondary antibody to provide a semiquantitative measure of antibody binding on the surface of lymphocytes, and has greater sensitivity than the AHG-CDC to detect low levels of anti-donor antibodies (40-48).

Some researchers have shown that patients selected for cadaveric kidney retransplantation by a negative FCXM display better graft survival than those selected by a negative AHG-CDC crossmatch (49).

Several studies have indicated that the presence of HLA antibodies only detected by a positive FCXM may be associated with increased early graft loss (<3 months) in primary transplants (50, 51), re-grafts (52) or in series including first transplants and re-grafts (53, 54). These antibodies also have been associated with an increased occurrence of acute rejection episodes (55-59) and a lower graft survival (50, 57, 60, 61) regardless of the reactivity was against T or B cells (60, 61). Some researchers have published on that the detection of such antibodies after kidney transplantation depends on the type of immunosuppressive drugs given (22, 62), and may be associated with acute rejection (62) and graft failure (22).

However, other studies did not detect any differences in relation to occurrence of acute rejection (63-65) or in relation to graft survival (58, 63, 64) between negative and positive FCXM patients.

The difficulties for achieving uniformity and standardization on the flow cytometry crossmatch technique and the variable cut-off between negative and positive tests adopted by different authors (49, 50, 54, 55, 57, 59, 63-66) represent negative points to a more adequate interpretation of FCXM results and to establish comparison between results of different series.

In this way, the true clinical relevance of IgG antibodies detected by flow cytometry but not by CDC crossmatch has not been clearly established; although not necessarily a contraindication to transplantation, the presence of these antibodies seems to bring a significant additional risk which could not be disregarded (67).

There is a need for more data and more evidence on the effect of these low level anti-donor antibodies on graft survival, and on the relationship between them and other risk factors for graft failure, like the level of pre-transplant sensitization, the number of HLA mismatches and the immunosuppressive protocol.

Graft and patient survival are very useful tools for evaluating the results of kidney transplantation and for studying the positive or negative impact of many factors; however, as several variables act simultaneously, can interfere with each other and can associate or independently influence survival, it is mandatory to use multivariate analysis, namely the Cox Regression Proportional Hazard Model, to study this interaction and to evaluate the individual role of each factor (68). In this context, the presence or absence of a positive flow cytometry crossmatch is one of the factors to be included in the analysis, along with other immunologic, clinical and therapeutic variables.

We have studied a cohort of cadaveric kidney recipients transplanted at a single centre during a period of 11 years, to test the hypothesis that the pre-transplantation existence of donor-reactive antibodies only detected by FCXM and not by CDCXM is associated with poorer graft survival, and to evaluate the possible relationship between these antibodies, the presence of other risk factors for graft failure, the grade of HLA match and the immunosuppressive medications.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Patient Population and Data Collection*

The study analysed a cohort of 657 consecutive cadaveric kidney recipients transplanted across a negative IgG - CDC crossmatch, at the Oxford Transplant Centre, Churchill Hospital, Oxford Radcliffe Hospitals, University of Oxford, UK,

from January 1993 through December 2003. All patients had a prospective pre-transplant FC crossmatch done with current and historic serum samples against donor lymphocytes.

The decision to proceed or not with a transplant for each specific donor-recipient combination depended on clinical, surgical and immunologic risks, including level of pre-transplant sensitization and number of DR and A+B+DR mismatches. A positive FCXM was not considered as a contra-indication to transplantation itself, but this information was taken into account together with other relevant clinical and immunologic data for organ allocation, for each patient evaluation and for the decision-making process about the immunosuppressive medications.

The level of pré-transplant sensibilization was evaluated by panel reactive antibody (IgG-PRA) and screening for anti-HLA antibodies by a combination of CDC, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) and FC.

The allocation of organs followed the policy of the Oxford Transplant Centre and the United Kingdom Transplantation Service, offering better matched kidneys for highly sensitized recipients (4-8).

A retrospective analysis was undertaken on every patient's transplant flow chart and hospital notes and on the Centre's computerized database in order to obtain all demographic, immunologic, clinical and therapeutic data. This included demographics for donor and recipients, cause of chronic renal failure, dates of transplantation, graft failure and death, results of current and highest (current or historic) pre-transplant sensitization (IgG-PRA), number of HLA – A, B and DR mismatches, CDC crossmatch, current and highest serum FC crossmatch, cold ischaemia time (CIT), anastomosis time, occurrence or not of delayed graft function (DGF - defined in this study as the need for dialysis within the first post-transplantation week), induction and maintenance immunosuppressive medications, occurrence or not of acute rejection, time from transplantation to the first acute rejection, number of acute rejection episodes within the first three post-transplantation months, and occurrence or not of steroid-resistant rejection (SRR).

The endpoints for the study were graft and patient survival, number of acute rejection episodes, time to the first acute rejection and occurrence of steroid-resistant rejection. There was an analysis of the effect of a positive FCXM and other clinical, immunologic and therapeutic factors on those endpoints.

The Chi-Square Test was used for the comparison of categorical variables; for continuous variables, comparisons were performed through the T Test (two groups) or One Way Analysis of Variance (three groups). Graft and patient survival were determined by the Kaplan-Meier method; comparison of survival between two groups was done through the Log-Rank Test. For graft survival analysis, patients who died with a functioning graft were not considered as a graft failure (graft survival censored for death). The influence of several continuous and categorical variables on survival was studied through the Cox Regression Proportional Hazard Model, yielding the corresponding Hazard Ratios. Statistics were performed using a computerized program (SPSS for Windows, version 12.0); a *p* value and a 95 % Confidence Interval (CI) were determined for each calculation.

### *Immunosuppressive Medications*

The maintenance immunosuppressive medications included Cyclosporine A, Azathioprine and Prednisolone for every patient from January 1993 through May 2001, with the exception of some patients who entered some trials for new drugs, like Mycophenolate Mofetil (MMF) and Sirolimus. During that period there was no change to the immunosuppressive protocol in the presence of DGF.

From June 2001 through December 2003, a new immunosuppressive protocol was established, with three levels of intensity : the Low Intensity Level (recipients with 0-2 A+B+DR mismatches, no previous rejected grafts and no hypersensitization) included Cyclosporine A, Prednisolone and Azathioprine; the

Medium Intensity Level (recipients with 3-4 A+B+DR mismatches and/or a previous rejected graft, but with highest pre-transplant IgG-PRA less than 85%) included Cyclosporine A, Prednisolone and MMF, with a switch from MMF to Azathioprine after 3 to 12 months, depending on the number and severity of rejection episodes; the High Intensity Level (recipients with 5–6 A+B+DR mismatches and/or a highest pre-transplant IgG-PRA greater than 85%) included induction therapy with a 14-day course of Anti-Thymoglobulin (ATG) or a 10-day course of Muromonab-CD3 (OKT3) or two doses of Basiliximab along with maintenance immunosuppression with Tacrolimus, Prednisolone and MMF. Sirolimus was mainly used as an alternative for patients with proven calcineurin inhibitors nephrotoxicity, in order to avoid this type of immunosuppressive drugs.

The initial dose was 8 mg/Kg/day for Cyclosporine A and 0.2 mg/Kg/day for Tacrolimus, with half of the daily dose given every 12 hours. Cyclosporine A, Tacrolimus and Sirolimus doses were adjusted for maintaining trough levels respectively in the range between 150 – 300 ng/mL, 10 – 15 ng/mL and 10 – 15 ng/mL during the first 6 months, and respectively in the range between 75 – 150 ng/mL, 5 – 10 ng/mL and 6 – 10 ng/mL afterwards. Azathioprine was started at 1.5 mg/Kg/day and MMF, at 1 g (with Cyclosporine A) or 0.5 g (with Tacrolimus or Sirolimus) twice a day, with further adjustments to keep white cell count over 4000/microL. Prednisolone daily dose was 20 mg for recipients with 60 Kg or more and 15 mg for patients with less than 60 Kg. A slow tapering of the Prednisolone dose was undertaken from the second post-transplantation month, and it was discontinued in the majority of patients by the end of the second year.

Patients with DGF, defined in the Oxford Transplant Centre protocol as the need for dialysis or the failure of creatinine to fall by 10% in the first 24 hours post-transplant, had the calcineurin inhibitor halved and adjusted for achieving half of the previous described trough blood levels and, if the patient was on Azathioprine, MMF was substituted for it. Whether DGF lasted for more than 7 days, the calcineurin inhibitor was stopped for 10 to 14 days and ATG was given during that period. ATG was used in a dose of 2mg/Kg; according to daily CD3 monitoring, it was repeated as necessary to keep cell count less than 50/microL. Acute rejection

episodes were treated with three daily pulses of 500 mg of Methylprednisolone. Steroid-resistant rejections were treated with a 10 to 14 days course of ATG or OKT3.

For this study, we have considered maintenance immunosuppression intensity as “moderate” whether the patient received just Cyclosporine A, Azathioprine and Prednisolone, and “intense” whether the protocol has included MMF and/or Tacrolimus and/or Sirolimus in addition to or substitution for any of the previous drugs. We have not taken into account any of the maintenance immunosuppressive drugs if it was used just temporarily for a less than 1 month period.

### *Pre-Transplantation Crossmatch*

#### **Complement Dependent Cytotoxicity Crossmatch:**

A CDCXM was performed to detect the presence of complement-dependent anti-donor lymphocytotoxic antibodies in recipient's serum.

Donor T and B lymphocytes were isolated from peripheral blood lymphocytes or splenocytes using immunomagnetic beads (Dynal, UK). CDC assays were performed on the isolated T and B cells using the standard diagnostic techniques currently in use at the Oxford Transplant Centre (69). Briefly, 1  $\mu$ l T and B lymphocytes at  $2.0 \times 10^6$ /ml were incubated with recipient serum samples for 30 min. at 22<sup>o</sup>C in the presence or absence of dithiothreitol. Following addition of 5  $\mu$ l rabbit complement the incubation proceeded for a further 90 min. for T lymphocytes and 75 min. for B lymphocytes.

An ultraviolet microscope was used to read the test; acridine orange and ethidium bromide were used to differentiate live and dead cells. The adopted criteria for a positive CDCXM was cell lysis > 10% above the background.

### **Flow Cytometry Crossmatch:**

Flow cytometry crossmatching was performed to detect IgG donor-reactive antibodies in recipient's serum. Briefly, 10  $\mu$ l serum were incubated with 40  $\mu$ l cell suspension (mixed T and B lymphocytes) at a concentration of  $2.0 \times 10^6$ /ml at 22°C for 30 min. Following washing in PBS (phosphate buffered saline containing 0.1% sodium azide and 0.1% bovine serum albumin) 50  $\mu$ l rabbit F(ab)'<sub>2</sub> anti-human IgG FITC conjugate (DAKO Ltd) diluted 1:20 in Terasaki Park medium containing 0.1% sodium azide was added to each tube and incubated for 45 min at 4°C. Unbound label was removed by washing and the cells resuspended in 500  $\mu$ l PBS prior to analysis on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). Normal AB serum from untransfused males was used as a negative control and a mixture of HLA-Bw4 and Bw6 typing sera as the positive control. A dilution of the positive control was used as a marker of the sensitivity of the assay (69). The rabbit anti-human IgG antibody used does not crossreact with the ATG used for induction, management of DGF or treatment of steroid resistant rejection. The adopted criteria for a positive FCXM was a MCS above 10/256 channels in relation to the negative control.

### *Diagnosis of Rejection – Kidney Transplant Biopsies*

Protocol biopsies were performed on the seventh and on the twenty-eighth post-transplantation days and whenever necessary for a suspected rejection or an unexplained rising creatinine. All acute rejection episodes were biopsy proven; histopathology for the diagnosis and evaluation of severity of rejection was



undertaken according to the Banff criteria (13). A rejection episode was considered steroid-resistant whether, after three daily pulses of 500 mg of Methylprednisolone, the plasma creatinine level continued to increase and the patient was treated with ATG or OKT3 for a 10 to 14 days period.

## RESULTS

The cause of chronic renal failure (CRF) was chronic glomerulonephritis in 164 patients (25%), adult polycystic kidney disease in 110 (16.7%), diabetic nephropathy in 74 (11.3%), chronic pyelonephritis in 72 (11%), hypertension in 33 (5%), other diseases in 105 (16%) and unknown in 99 (15%).

There were 385 male recipients (58.6%) and 339 male donors (51.6%). Donor age was  $43 \pm 15$  and recipient age,  $46 \pm 13$  years. The transplanted kidney was originated from a local hospital in Oxford in 411 cases (63%) and from another centre of the United Kingdom Transplant Service in 246 cases (37%). There were 551 first transplants (84%) and 106 re-transplants (16%). In the re-grafts, there were 87 second transplants, 17 third transplants and 2 fourth transplants. The cold ischaemia time was  $20.4 \pm 8$  hours and the anastomosis time,  $41 \pm 12$  minutes.

Table 1 shows number of DR and A+B+DR mismatches, induction and maintenance immunosuppression, proportion of cases with DGF, proportion of cases with acute rejection, number of rejection episodes/patient in the first three months, time from transplantation to the first rejection, proportion of recipients with steroid-resistant rejections and graft and patient survival for the whole cohort.

**TABLE 1**  
**Oxford Transplant Centre**  
**Cadaveric Kidney Transplants 1993 – 2003 ( n = 657 )**

|   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| DR Mismatches ( 0 – 1 – 2 )   | N = 370 – 267 – 20                    |
| <b>DR Mismatches / Patient</b>  | <b>0.47 ± 0.56</b>                    |
| A+B+DR Mismatches (0-1-2-3-4-5-6)   | N= 63 – 75 – 190 – 199 – 109 – 20 – 1 |
| <b>A+B+DR Mismatches / Patient</b>  | <b>2.43 ± 1.3</b>                     |
| <b>Induction Therapy :</b>  |                                       |
| ATG (n=66) OKT3 (n=4) Basiliximab (n=30)  | 100 ( 16 % )                          |
| <b>Maintenance Immunosuppression :</b>  |                                       |
| (“Moderate”) CyA + Aza + Pred   | 401 ( 61 % )                          |
| (“Intense”) CyA/Tac+Aza/MMF/Sirolimus + Pred  | 256 ( 39 % )                          |
| <b>Delayed Graft Function</b>   | 222 ( 34 % )                          |
| <b>Acute Rejection</b>  | 269 ( 41 % )                          |
| <b>Acute Rejection Episodes / Patient</b>   | 0.51 ± 0.67                           |
| <b>Steroid-Resistant Rejection</b>  | 63 ( 9.6 % )                          |
| <b>Time Transplant - First Rejection (days)</b>   | 16 ± 15                               |
| Graft Survival : 1 year – 2 years – 5 years   | 91 % - 89 % - 85 %                    |
| Patient Survival : 1 year – 2 years – 5 years   | 94 % - 92 % - 87 %                    |
| Patients at Risk : 1 year – 2 years – 5 years   | 546 – 460 – 258                       |
| ATG = Anti-Thymoglobulin      OKT3 = Muromonab CD3      CyA = Cyclosporine A<br>Aza = Azathioprine      Tac = Tacrolimus      MMF = Mycophenolate Mofetil |                                       |

A comparison between first grafts (n = 551) and re-grafts (n = 106) showed no differences in relation to donor age ( $43 \pm 15$  vs.  $41 \pm 15$  years;  $p = 0.280$ ), donor sex (females: 49% vs. 45%;  $p = 0.548$ ), recipient sex (females: 41% vs. 43%;  $p = 0.649$ ) and cold ischaemia time ( $21 \pm 8$  vs.  $20 \pm 8$  hours;  $p = 0.199$ ). According to Table 2, re-graft recipients were significantly younger, displayed significantly higher pre-transplant sensitization (current and highest), had a significantly greater proportion of positive FCXM patients according to current or highest serum, and also a greater proportion of cases with DGF. On the other hand, re-transplant patients received organs with a significantly lower number of DR and A+B+DR mismatches, and were given significantly more induction therapy; however, maintenance immunosuppression intensity was not different in relation to first transplants. The proportion of patients displaying acute rejection and the

number of acute rejection episodes/patient were smaller for re-grafts than for first grafts; the time from transplantation to the first rejection was longer for re-transplants than for first transplants; the proportion of cases with steroid-resistant rejection was the same between them. Graft survival was equivalent for re-grafts and first grafts.

**TABLE 2**  
**First Transplants x Re-Grafts**

|                                    | First Grafts      | Re-Grafts         | P             |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|---------------|
| N                                  | 551               | 106               |               |
| <b>Recipient age</b>               | <b>46 ± 13</b>    | <b>44 ± 12</b>    | <b>0.045</b>  |
| <b>Current Sensitization</b>       | <b>8 ± 12 %</b>   | <b>36 ± 33 %</b>  | <b>0.0001</b> |
| <b>Highest Sensitization</b>       | <b>14 ± 19 %</b>  | <b>53 ± 34 %</b>  | <b>0.0001</b> |
| <b>Current Serum positive FCXM</b> | <b>14 %</b>       | <b>26 %</b>       | <b>0.003</b>  |
| <b>Highest Serum positive FCXM</b> | <b>18 %</b>       | <b>29%</b>        | <b>0.01</b>   |
| <b>DGF</b>                         | <b>32 %</b>       | <b>45 %</b>       | <b>0.007</b>  |
| <b>DR mismatches</b>               | <b>0.5 ± 0.6</b>  | <b>0.29 ± 0.5</b> | <b>0.0001</b> |
| <b>A+B+DR mismatches</b>           | <b>2.6 ± 1.2</b>  | <b>1.8 ± 1.3</b>  | <b>0.0001</b> |
| <b>Induction therapy</b>           | <b>11 %</b>       | <b>36 %</b>       | <b>0.0001</b> |
| Intense maintenance IMM            | 39 %              | 40%               | 0.856         |
| <b>Rejection</b>                   | <b>43 %</b>       | <b>31 %</b>       | <b>0.022</b>  |
| <b>Number reject episodes</b>      | <b>0.54 ± 0.7</b> | <b>0.32 ± 0.5</b> | <b>0.0001</b> |
| <b>Time to first rejection</b>     | <b>15 ± 14</b>    | <b>23 ± 18</b>    | <b>0.018</b>  |
| Steroid – Resistant Rejection      | 9.6 %             | 9.4 %             | 0.940         |
| Graft survival                     |                   |                   |               |
| 1 year                             | 91 %              | 91 %              | 0.711         |
| 2 years                            | 89 %              | 90 %              | 0.711         |
| 5 years                            | 84 %              | 86 %              | 0.711         |

FCXM = Flow cytometry crossmatch DGF = Delayed graft function IMM = Immunosuppression

The highly sensitized recipients (highest pre-transplant sensitization 85-100%; n = 42) did not show significant differences from the other patients (highest pre-transplant sensitization 0-84%; n = 615) in relation to donor age ( $43 \pm 15$  vs  $43 \pm 18$  years; p = 0,894) and donor sex (females: 48% vs. 50%; p = 0,874). According to Table 3, highly sensitized recipients were significantly younger, had a significantly greater proportion of re-transplants and positive FCXM patients, a significantly longer CIT and a significantly greater proportion of cases with DGF. On the other hand, they were transplanted across a significantly smaller number of

DR and A+B+DR mismatches and had a significantly greater proportion of patients who received induction therapy. There was no difference in relation to the proportion of recipients receiving "intense" maintenance immunosuppression.

**TABLE 3**  
**Distribution of patients according to their**  
**Highest Pre-transplant Sensitization**  
 ( IgG-Panel Reactive Antibody - IgG-PRA)  
 (0 – 84 %) vs. (85 – 100 %)

|   | Sensitization<br>0 – 84 % | Sensitization<br>85 – 100 % | p             |
|---|---------------------------|-----------------------------|---------------|
| <b>N</b>                                    | <b>615</b>                | <b>42</b>                   |               |
| <b>Recipient age</b>                        | <b>47 ± 13</b>            | <b>42 ± 11</b>              | <b>0,026</b>  |
| <b>Highest IgG-PRA</b>                      | <b>16 ± 18 %</b>          | <b>95 ± 5 %</b>             | <b>0,0001</b> |
| <b>Highest Serum positive FCXM Patients</b> | <b>19 %</b>               | <b>33 %</b>                 | <b>0,028</b>  |
| <b>Re-grafts</b>                            | <b>13 %</b>               | <b>69 %</b>                 | <b>0.0001</b> |
| <b>DR mismatches / Patient</b>              | <b>0,48 ± 0,6</b>         | <b>0,24 ± 0,4</b>           | <b>0,001</b>  |
| <b>A+B+DR mismatches / Patient</b>          | <b>2,5 ± 1,2</b>          | <b>1,1 ± 1,0</b>            | <b>0,0001</b> |
| <b>Cold Ischaemia Time (hours)</b>          | <b>20 ± 8</b>             | <b>24 ± 10</b>              | <b>0.027</b>  |
| <b>Delayed Graft Function</b>               | <b>32 %</b>               | <b>64 %</b>                 | <b>0,0001</b> |
| <b>Induction</b>                            | <b>12 %</b>               | <b>64 %</b>                 | <b>0,0001</b> |
| “ Intense ” maintenance IMM                 | 38 %                      | 48%                         | 0,856         |
| Acute Rejection                             | 42 %                      | 33 %                        | 0,333         |
| Acute Rejection Episodes / Patient          | 0,5 ± 0,7                 | 0,4 ± 0,5                   | 0,139         |
| Time to First Rejection ( days )            | 15 ± 15                   | 22 ± 15                     | 0,086         |
| Steroid – Resistant Rejection               | 9,5 %                     | 9,5 %                       | 0,995         |
| <b>Graft Survival</b>                       |                           |                             |               |
| 1 year                                      | 92 %                      | 85 %                        | 0,131         |
| 2 years                                     | 90 %                      | 83 %                        | 0,131         |
| 5 years                                     | 85 %                      | 77 %                        | 0,131         |

PRA = Panel reactive antibody FCXM = Flow cytometry crossmatch IMM = Immunosuppression  
 Highest serum = Serum sample with highest PRA (current or historic)

Graft survival was not significantly different between highly sensitized recipients and the other patients. The proportion of patients displaying acute rejection, the number of acute rejection episodes/patient, the time from the transplant to the first acute rejection and the proportion of cases with steroid-resistant rejection also were not statistically different between the two groups.

A Logistic Regression Multivariate Analysis was performed to evaluate the influence of current and highest sensitization, DR mismatches, A+B+DR mismatches, number of transplant (first or re-graft), FCXM and induction therapy

on the occurrence of Steroid-Resistant Rejection (SRR); from this analysis, the only significant variable was the presence of DR mismatches (odds ratio : OR = 2.41; 95% CI: 1.37 – 4.24; p = 0.002). The result of this analysis is displayed on Table 4.

There were 26 cases of SRR among 370 recipients with DR mismatches = 0 (7%) and 37 cases among 287 recipients with DR mismatches > 0 (13%) (p = 0.01). The number of DR mismatches/patient was  $0.63 \pm 0.58$  in recipients displaying SRR (n = 63) and  $0.45 \pm 0.55$  in recipients with no acute rejection or with steroid-responsive rejection (n = 594) (p = 0.01).

**TABLE 4**  
**Influence of several variables on the occurrence of**  
**Steroid – Resistant Rejection**  
**( Logistic Regression )**

| Variable                        | Odds Ratio  | 95 % CI            | p            |
|---------------------------------|-------------|--------------------|--------------|
| Current sensitization (IgG-PRA) | 1,0         | 0,98 – 1,03        | 0,649        |
| Highest sensitization (IgG-PRA) | 0,99        | 0,97 – 1,01        | 0,335        |
| <b>DR mismatches / Patient</b>  | <b>2,41</b> | <b>1,37 – 4,24</b> | <b>0,002</b> |
| A + B + DR mismatches/Patient   | 0,78        | 0,60 – 1,03        | 0,075        |
| Number of graft                 | 1,35        | 0,57 – 3,19        | 0,493        |
| Highest serum FCXM              | 1,59        | 0,84 – 3,01        | 0,156        |
| Induction                       | 0,54        | 0,21 – 1,37        | 0,191        |

IgG-PRA = IgG – Panel reactive antibody  
FCXM = Flow cytometry crossmatch

Number of graft = First graft or re-graft  
IC = Confidence interval

The flow cytometry crossmatches resulted 555 negative and 102 positive recipients according to tests with current serum samples, and 527 negative and 130 positive recipients according to highest serum samples.

A Cox Regression Multivariate Analysis was used to study the influence on graft survival of current and highest serum FCXM result, donor sex, donor age, recipient sex, recipient age, cause of chronic renal failure, current and highest sensitization, number of HLA mismatches, cold ischaemia time, delayed graft

function, number of transplant (first or re-graft), year of transplant, induction therapy and maintenance immunosuppression intensity.

The best fitting model was that depicted on Table 5, with nine variables: donor age, recipient sex, number of transplant (first or re-graft), year of transplant, number of HLA mismatches, highest serum FCXM result, CIT, DGF and maintenance immunosuppression intensity. The overall score for the model showed a Chi-Square of 86.425 and a  $p < 0.0001$ . The statistically significant variables were: highest serum FCXM, recipient sex, CIT and DGF.

**TABLE 5**  
**Influence of several variables on Graft Survival**  
**( Cox Regression Proportional Hazard Model )**

| <b>Variable</b>                      | <b>Proportional Hazard</b> | <b>95 % CI</b>     | <b>p</b>      |
|--------------------------------------|----------------------------|--------------------|---------------|
| Donor Age ( years)                   | 1.01                       | 0.99 – 1.03        | 0.110         |
| <b>Recipient Sex (Females/Males)</b> | <b>1.61</b>                | <b>1.08 – 2.42</b> | <b>0.02</b>   |
| First Graft / Re-Graft               | 0.69                       | 0.39 – 1.23        | 0.209         |
| Year of Transplant                   | 0.92                       | 0.82 – 1.02        | 0.100         |
| A+B+DR Mismatches                    | 1.02                       | 0.87 – 1.20        | 0.807         |
| <b>Highest Serum FCXM</b>            | <b>1.89</b>                | <b>1.15 – 3.11</b> | <b>0.012</b>  |
| <b>CIT ( hours )</b>                 | <b>1.03</b>                | <b>1.01 – 1.05</b> | <b>0.004</b>  |
| <b>DGF</b>                           | <b>3.54</b>                | <b>2.27 – 5.51</b> | <b>0.0001</b> |
| Maintenance IMM Intensity            | 1.12                       | 0.63 – 1.99        | 0.690         |

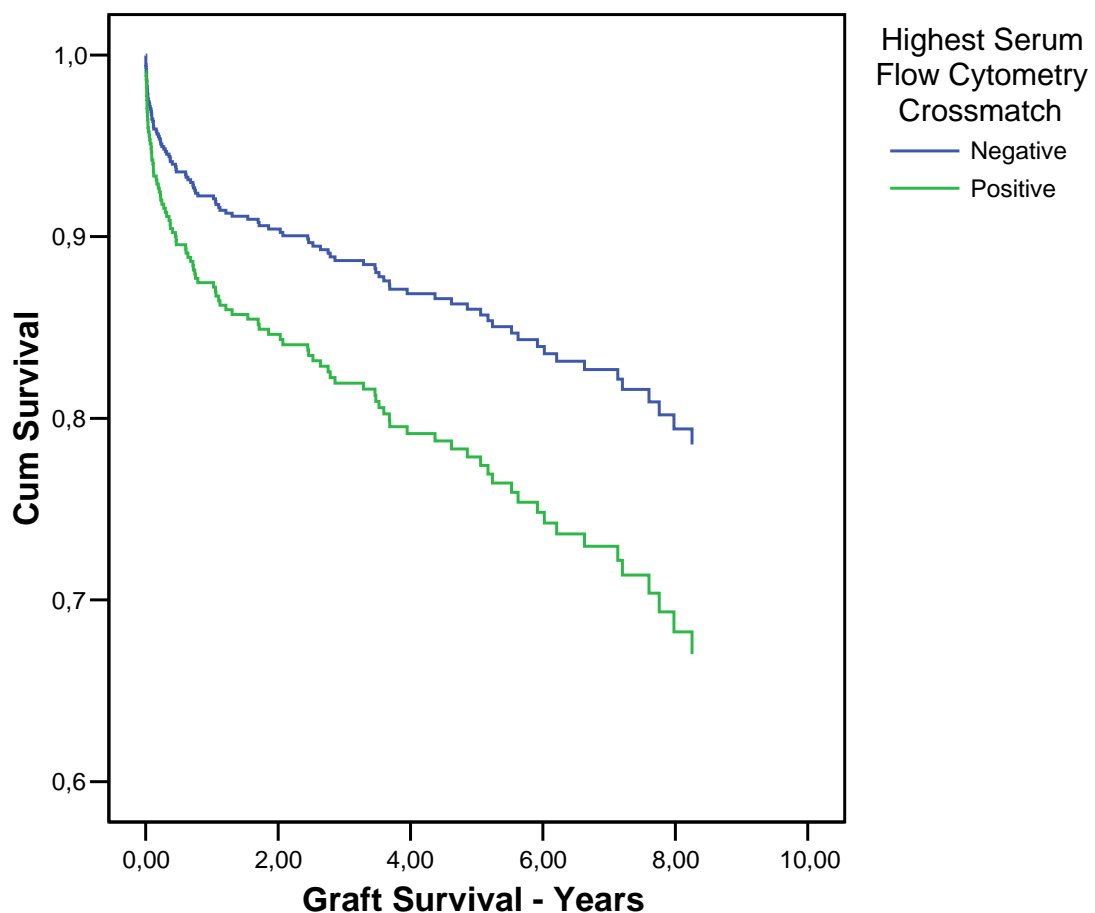
Patients: 657; Events: 97; Overall score for the model: Chi-Square = 86.425;  $p < 0.0001$   
IMM = Immunosuppression

In this way, the proportional hazard for highest serum positive in relation to negative FCXM patients was 1.89 (95% CI: 1.15 – 3.11;  $p = 0.012$ ); female recipients displayed a proportional hazard of 1.61 in relation to males (95% CI: 1.08 – 2.42;  $p = 0.02$ ); there was an increased proportional hazard of 1.03 (95% CI: 1.01 – 1.05;  $p = 0.004$ ) for each hour the CIT was longer, and the presence of DGF brought a proportional hazard of 3.54 in relation to its absence (95% CI: 2.27 – 5.51;  $p = 0.0001$ ).

Whether the current serum FCXM result was used instead of the highest serum FCXM, this variable became not significant (proportional hazard = 1.59; 95% CI: 0.9 – 2.81;  $p = 0.109$ ) and the overall Chi-Square for the model diminished

to 82.987. Due to this, all the subsequent analysis were done based on the results of highest serum flow cytometry crossmatches.

### Survival Function for patterns 1 - 2



**Figure 1. Graft survival for positive and negative flow cytometry Crossmatch patients in the whole cohort.** Graft survival for highest serum positive (  $n = 130$  ) and negative (  $n = 527$  ) flow cytometry crossmatch ( FCXM ) cadaveric kidney recipients ( Proportional Hazard = 1.7; 95 % CI: 1.1 – 2.6 ;  $p = 0.028$  ).

In the univariate analysis, the proportional hazard for positive in relation to negative FCXM recipients was 1.7 (95% CI: 1.1 – 2.6;  $p = 0.028$ ) (Figure 1).

Negative ( $n = 527$ ) and positive ( $n = 130$ ) FCXM patients displayed no differences in relation to donor sex (females: 49% vs. 47%;  $p = 0.707$ ), donor age ( $43 \pm 14$  vs.  $42 \pm 16$  years;  $p = 0.523$ ), recipient sex (females: 40% vs. 49%;  $p = 0.680$ ) and recipient age ( $47 \pm 13$  vs.  $46 \pm 13$  years;  $p = 0.414$ ).

Medium channel shift was significantly greater for positive than for negative FCXM recipients, both considering tests with current ( $14 \pm 12$  vs.  $2 \pm 3$ ;  $p = 0.0001$ ) or highest serum ( $17 \pm 12$  vs.  $3 \pm 3$ ;  $p = 0.0001$ ).

As shown in Table 6, positive FCXM recipients displayed a higher proportion of re-grafts and greater current and highest sensitization than negative FCXM patients. The number of A+B+DR mismatches was lower for positive than for negative FCXM recipients, but this was not statistically significant; on the other hand, DR mismatches were significantly lower for positive FCXM patients, and they had a significantly higher proportion of patients who received induction therapy and higher intensity maintenance immunosuppressive medications in relation to recipients with a negative FCXM. Cold ischaemia time was significantly shorter among positive FCXM recipients; the proportion of DGF cases was the same for positive and negative FCXM patients.

The proportion of recipients with acute rejection, the number of acute rejection episodes/patient, the time from transplantation to the first rejection episode, and the proportion of patients displaying steroid-resistant rejection were not statistically different between negative and positive FCXM recipients.

Graft survival was significantly lower at 1 year, 2 years and 5 years for positive than for negative FCXM patients (respectively 87% vs. 92%, 83% vs. 91% and 75% vs. 87%;  $p = 0.028$ ). Patient survival was not different between the two groups.



**TABLE 6**  
**Highest Serum Flow Cytometry Crossmatch (FCXM)**  
**Recipients with negative test x Recipients with positive test**

|                                      | FCXM negative      | FCXM positive      | P             |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|---------------|
| <b>N</b>                             | <b>527</b>         | <b>130</b>         |               |
| <b>Re – Graft Recipients</b>         | <b>14 %</b>        | <b>24 %</b>        | <b>0.01</b>   |
| <b>MCS ( pré-transplant serum )</b>  | <b>2 ± 3</b>       | <b>14 ± 12</b>     | <b>0.0001</b> |
| <b>MCS ( highest serum )</b>         | <b>3 ± 3</b>       | <b>17 ± 12</b>     | <b>0.0001</b> |
| <b>Current Sensitization</b>         | <b>11 ± 18 %</b>   | <b>17 ± 26 %</b>   | <b>0.009</b>  |
| <b>Highest Sensitization</b>         | <b>19 ± 25 %</b>   | <b>27 ± 31 %</b>   | <b>0.01</b>   |
| A+B+DR Mismatches                    | 2.47 ± 1.26        | 2.25 ± 1.25        | 0.069         |
| <b>DR Mismatches</b>                 | <b>0.50 ± 0.57</b> | <b>0.35 ± 0.51</b> | <b>0.006</b>  |
| <b>Induction Therapy</b>             | <b>12 %</b>        | <b>27 %</b>        | <b>0.0001</b> |
| <b>“Intense” maintenance IMM</b>     | <b>36 %</b>        | <b>49 %</b>        | <b>0.01</b>   |
| <b>Cold Ischaemia Time ( hours )</b> | <b>21 ± 8</b>      | <b>19 ± 7</b>      | <b>0.01</b>   |
| Delayed Graft Function               | 33 %               | 36 %               | 0.496         |
| Acute Rejection                      | 42 %               | 38 %               | 0.418         |
| Episodes Acute Rejection / Patient   | 0.52 ± 0.68        | 0.44 ± 0.61        | 0.225         |
| Time to First Rejection ( days )     | 15 ± 15            | 17 ± 16            | 0.354         |
| Steroid – Resistant Rejection        | 9 %                | 12 %               | 0.391         |
| <b>Graft Survival – 1 year</b>       | <b>92 %</b>        | <b>87 %</b>        | <b>0.028</b>  |
| <b>Graft survival – 2 years</b>      | <b>91 %</b>        | <b>83 %</b>        | <b>0.028</b>  |
| <b>Graft Survival – 5 years</b>      | <b>87 %</b>        | <b>75 %</b>        | <b>0.028</b>  |
| Patient Survival – 1 year            | 94 %               | 93 %               | 0.882         |
| Patient Survival – 2 years           | 92 %               | 93 %               | 0.882         |
| Patient Survival – 5 years           | 87 %               | 86 %               | 0.882         |

FCXM = Flow cytometry crossmatch    MCS = Medium channel shift    IMM = Immunosuppression

The finding that pre-transplant sensitization was significantly greater among positive than negative FCXM recipients has prompted us to analyse the impact of a positive FCXM at different levels of pre-transplant sensitization.

With this aim, the patients were grouped according to their highest level of pre-transplant sensitization in : Group 1 (highest pre-transplant sensitization 0 – 14 %; n = 393), Group 2 (highest pre-transplant sensitization 15 – 50 %; n = 178) and Group 3 (highest pre-transplant sensitization 51 – 100 %; n = 86). Table 7 displays the characteristics for these three groups.

The three groups displayed no differences in relation to donor sex (females: 49 %; 46 % and 49 %; not significant) and donor age ( $43 \pm 15$ ;  $42 \pm 14$  and  $42 \pm 16$  years; not significant). Recipient age was significantly lower ( $p = 0.02$ ) in Group 3 ( $44 \pm 13$  years) than in Group 1 or Group 2 ( $46 \pm 19$  and  $48 \pm 13$  years). In Group 3 there was a significantly higher proportion of females, a greater number of blood transfusions/patient and a higher proportion of females with previous pregnancies than in Group 1 or Group 2; the proportion of re-graft patients and previously transfused recipients increased significantly from Group 1 to Group 2 and from Group 2 to Group 3. The proportion of patients with a positive FCXM was greater in Group 3 than in the other two groups.

Group 3 recipients were transplanted across a significantly smaller number of DR and A+B+DR mismatches than Group 1 or Group 2 patients, and the proportion of recipients who received induction therapy increased significantly from Group 1 to Group 2 and from Group 2 to Group 3.

The number of rejection episodes/patient was smaller in Group 3 than in Group 1, and the time from transplantation until the first rejection episode was longer in Group 3 than in Group 1 or Group 2. The proportion of cases displaying steroid-resistant rejection was not statistically different for the three groups. Cold ischaemia time was slightly longer in Group 3 than in the other two groups, but this was not statistically significant. Group 3 displayed a significantly greater proportion of patients with DGF. Graft survival was not statistically different for the three groups.

**TABLE 7**  
**Distribution of Patients according to their**  
**Highest Pre-transplant Sensitization (IgG-PRA)**

|  | <b>Group 1</b>                     | <b>Group 2</b>                             | <b>Group 3</b>                                |
|--|------------------------------------|--|---|
| Highest Pré-Tx Sensitization                         | <b>0 – 14 %</b>                    | <b>15 – 50 %</b>                           | <b>51 – 100 %</b>                             |
| <b>N</b>   | <b>393</b>                         | <b>178</b>                                 | <b>86</b>                                     |
| Highest Sensitization                                | 5 ± 4 % ***                        | 26 ± 10 % ***                              | 80 ± 17 %***                                  |
| Recipient Sex ( Female )                             | 37 %                               | 43 %                                       | 57 % **                                       |
| Previously pregnant females                          | 73 %                               | 70 %                                       | 84 % ***                                      |
| Re-Graft Patients                                    | 5 % ***                            | 16 % ***                                   | 66 % ***                                      |
| Previously transfused patients                       | 41 % ***                           | 50 % ***                                   | 76 % ***                                      |
| Number of Blood Transfusions                         | 3 ± 5 %                            | 4 ± 6 %                                    | 14 ± 21 %***                                  |
| FCXM+Patients(Highest Serum)                         | 18 %                               | 18 %                                       | 30 % *  |
| DR Mismatches/Patient                                | 0.5 ± 0.6                          | 0.5 ± 0.6                                  | 0.27 ± 0.45 **                                |
| A+B+DR Mismatches/Patient                            | 2.6 ± 1.2                          | 2.5 ± 1.2                                  | 1.6 ± 1.3 ***                                 |
| Cold Ischaemia Time (hours)                          | 20 ± 7                             | 20 ± 9                                     | 22 ± 9 ( NS )                                 |
| Delayed Graft Function                               | 31 %                               | 32 %                                       | 50 % *  |
| Induction Therapy                                    | 8 % ***                            | 15 % ***                                   | 48 % ***                                      |
| Rejection  | 43 %                               | 41 %                                       | 31 % ( NS )                                   |
| Rejection Episodes/Patient                           | 0.6 ± 0.7 *                        | 0.5 ± 0.6                                  | 0.3 ± 0.5 *                                   |
| Time to First Rejection (days)                       | 14 ± 14                            | 16 ± 16                                    | 22 ± 18 *                                     |
| Steroid-Resistant Rejection                          | 10 %                               | 11 %                                       | 6 % ( NS )                                    |
| Graft Survival                                       |                                    |  |   |
| 1 year   | 92 %                               | 92 %                                       | 88 % ( NS )                                   |
| 2 years  | 90 %                               | 91 %                                       | 85 % ( NS )                                   |
| 5 years  | 84 %                               | 88 %                                       | 80 % ( NS )                                   |
|  | <b>FCXM – / FCXM +</b>             | <b>FCXM – / FCXM +</b>                     | <b>FCXM – / FCXM +</b>                        |
| <b>N</b>   | <b>321 / 72</b>                    | <b>146 / 32</b>                            | <b>60 / 26</b>                                |
| <b>DR Mismatches/Patient</b>                         | 0.5 ± 0.6 / 0.4 ± 0.5<br>( NS )    | 0.5 ± 0.6 / 0.3 ± 0.5<br>( NS )            | 0.3 ± 0.5 / 0.1 ± 0.3<br>( <b>p = 0.01</b> )  |
| <b>A+B+DR Mismatches/Patient</b>                     | 2.6 ± 1.2 / 2.6 ± 1.1<br>( NS )    | 2.5 ± 1.3 / 2.5 ± 1.1<br>( NS )            | 1.9 ± 1.3 / 0.9 ± 1.0<br>( <b>p = 0.001</b> ) |
| <b>Induction Therapy</b>                             | 6 % / 20 %<br>( <b>p=0.0001</b> )  | 15 % / 16 %<br>( NS )                      | 42 % / 62 %<br>( NS )                         |
| <b>“Intense” Maintenance IMM</b>                     | 34 % / 44 %<br>( NS )              | 42 % / 50 %<br>( NS )                      | 33% / 58%<br>( <b>p=0.036</b> )               |
| <b>Graft Survival</b>                                |                                    |  |   |
| 1 year   | 91% vs. 94 %                       | 96 % vs. 75 %                              | 90 % vs. 84 %                                 |
| 2 years  | 89% vs. 89 %                       | 95 % vs. 75 %                              | 88 % vs. 79 %                                 |
| 5 years  | 85% vs. 81 %                       | 93 % vs. 67 %                              | 84 % vs. 71 %                                 |
| Proportional Hazard ( 95% CI )<br>Significance ( p ) | 1.1 ( 0.5 – 2.1 )<br>( p = 0.882 ) | 4.3 ( 1.8 – 10.1 )<br>( <b>p = 0.003</b> ) | 1.7 ( 0.6 – 4.7 )<br>( p = 0.274 )            |

(\*\*\*) p = 0.0001    (\*\*) p = 0.001    (\*) p = 0.02    (\*) p = 0.04    ( NS ) not significant  
 IgG-PRA = IgG-Panel reactive antibody    Tx = Transplant    IMM = Immunosuppression

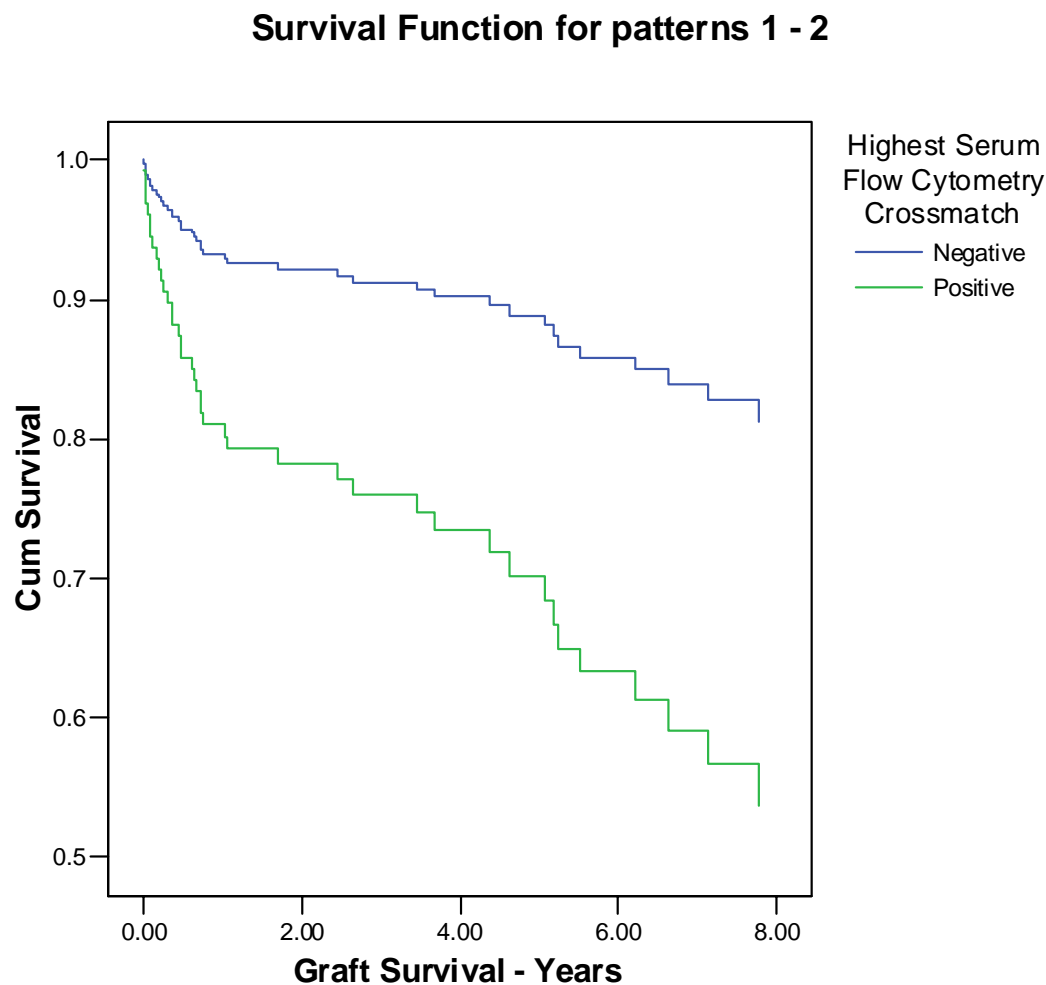
In Group 1, negative and positive FCXM recipients had equivalent number of DR or A+B+DR mismatches; they also had similar proportion of patients who

received "intense" maintenance immunosuppression; however, FCXM positive recipients in this group received significantly more induction therapy. Graft survival was not different for negative and positive FCXM patients in Group 1. Analysing only the patients who did not receive induction in Group 1 (n = 369), there was no difference on graft survival for negative or positive FCXM recipients at 1 year, 2 years and 5 years (91% vs. 95%; 89% vs. 88%; 84% vs. 82% ; p = 0.952).

In Group 2, the number of DR or A+B+DR mismatches, the proportion of patients who received "intense" maintenance immunosuppression and the proportion of patients who received induction therapy were not different for negative and positive FCXM recipients. In this group, graft survival was significantly lower for positive than for negative FCXM patients.

In Group 3, the number of DR and A+B+DR mismatches were significantly lower for positive than for negative FCXM recipients. In this group, positive FCXM patients had a greater proportion of cases receiving induction therapy, but this was not statistically significant; however, they received significantly more "intense" maintenance immunosuppression than negative FCXM recipients. Graft survival showed a trend to be lower for positive than for negative FCXM patients in Group 3, but this was not statistically significant.

Considering Group 2 and Group 3 recipients together, graft survival was significantly lower for positive than for negative FCXM patients (proportional hazard = 3.0 ; 95% CI: 1.6 – 5.7; p = 0.001 ). This is shown on Figure 2.



**Figure 2.** Graft survival for recipients with highest pré-transplant sensitization from 15 through 100%. Comparison between positive and negative flow cytometry crossmatch patients. Graft Survival for positive (n = 58) and negative (n = 206) FCXM recipients in Group 2 + Group 3 (Highest Pre - Transplant Sensitization from 15 through 100%). (Proportional Hazard = 3.0 ; 95 % CI : 1.6 – 5.7; p = 0.001).

The same variables which had had their influence on graft survival analysed, were studied again using the Cox Regression Proportional Hazard Model to evaluate their influence on patient survival. The best model was that one depicted on Table 8, which included the following variables: recipient age, recipient sex,

year of transplant, cold ischaemia time, DGF and maintenance immunosuppression intensity. From this group of variables, the statistically significant ones were: recipient age, year of transplant, cold ischaemia time, DGF and maintenance immunosuppression intensity.

**TABLE 8**  
**Influence of Several Variables on Patient Survival**  
**( Cox Regression Proportional Hazard Model )**

| <b>Variable</b>                      | <b>Proportional Hazard</b> | <b>95 % CI</b>       | <b>p</b>      |
|--------------------------------------|----------------------------|----------------------|---------------|
| <b>Recipient Age</b>                 | <b>1.05</b>                | <b>1.03 – 1.07</b>   | <b>0.0001</b> |
| Recipient Sex                        | 1.36                       | 0.86 – 2.14          | 0.191         |
| <b>Year of Transplant</b>            | <b>0.86</b>                | <b>0.77 – 0.96</b>   | <b>0.007</b>  |
| A+B+DR Mismatches                    | 1.15                       | 0.96 – 1.38          | 0.137         |
| <b>Highest Serum FCXM</b>            | 1.16                       | 0.59 – 2.25          | 0.660         |
| <b>Cold Ischaemia Time ( hours )</b> | <b>1.03</b>                | <b>1.003 – 1.056</b> | <b>0.031</b>  |
| <b>Delayed Graft Function</b>        | <b>1.62</b>                | <b>1.006 – 2.614</b> | <b>0.047</b>  |
| Maintenance IMM Intensity            | <b>1.95</b>                | <b>1.13 – 3.35</b>   | <b>0.016</b>  |

Patients: 657; Events: 79; Overall score for the model: Chi-Square = 54.571; p < 0.0001  
FCXM = Flow cytometry crossmatch IMM = Immunosuppression

In this way, the proportional hazard in relation to patient survival was 1.05 for each year recipients were older (95% CI: 1.03 - 1.07; p = 0.0001), 0.86 for each subsequent calendar year (95% CI : 0.77 – 0.96; p = 0.007), 1.03 for each hour the cold ischaemia time was longer (95% CI : 1.003 – 1.056; p = 0.031), 1.62 for the presence of DGF in relation to its absence (95% CI : 1.006 – 2.614; p = 0.047) and 1.95 for patients who received “intense” in relation to those who received “moderate” maintenance immunosuppression (95% CI: 1.13 – 3.35; p = 0.016).

## DISCUSSION

The finding that in our cohort a longer cold ischaemia time and the presence of delayed graft function had a statistically significant influence on graft survival keeps agreement with other studies (70, 71) and reinforces the clinical relevance of maximizing efforts to avoid prolonged ischaemia and to reduce the occurrence of DGF, in order to lessen their negative impact on kidney transplantation outcome.

Longer cold ischaemia periods and DGF have also displayed a statistically significant negative impact on patient survival, along with recipient age and use of "intense" maintenance immunosuppression; on the other hand, each subsequent calendar year within the period of eleven years of this study brought a progressively smaller risk for death.

The fact that stronger maintenance immunosuppression had a negative influence on patient survival emphasizes the importance of tailoring the immunosuppressive medications for each patient and adjusting type and dose of drugs according to immunologic and clinical factors, with the aim of achieving the best risk-benefit ratio for graft and patient survival, and exposing recipients just to the adequate and necessary level of immunosuppression.

The positive effect of each subsequent calendar year on patient survival probably reflects the overall result of many factors involved in patient care and the general continuous improvement in diagnostic and therapeutic resources.

The cases included in this study constitute a donor-recipient reasonably well matched cohort, with  $0.47 \pm 0.56$  DR and  $2.43 \pm 1.3$  A+B+DR mismatches / patient.

There was a statistically significant difference ( $p = 0.0001$ ) between flow cytometry crossmatch medium channel shift immunofluorescence for patients considered as displaying a positive or a negative result. However, the mean value

for positive recipients, which corresponded to  $14 \pm 12$  and  $17 \pm 12$ , respectively for current and highest serum, represented a value not very far away from the adopted cut-off of 10, which corresponds to the lower value adopted by other authors (50, 54, 57, 59, 63, 64). This suggests a rather modest level of pre-transplant anti-donor antibodies in patients regarded as bearing a positive pre-transplant FCXM in this study.

A highest serum positive FCXM had a statistically significant negative impact on graft survival; however, whether only results from current serum flow cytometry crossmatch were analysed, the impact of this variable on survival became not significant. This could be due to the fact that the number of positive FCXM patients was smaller considering current than highest serum; however, it also points out that probably the presence of these antibodies may not be the factor directly harmful to the graft, but their current or historic existence could indeed be a marker of a state of immunologic memory, as suggested by other researchers (58). Otherwise, this reinforces the importance of analyzing crossmatch results with the highest serum sample in addition to current serum, in order to not exclude patients for whom the knowledge of a positive result would be statistically significant and clinically meaningful.

Re-graft patients, though having higher sensitization and a greater proportion of DGF cases, displayed a smaller number of acute rejections/patient, a longer time until the first acute rejection and an equivalent graft survival in relation to first transplant patients. This suggests that, probably, their better DR and A+B+DR match and their larger proportion of patients receiving induction have influenced positively their outcome in relation to first transplant recipients.

Positive FCXM patients displayed higher levels of pre-transplant sensitization (current and highest) and a higher proportion of re-grafts; on the other hand, they were transplanted across a significantly lower number of DR mismatches and had a significantly greater proportion of patients who received induction therapy with monoclonal or polyclonal antibodies, and of patients who received higher intensity maintenance immunosuppression.



Other researchers (55-59) have reported on more frequent acute rejections for patients displaying a positive pre-transplant FCXM.

In our study, the proportion of patients displaying acute rejection, the number of rejection episodes / patient, the time from transplantation to the first rejection and the proportion of steroid-resistant rejections were not different for positive and negative FCXM patients; however, as positive FCXM recipients had a better DR match and a heavier immunosuppression, one can infer that these factors probably have positively influenced the above mentioned outcome parameters for this group, explaining why they did not display significantly more acute and steroid-resistant rejections; on the other hand, and despite a better DR match and a heavier immunosuppressive protocol, graft survival was significantly lower for positive than for negative FCXM recipients in our entire group of patients.

This fact suggests that, even without more acute clinically evident rejection episodes, this donor-reactive state may be responsible for more subtle medium and long-term effects on the transplanted kidney, which could contribute to the development of chronic allograft nephropathy (namely, chronic rejection) and a reduced graft survival.

Another point to be noticed is that our data has shown for the whole cohort a strong association between the occurrence of steroid-resistant rejection and the existence of DR mismatches; considering this, we could expectate that positive FCXM patients, who were transplanted across a smaller number of DR mismatches, could display less steroid-resistant rejections; on the contrary, despite this and despite the fact that they have received more induction therapy and a more intense maintenance immunosuppression, they developed more (though not significant statistically) steroid-resistant rejections (12% vs. 9%) than negative FCXM recipients. This suggests that patients displaying a highest serum positive flow cytometry crossmatch may be prone to more severe, steroid-resistant rejections, and we can just infer that this tendency probably was at least partially compensated in our patients by a better match and a heavier immunosuppression.

In order to analyse the possible impact of a positive flow cytometry crossmatch at different levels of pre-transplant sensitization, we have split our

cohort in Group 1 (highest pre-transplant sensitization from 0 through 14 %), Group 2 (highest pre-transplant sensitization from 15 through 50 %) and Group 3 (highest pre-transplant sensitization from 51 through 100 %).

Graft survival was not different for the three groups, and Group 3 displayed a smaller number of rejection episodes/patient and a longer time between transplantation and the first rejection; however, Group 3 patients have benefited from a significantly smaller number of DR and A+B+DR mismatches/patient and from a stronger immunosuppressive protocol through more induction therapy, in relation to the other two groups. This suggests that the allocation of better matched organs combined with more intense immunosuppression may be a very worthwhile way to improve transplant outcome for highly sensitized patients. This aspect is reinforced by the analysis of the highly sensitized recipients (highest pre-transplant sensitization 85-100%), who had a significantly smaller number of DR and A+B+DR mismatches/patient, more induction therapy and a graft survival that was not significantly different in relation to the less sensitized patients.

In Group 1, there was no difference on graft survival between positive and negative FCXM recipients, but positive FCXM patients received significantly more induction therapy than their negative FCXM counterparts. However, analysing only patients with no induction in this group, graft survival was not different for positive and negative FCXM recipients. This suggests that the low levels of anti-donor antibodies detected by flow cytometry crossmatch had no detrimental effect for these unsensitized or low-sensitized patients. As the number of DR or A+B+DR mismatches was the same for negative and positive recipients in this group, it seems reasonable to assume that this variable has not influenced favourably any of the two subsets in relation to the other one.

In Group 2, there was a significantly lower graft survival for positive than for negative FCXM patients. In this group, the number of DR or A+B+DR mismatches and the proportion of patients receiving induction therapy were not different for negative or positive FCXM recipients. These facts suggest that for medium sensitized recipients, considering similar HLA matches and immunosuppressive protocols, the presence of low levels of anti-donor antibodies detected by flow

cytometry crossmatch was associated with a lower graft survival; it is unknown if a better DR or A+B+DR match and/or a stronger immunosuppressive protocol would enable positive FCXM recipients of this group to achieve better graft survival, similar to negative FCXM patients.

In group 3, positive FCXM patients were transplanted across a significantly smaller number of DR and A+B+DR mismatches and had a significantly greater proportion of cases receiving "intense" maintenance immunosuppression in relation to negative FCXM recipients. Graft survival, though not significantly different, displayed a trend to be lower in positive than in negative FCXM patients. This suggests that in patients with highest pre-transplant sensitization between 51 and 100% in this cohort, the combined effect of a better HLA match and a stronger immunosuppression could, at least partially, offset the possible negative impact of low level anti-donor antibodies detected by a positive FCXM.

In this study, as the flow cytometry crossmatch was done using donor mixed T and B lymphocytes, it was not established what recipients specifically displayed reaction against T or B cells. However, as the presence of a positive FCXM had a statistically significant negative impact on graft survival, this suggests that the knowledge of the existence of these antibodies is clinically more meaningful and relevant than the definition of the target cells they are directed against. This aspect keeps agreement with other researchers, who, regardless of the antibodies were against T or B cells, have found more acute rejections (58) or lower graft survival (60) for positive flow cytometry crossmatch patients.

We concluded that the existence of low levels of anti-donor antibodies detected by a highest pre-transplant serum positive FCXM played a role as a marker of a specific donor-reactive state with a statistically significant negative impact on graft survival, in the cadaveric kidney transplant recipients of this cohort.

For unsensitized or low-sensitized patients, with highest pre-transplant sensitization from 0 through 14%, the presence of these low level antibodies was not detrimental for graft survival.

For patients with highest pre-transplant sensitization from 15% through 50%, graft survival was lower for positive than for negative FCXM recipients, with

equivalent DR and A+B+DR number of mismatches and immunosuppressive protocols for positive and negative FCXM patients.

For patients with highest pre-transplant sensitization from 51 through 100%, positive FCXM recipients, who received organs with better DR and A+B+DR matches and more intense immunosuppression, achieved graft survival which was not statistically different in relation to negative FCXM patients.

The above mentioned results suggest that a positive FCXM can have a statistically significant negative impact on graft survival for cadaver kidney recipients from reasonably low levels of sensitization (>14%), and that this effect becomes evident when there is no difference in relation to DR and A+B+DR mismatches and immunosuppression intensity for positive and negative FCXM patients.

However, in the group with sensitization from 51 through 100%, positive FCXM recipients received organs with a better DR and A+B+DR match and a heavier immunosuppression, and obtained graft survival with no significant difference in relation to that obtained by negative FCXM patients, suggesting that the negative impact of these antibodies could, at least partially, be offset by a better HLA matching and a more effective immunosuppression.

According to this, we could infer that, probably, the best approach would be to consider the FCXM result not as an isolated factor, but integrated with other factors, like the level of sensitization, the number of DR and A+B+DR mismatches and the immunosuppressive protocol.

In this way, our results suggest that the flow cytometry crossmatch may be a valuable tool included in the algorithm of organ allocation, in the comprehensive evaluation of each donor-recipient pair, and in the decision-making process of tailoring for each patient the best combination of immunosuppressive medications.

This study also has allowed us to conclude that even nowadays, with very effective drugs available for immunosuppression, HLA matching still plays a very important role for achieving better results. This was indicated by the strong association between steroid-resistant rejections and DR mismatches, and by the graft survival for re-graft cases and highly sensitized recipients, respectively

equivalent to first transplant cases and to low sensitized patients, presumably due to a better DR and A+B+DR matches, along with a heavier immunosuppressive protocol.

## REFERENCES

1. Morris PJ, Johnson RJ, Fuggle SV, Belger MA, Briggs JD. Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force of the Kidney Advisory Group of the United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA). *Lancet* 1999 ; 354: 1147-1152
2. Cecka JM. The UNOS Renal Transplant Registry. In: Cecka and Terasaki, ed. *Clinical Transplants*. UCLA Immunogenetics Center, Los Angeles, CA 2001: 1-18.
3. Claas FH, van Leeuwen A, van Rood JJ. Hyperimmunized patients do not need to wait for an HLA identical donor. *Tissue Antigens* 1989; 34: 23-29.
4. Claas FH, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis II. The acceptable mismatch program as a fast tool for highly sensitized patients awaiting a cadaveric kidney transplantation: short waiting time and excellent graft outcome. *Transplantation* 2004 ; 78: 190-193.
5. Fuggle SV, Belger MA, Johnson RJ, Ray TC, Morris PJ. A new national allocation scheme for adult kidneys in the United Kingdom. *United Kingdom*

Transplant Support Service Authority (UKTSSA) Users' Kidney Advisory Group and its Task Forces. *Clin Transpl* 1998; 12: 107-113.

6. Johnson RJ, Belger MA, Briggs JD, Fuggle SV, Morris PJ; UK Transplant Kidney and Pancreas Advisory Group. Renal transplantation in the UK and Republic of Ireland. *Clin Transpl* 2000; 14: 105-113.

7. Fuggle SV, Johnson RJ, Rudge CJ, Forsythe JL. Human leukocyte antigen and the allocation of kidneys from cadaver donors in the United Kingdom. *Transplantation* 2004;77: 618-620.

8. Fuggle SV, Martin S. Toward performing transplantation in highly sensitized patients. *Transplantation*. 2004; 78: 186-189.

9. Duquesnoy RJ. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. *Hum Immunol* 2002 ; 63: 339-352.

10. Duquesnoy RJ, Takemoto S, de Lange P, Doxiadis II, Schreuder GM, Persijn GG, Claas FH. HLAmatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. III. Effect of matching at the HLA-A,B amino acid triplet level on kidney transplant survival. *Transplantation* 2003; 75: 884-889.

11. Somitran-Holgersson SS, Wilczek HE, Holgersson J, Soderstrom K. Identification of the nonclassical HLA molecules, MICA, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation* 2002; 74: 269-277.

12. Quiroga I, Sweeney D, Sutton PM, Chapple SD, Souto-Grando JP, Barnardo MC, Fuggle SV. Identification of a novel MICA allele: MICA\*051. *Tissue Antigens* 2004; 63: 466-469.

13. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713-723.

14. Braun WE. Renal transplantation: basic concepts and evolution of therapy. *Clin Apheresis* 2003; 18: 141-152.

15. Michaels PJ, Fishbein MC, Colvin RB. Humoral rejection of human organ transplants. *Springer Semin Immunopatho* 2003;25:119-140.

16. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 242-249.

17. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmuller G, Land W, Albert E. Department of Internal Medicine, Klinikum Innenstadt; Institute of Immunology, Munich, Germany. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int.* 1993 ; 43: 1333-1338.

18. Racusen LC, Colvin RB, Solez K et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant.* 2003 ; 3: 708-714.

19. Koo DD, Roberts IS, Quiroga I, Procter J, Barnardo MC, Sutton M, Cerundolo L, Davies DR, Friend PJ, Morris PJ, Fuggle SV. C4d deposition in early renal allograft protocol biopsies. *Transplantation* 2004; 78: 398-403.

20. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection (CR) by C4d deposits in peritubular capillaries (PTC). *J Am Soc Nephrol* 2001 ; 12: 574-582.

21. Regele H, Bohmig GA, Habicht A et al. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2002 ; 13: 2371-2380.

22. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting Kidney Graft Failure by HLA Antibodies: a Prospective Trial. *Am J Transplant* 2004; 4: 438-443.

23. Lucas DP, Paparounis ML, Myers L, Hart JM, Zachary AA. Detection of HLA class I-specific antibodies by the QuikScreen enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997 ; 4 : 252-257.

24. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 2000; 69: 319-326.

25. Piazza A, Borrelli L, Monaco PI, Poggi E, Pisani E, Valeri M, Fraboni D, Servetti S, Casciani CU, Adorno D. Posttransplant donor-specific antibody characterization and kidney graft survival. *Transplant Int* 2000; 13: 439-443.

26. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RWG. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 2003; 75: 1034-1040.

27. Kissmayer-Nielsen F, Olsen F, Peterson V, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966; 2: 662-665.



28. Williams GM, Hume DM, Hudson RP, Morris PJ, Kano K, Milgrom F. "Hyperacute" renal homograft rejection in man. *N Engl J Med* 1968; 279: 611-618.

29. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280: 735-739.

30. Amos DB, Bashir H, Boyle W, MacQueen M, Tiilikainen A. A simple microtoxicity test. *Transplantation* 1970; 7: 220-223.

31. Johnson AH, Rossen RD, Butler WT. Detection of alloantibodies using a microcytotoxicity test: identification of low levels of preformed antibodies in accelerated allograft rejection. *Tissue Antigens* 1972; 2: 215-226.

32. Cross DE, Whittier FC, Weaver P, Foxworth J. A comparison of the antiglobulin versus extended incubation time crossmatch results in 223 renal transplants. *Transplant Proc* 1977; 9: 1803-1806.

33. Fuller TC, Cosimi AB, Russell PS. Use of an antiglobulin-ATG reagent for detection of low levels of alloantibody-improvement of allograft survival in presensitized recipients. *Transplant Proc* 1978; 10: 463-466.

34. Gebel HM, Oldfather JW, Karr RW, Rodey GE. Antibodies directed against HLA-DR gene products exhibit the CYNAP phenomenon. *Tissue Antigens* 1984; 23: 135-140.

35. Kerman RH, Kimball PM, Van Buren CT, Lewis RM, DeVera V, Baghdasarian V, Heydari A, Kahan BD . AHG and DTE/AHG procedure identification of cross-match-appropriate donor-recipient pairings that result in improved graft survival. *Transplantation* 1991; 51: 316-320.

36. Fuller TC, Fuller AA, Golden M, Rodey GE. HLA alloantibodies and the mechanism of the antiglobulin-augmented lymphocytotoxicity procedure. *Hum Immunol* 1997; 56: 94-105.

37. Chapman JR, Taylor CJ, Ting A, Morris PJ. Immunoglobulin class and specificity of antibodies causing positive T cell crossmatches. Relationship to renal transplant outcome. *Transplantation* 1986; 42: 608-613.

38. Tellis VA, Matas AJ, Senitzer D, Louis P, Glicklich D, Soberman R, Veith FJ. Successful transplantation after conversion of a positive crossmatch to negative by dissociation of IgM antibody. *Transplantation* 1989; 47 : 127-129.

39. Garovoy MR, Rheinschmidt MA, Bigos M, Perkins H, Colombe B, Feduska N, Salvatierra O. Flow cytometry analysis: a high technology crossmatch technique facilitating transplantation. *Transplant Proc* 1983; 15: 1939-1944.

40. Chapman JR, Deierhoi MH, Carter NP. Analysis of flow cytometry and cytotoxicity crossmatches in renal transplantation. *Transplant Proc* 1985; 17: 2480-2481.

41. Talbot D, Givan AL, Shenton BK, Stratton A, Proud G, Taylor RM. Rapid detection of low levels of donor specific IgG by flow cytometry with single and dual colour fluorescence in renal transplantation. *J Immunol Methods* 1988; 112: 279 -283.

42. Bray RA, Lebeck LK, Gebel HM. The flow cytometric crossmatch: dual color analysis of T cell and B cell reactivities. *Transplantation* 1989; 48: 834-840.

43. Scornik JC, LeFor WM, Cicciarelli JC, Brunson ME, Bogaard T, Howard RJ, Ackermann JRW, Mendez R, Shires DL, Pfaff WW. Hyperacute and acute kidney graft rejection due to antibodies against B cells. *Transplantation* 1992; 54: 61-64.

44. Karuppan SS, Ohlman S, Moller E. The occurrence of cytotoxic and non-complement-fixing antibodies in the crossmatch serum of patients with early acute rejection episodes. *Transplantation* 1992; 54: 839-843.

45. Talbot D, Cavanagh G, Coates E, Givan AL, Shenton BK, Lennard TWJ, Proud G, Taylor RMR. Improved graft outcome and reduced complications due to flow cytometric crossmatching and DR matching in renal transplantation. *Transplantation* 1992; 53: 925-928.

46. Scornik JC, Brunson ME, Schaub B, Howard RJ, Pfaff WW. The crossmatch in renal transplantation. *Transplantation* 1994; 57: 621-625.

47. Lazda VA. Identification of patients at risk for inferior renal allograft outcome by a strongly positive B cell flow cytometry crossmatch. *Transplantation* 1994; 57: 964-969.

48. Cook DJ. Role of antibodies pretransplantation and posttransplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2002; 7: 157-160.

49. Bryan CF, Baier KA, Nelson PW, Luger AM, Martinez J, Pierce GE, Ross G, Shield CF III, Warady BA, Aeder MI, Helling TS, Muruve N. Long-term graft survival is improved in cadaveric renal retransplantation by flow cytometric crossmatching. *Transplantation* 1998; 66: 1827-1832.

50. Ogura K, Terasaki PI, Johnson C, Mendez R, Rosenthal JT, Ettenger R, Martin DC, Dainko E, Cohen L, Mackett T, Berne T, Barba L, Lieberman E. The

significance of a positive flow cytometry crossmatch test in primary kidney transplantation. *Transplantation* 1993; 56: 294-298.

51. Karpinski M, Rush D, Jeffery J, Exner M, Regele H, Dancea S, Pochinco D, Birk P, Nickerson P. Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2807-2814.

52. Mahoney RJ, Norman DJ, Colombe BW, Garovoy MR, Leeber DA. Identification of high- and low-risk second kidney grafts. *Transplantation* 1996; 61: 1349-1355.

53. Thistlethwaite JR, Buckingham M, Stuart JK, Gaber AO, Mayes JT, Stuart FP. T cell immunofluorescence flow cytometry cross-match results in cadaver donor renal transplantation. *Transplant Proc* 1987; 19:722-724.

54. Mahoney RJ, Ault KA, Given SR, Adams RJ, Breggia AC, Paris PA, Palomaki GE, Hitchcox SA, White BW, Himmelfarb J, Leeber DA. The flow cytometric crossmatch and early renal transplant loss. *Transplantation* 1990; 49: 527-535.

55. Talbot D, Givan AL, Shenton BK, Stratton A, Proud G, Taylor RMR. The relevance of a more sensitive crossmatch assay to renal transplantation. *Transplantation* 1989; 47: 552-555.

56. Karuppan SS, Lindholm A, Möller E. Fewer acute rejection episodes and improved outcome in kidney-transplanted patients with selection criteria based on crossmatching. *Transplantation* 1992; 53: 666-673.

57. Kimball P, Rhodes C, King A, Fisher R, Ham J, Posner M. Flow cross-matching identifies patients at risk for postoperative elaboration of cytotoxic antibodies. *Transplantation* 1998; 65: 444-446.

58. Scornik JC, Clapp W, Patton PR, VanDerWerf WJ, Hemming AW, Reed AI, Howard RJ. Outcome of kidney transplants in patients known to be flow cytometry crossmatch positive. *Transplantation* 2001; 71: 1098-1102.

59. O'Rourke RW, Osorio RW, Freise CE, Lou CD, Garovoy MR, Bacchetti P, Ascher NL, Melzer JS, Roberts JP, Stock PG. Flow cytometry crossmatching as a predictor of acute rejection in sensitized recipients of cadaveric renal transplants. *Clin Transplant* 2000;14:167-173.

60. Cho YW, Cecka JM. Crossmatch tests – an analysis of UNOS data from 1991-2000. In: Cecka and Terasaki, ed. *Clinical Transplants*. UCLA Immunogenetics Center, Los Angeles, CA 2001: 237-246.

61. El Fettouh HA, Cook DJ, Bishay E, Flechner S, Goldfarb D, Modlin C, Dennis V, Novick AC. Association between a positive flow cytometry crossmatch and the development of chronic rejection in primary renal transplantation. *Urology* 2000; 56: 369-372.

62. Van Der Nast BJ, Besouw NM, Witvliet MD, Kuiper PD, Gregoor PS, Van Gelder T, Weimar W, Claas HJ. Formation of donor-specific human leukocyte antigen antibodies after kidney transplantation: correlation with acute rejection and tapering of immunosuppression. *Transplantation* 2003; 75: 871-877.

63. Pelletier RP, Orosz CG, Adams PW, Bumgardner GL, Davies EA, Elkhammas EA, Henry ML, Ferguson RM. Clinical and economic impact of flow cytometry crossmatching in primary cadaveric kidney and simultaneous pancreas-kidney transplant recipients. *Transplantation* 1997; 63: 1639-1645.

64. Kerman RH, Susskind B, Buyse I, Pryzbylowski P, Ruth J, Warnell S, Gruber SA, Katz S, Van Buren CT, Kahan BD. Flow cytometry-detected IgG is not a contraindication to renal transplantation. IgM may be beneficial to outcome. *Transplantation* 1999; 68: 1855-1858.

65. Christiaans MH, Overhof R, Ten Haaf A, Nieman F, Van Hooff JP, Van Den Berg-Loonen EM. No advantage of flow cytometry crossmatch over complement-dependent cytotoxicity in immunologically well-documented renal allograft recipients. *Transplantation* 1996; 62: 1341-1347.

66. Ut zig MJ, Blumke M, Wolff-Vorbeck G, Lang H, Kirste G. Flow cytometry cross-match: a method for predicting graft rejection. *Transplantation* 1997; 63: 551-554.

67. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant* 2003; 3: 1488-1500.

68. Roodnat JI, Mulder PGH, Tielens ETH, Van Riemsdijk IC, Van Gelder T, Weimar W. The Cox Proportional Hazards Analysis in words: examples in the renal transplantation field. *Transplantation* 2004; 77: 483-488.

69. Sutton PM, Harmer AH, A.M. B, Welsh KI. The flow cytometric detection of alloantibodies in screening for renal transplantation. *Transplant Int* 1995; 8: 360-365.

70. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmodder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63: 968-974.

71. McLaren AJ, Jassem W, Gray DW, Fuggle SV, Welsh KI, Morris PJ. Delayed graft function: risk factors and the relative effects of early function and acute rejection on long-term survival in cadaveric renal transplantation. *Clin Transplant* 1999; 13: 266-272.