

## IMUNOLOGIA DO TRANSPLANTE PULMONAR: SISTEMA HLA E TÉCNICAS DE PROVA CRUZADA - UMA REVISÃO DETALHADA PARA PNEUMOLOGISTAS

### *IMMUNOLOGY OF LUNG TRANSPLANTATION: HLA SYSTEM AND CROSSMATCH TECHNIQUES - A DETAILED REVIEW FOR PULMONOLOGISTS*



**Dennys William Frota Siqueira**

**Jadilson Paulo Oliveira Pereira Jr, Alvaro Luiz Steiner de Fernandes Sousa, Filipe Kruger, Sara Guimarães Figueiredo, Jessica Mattos Miari, Giovanna Coutinho da Silva Gamma, Pedro Tulio Rocha**

Hospital São Lucas Copacabana, Rio de Janeiro

E-mail: [pedrotulio@hotmail.com](mailto:pedrotulio@hotmail.com)

#### **Resumo**

O transplante pulmonar, embora essencial para pacientes com doenças respiratórias avançadas, apresenta desafios imunológicos significativos. A compatibilidade entre doador e receptor, mediada pelo sistema HLA, é crucial. Esta revisão visa apresentar aos pneumologistas o sistema HLA e as provas cruzadas pré-transplante, essenciais na tomada de decisão clínica. O sistema HLA (MHC humano) e suas classes (I e II) são apresentados, detalhando sua função na imunidade celular e humoral, respectivamente. As técnicas de prova cruzada (CDC, FCXM, Luminex) são descritas, enfatizando suas indicações, limitações e vantagens. A sensibilização no transplante pulmonar, incluindo o papel dos anticorpos doadores específicos (DSA), é discutida, juntamente com as estratégias de dessensibilização. O conhecimento abrangente do sistema HLA e das técnicas de prova cruzada é fundamental para otimizar a compatibilidade doador-receptor, prevenir a rejeição e melhorar a sobrevida no transplante pulmonar. A integração entre o conhecimento imunológico e a decisão clínica é essencial para o sucesso desta terapia complexa.

**Palavras-chave:** Imunologia dos transplantes, imunologia no transplante pulmonar, sistema HLA e transplante, prova cruzada no transplante de órgãos.

#### **Abstract**

Lung transplantation, although essential for patients with advanced respiratory diseases, presents significant immunological challenges. Donor-recipient compatibility, mediated by the HLA system, is crucial. This review aims to present pulmonologists with the HLA system and pre-transplant crossmatch tests, which are essential for clinical decision-making. The HLA system (human MHC) and its classes (I and II) are presented, detailing their role in cellular and humoral immunity, respectively. Crossmatch techniques (CDC, FCXM, Luminex) are described, emphasizing their indications, limitations, and advantages. Sensitization in lung transplantation, including the role of donor-specific antibodies (DSA), is discussed, alongside desensitization strategies. Comprehensive knowledge of the HLA system and crossmatch techniques is fundamental to optimizing donor-recipient compatibility,

preventing rejection, and improving survival in lung transplantation. The integration of immunological knowledge and clinical decision-making is essential for the success of this complex therapy.

**Key words:** Transplant immunology, lung transplant immunology, HLA system and transplantation, crossmatch and organ transplantation.



## Introdução

O transplante pulmonar, apesar de ser uma intervenção salvadora para muitos pacientes com doenças respiratórias avançadas<sup>1</sup>, apresenta desafios imunológicos significativos. A complexidade da resposta imune, mediada principalmente pelo sistema HLA (Antígeno Leucocitário Humano), exige uma compreensão aprofundada para otimizar a compatibilidade do doador e do receptor, planejamento da imunossupressão, minimizar o risco de rejeição e, conseqüentemente, melhorar a sobrevida do enxerto<sup>2</sup>. A avaliação pré-transplante, com ênfase nas técnicas de prova cruzada, desempenha um papel crucial nesse processo. Este artigo de revisão visa fornecer aos pneumologistas uma introdução ao sistema HLA e das diferentes técnicas de prova cruzada, abordando nuances importantes para a tomada de decisão clínica.

## O Sistema HLA

O sistema HLA, também conhecido como Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) em humanos, é um conjunto de genes densamente agrupados no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3). Essa região altamente polimórfica codifica proteínas essenciais para a apresentação de antígenos às células do sistema imune, desencadeando respostas adaptativas. O sistema HLA é dividido em três classes principais: Classe I, Classe II e Classe III. No contexto do transplante, as classes I e II são as mais relevantes devido ao seu papel direto na ativação da resposta imune.

As moléculas HLA de classe I (HLA-A, -B e -C) são expressas em quase todas as células nucleadas do organismo, embora a densidade de expressão possa variar entre diferentes tipos celulares. Elas desempenham um papel crucial na imunidade celular, apresentando peptídeos derivados do interior da célula (por exemplo, peptídeos virais ou tumorais) às células T CD8+ citotóxicas. Essas células T, ao reconhecerem o complexo peptídeo-HLA de classe I como "não-próprio", são ativadas para destruir a célula alvo.

No transplante, a incompatibilidade HLA de classe I entre o doador e o receptor pode levar à ativação direta das células T CD8+ do receptor contra as células do enxerto, resultando em rejeição celular<sup>3</sup>. Além disso, anticorpos direcionados contra moléculas HLA de classe I do doador (Anticorpos Doadores-Específicos ou DSA) podem mediar a rejeição humoral,

ativando o sistema complemento e danificando diretamente o enxerto podendo levar à pneumonite obliterante<sup>4</sup>.

Já as moléculas HLA de classe II (HLA-DR, -DP e -DQ) têm uma expressão mais restrita, sendo encontradas principalmente em células apresentadoras de antígeno (APCs), como células dendríticas, macrófagos, linfócitos B e células epiteliais do timo. Outra diferença frente às moléculas Classe I é o seu polimorfismo, por terem uma cadeia alfa e uma beta nosítio ligador de antígenos, enquanto as moléculas Classe I são constituídas apenas por cadeia alfa. As moléculas HLA de classe II apresentam peptídeos derivados do ambiente extracelular às células T CD4<sup>+</sup> auxiliares. Essas células T, ao reconhecerem o complexo peptídeo-HLA de classe II como "não-próprio", são ativadas para coordenar a resposta imune, auxiliando na ativação de outras células do sistema imune, como linfócitos B (produção de anticorpos) e macrófagos.

No transplante, a incompatibilidade HLA de classe II pode levar à ativação das células T CD4<sup>+</sup> do receptor, desencadeando uma resposta imune coordenada contra o enxerto<sup>3</sup>. Além disso, anticorpos direcionados contra moléculas HLA de classe II do doador (DSA) também podem mediar a rejeição humoral. Embora a rejeição mediada por anticorpos anti-HLA de classe II tenha sido tradicionalmente considerada menos agressiva do que a mediada por anticorpos anti-HLA de classe I, evidências recentes sugerem que esses anticorpos também podem ter um impacto significativo na sobrevida do enxerto a longo prazo<sup>4</sup>.

### **Técnicas de Prova Cruzada:**

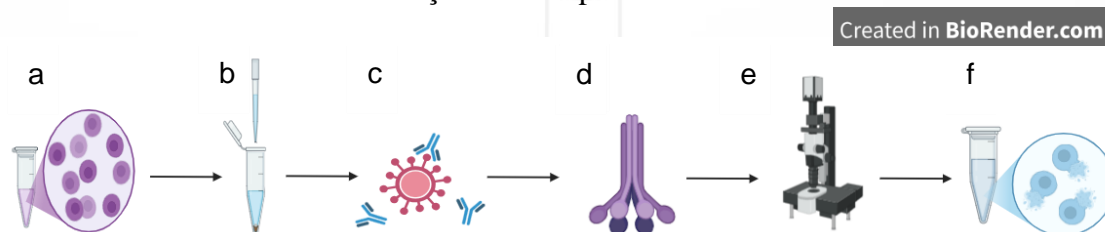
As técnicas de prova cruzada são testes laboratoriais essenciais realizados antes do transplante para detectar a presença de anticorpos pré-formados no soro do receptor que sejam reativos contra as células do doador. Essas técnicas ajudam a prever o risco de rejeição hiperaguda e aguda mediada por anticorpos.

#### **1) Prova Cruzada Citotóxica Dependente de Complemento (CDC)**

A prova cruzada por CDC é o método tradicional para detectar anticorpos anti-HLA, desenvolvido no final da década de 60<sup>5</sup>. O soro do receptor é incubado com linfócitos do doador (separados em células T e B), seguido da adição de complemento (geralmente soro de coelho). Se houver anticorpos anti-HLA no soro do receptor que se liguem às células do doador, o complemento é ativado, levando à lise celular. A lise celular é visualizada



microscopicamente e quantificada (Figura 1). Um resultado positivo indica a presença de anticorpos anti-HLA que podem causar rejeição hiperaguda ou aguda mediada por anticorpos, e é considerado uma contraindicação ao transplante.



**Figura 1** - Prova Cruzada por Citotoxicidade (CDC): Isolamento de linfócitos viáveis do doador (a); Adição do soro do receptor (b); Anticorpos anti-HLA do receptor se ligam à antígenos HLA do doador (c); Adição de complemento que se liga ao anticorpo anti-HLA do receptor e forma o complexo de ataque à membrana (d); Visualização dos linfócitos do doador em microscópio (e); Detecção de lise celular do linfócito do doador – prova cruzada por CDC positiva (f)

Embora tenham sido fundamentais na era inicial dos transplantes, algumas limitações do teste são observadas e diminuem sua sensibilidade e especificidade. Falsos positivos podem ocorrer devido a autoanticorpos (geralmente IgM e visto em pacientes com doenças auto-imunes), anticorpos não-HLA ou problemas técnicos na conservação do linfócito do doador. Já falsos negativos podem ser secundários a não detecção de anticorpos de baixa afinidade ou presentes em baixos títulos, além de também depender da viabilidade celular:

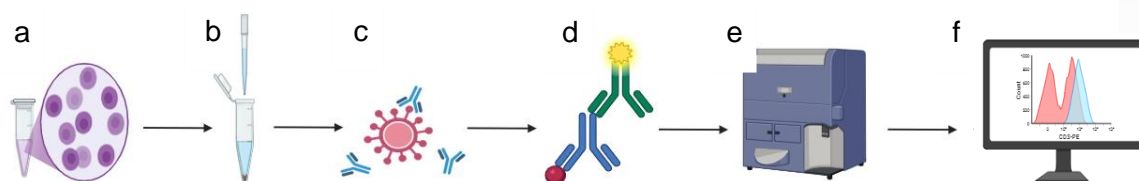
Para suprir estas limitações, algumas adições ao teste foram criadas:

- a) Adição de Ditionotritol (DTT): O DTT é um agente redutor que quebra as pontes dissulfeto nas moléculas de IgM, eliminando os resultados falso-positivos causados por autoanticorpos IgM.
- b) Prova Cruzada com Anti-Globulina Humana (AGH): A AGH aumenta a sensibilidade da prova cruzada, por se ligar a fração Fc do anticorpo anti-HLA, facilitando a ligação do complemento à estes.

## 2) Prova Cruzada por Citometria de Fluxo (FCXM)

A prova cruzada por citometria de fluxo (FCXM) é uma técnica mais sensível do que a prova cruzada CDC<sup>6</sup>. O soro do receptor é incubado com linfócitos do doador, seguido da adição de anticorpos fluorescentes que se ligam a fração fixa de anticorpos humanos (anti-Fc-IgG). A citometria de fluxo é utilizada para detectar a ligação dos anticorpos fluorescentes aos linfócitos do doador. A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de anticorpos anti-HLA ligados às células do doador. (Figura 2)

Created in BioRender.com



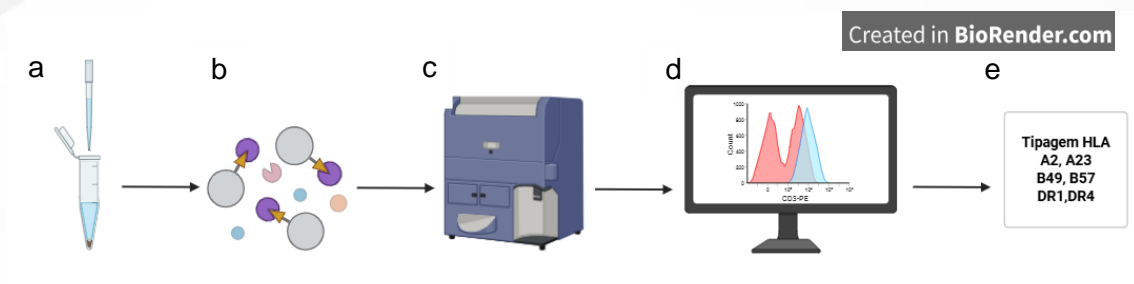
**Figura 2** - Prova Cruzada por Citometria de Fluxo: Isolamento de linfócitos viáveis do doador (a); Adição do soro do receptor (b); Anticorpos anti-HLA do receptor se ligam à antígenos HLA do doador (c); Adição de Anticorpo anti IgG-Fc com fluoresceína (d); Passagem pelo citômetro de fluxo (e); Detecção de fluoresceína do anti-IgG Fc ligado ao linfócito do doador – prova cruzada por citometria de fluxo positiva (f)

Como dito, a prova cruzada por citometria de fluxo apresenta maior sensibilidade quando comparada à prova cruzada por CDC, por detecta anticorpos de baixa afinidade ou presentes em baixos títulos, que podem não ser detectados pela prova cruzada CDC.

Porém este ganho de sensibilidade pode levar à não utilização de alguns doadores que teriam êxito no transplante, por detectar anticorpos não fixadores de complemento e anticorpos em títulos muito baixos incapazes de levar à rejeição hiperaguda. Por este motivo, é importante observar a intensidade da reação fluoresceínica (MFI – Mean Fluorescence Index) e estabelecer um ponto de corte para considerar um teste positivo – que habitualmente se fixa em 1500.

### 3) Prova Cruzada Virtual (Luminex)

A prova cruzada virtual (Luminex) é uma técnica que utiliza microesferas (beads) revestidas com moléculas HLA específicas. O soro do receptor é incubado com as microesferas, e a ligação de anticorpos anti-HLA às microesferas é detectada por citometria de fluxo. Essa técnica permite a identificação de anticorpos contra HLA específicos e a quantificação da intensidade da ligação, que depois devem ser confrontados com a tipagem HLA do doador, visando a detecção de anticorpos anti-HLA DSA<sup>7</sup>. Esta prova cruzada recebe este nome por dispensar a necessidade de linfócitos do doador e ser totalmente automatizada. (Figura 3). Semelhante à prova cruzada por citometria de fluxo, existe a possibilidade de detecção de anticorpos que não levariam à rejeição do órgão, e por isso é estabelecido também um ponto de corte que também costuma ser de 1500 MFI.



**Figura 3** - Prova Cruzada Virtual: Uso do soro do receptor (a); Adição de beads contendo antígenos HLA específicos com diferentes fluorescências que sofrem ligação dos anticorpos anti-HLA do receptor (b) Passagem pelo citômetro de fluxo (c); Detecção de fluorescência de diferentes beads sinalizando a presença de anticorpos anti-HLA específicos presentes no soro do receptor e sua intensidade em MFI (d) Obtenção de tipagem HLA do doador e confronto para checar se há anticorpos anti-HLA DSA – prova cruzada virtual positiva (e).

Esta é hoje tida como a técnica que leva à maior sensibilidade e especificidade, além de uma grande vantagem logística, ganhando agilidade no resultado, algo particularmente importante em transplante pulmonar. Porém a legislação brasileira atual impede a alocação de órgãos sem uma prova cruzada por CDC ou citometria de fluxo, algo que deve ser revisto na próxima revisão do regulamento técnico do Sistema Nacional de Transplantes. Outras barreiras para sua mais ampla utilização são o custo mais elevado e a necessidade de tipagem HLA completa em alta resolução do doador (locus A, B, C, DR, DP, DQ), que não é uma prática rotineira em todos os estados.

De uma forma geral, as técnicas de prova cruzada devem ser vistas como complementares e não excludentes, e a interpretação de seus resultados deve ser realizada de forma integrada, levando em consideração as limitações e vantagens de cada uma, bem como outras informações clínicas e imunológicas do receptor.

### Sensibilização em Transplante Pulmonar

Pacientes com níveis elevados de anticorpos anti-HLA são considerados 'sensibilizados' e, por isso, apresentam maiores dificuldades para encontrar um doador compatível. Além disso, mesmo quando um órgão é ofertado, a presença de anticorpos doadores específicos (DSA) pode desencadear rejeição hiperaguda ou uma rejeição humoral mais insidiosa, culminando em perda precoce ou disfunção crônica do enxerto. O grau de

sensibilização é comumente quantificado por meio do cPRA (Calculated Panel Reactive Antibodies), que expressa a porcentagem de doadores da população que seriam incompatíveis com aquele receptor, e a maioria dos autores considera um paciente sensibilizado aquele que tem um cPRA > 30% e como hipersensibilizados aqueles com cPRA > 80%.

Para lidar com esse desafio, foram desenvolvidas estratégias de dessensibilização, cujo objetivo é reduzir os títulos de anticorpos circulantes e permitir um transplante mais seguro. Estas estratégias não são padronizadas internacionalmente e envolvem diferentes combinações de técnicas laboratoriais, agentes imunomoduladores e cronogramas terapêuticos.

A indicação para dessensibilização depende da disponibilidade de doadores, da gravidade da condição clínica do paciente e da urgência do transplante. Pacientes em oxigenação extracorpórea (ECMO) ou ventilação mecânica prolongada são frequentemente considerados prioritários, mesmo quando sensibilizados. Nesses casos, os protocolos de dessensibilização tornam-se ferramentas para viabilizar o transplante em tempo hábil.

Os mecanismos fisiopatológicos da rejeição humoral envolvem a ligação dos anticorpos aos antígenos do enxerto, ativação do complemento e subsequente dano tecidual. A dessensibilização busca interromper esse processo, seja por remoção física dos anticorpos (como a plasmaférese-PLEX), a neutralização de anticorpos (com imunoglobulina humana – IVIG) e por bloqueio da produção ou função dos linfócitos B e plasmócitos, responsáveis por sua síntese (com rituximabe, daratumumabe e bortezomib por exemplo), que podem ser feitos previamente ao transplante quando o paciente está listado ou iniciando no momento do transplante. Abaixo citamos alguns protocolos descritos na literatura:

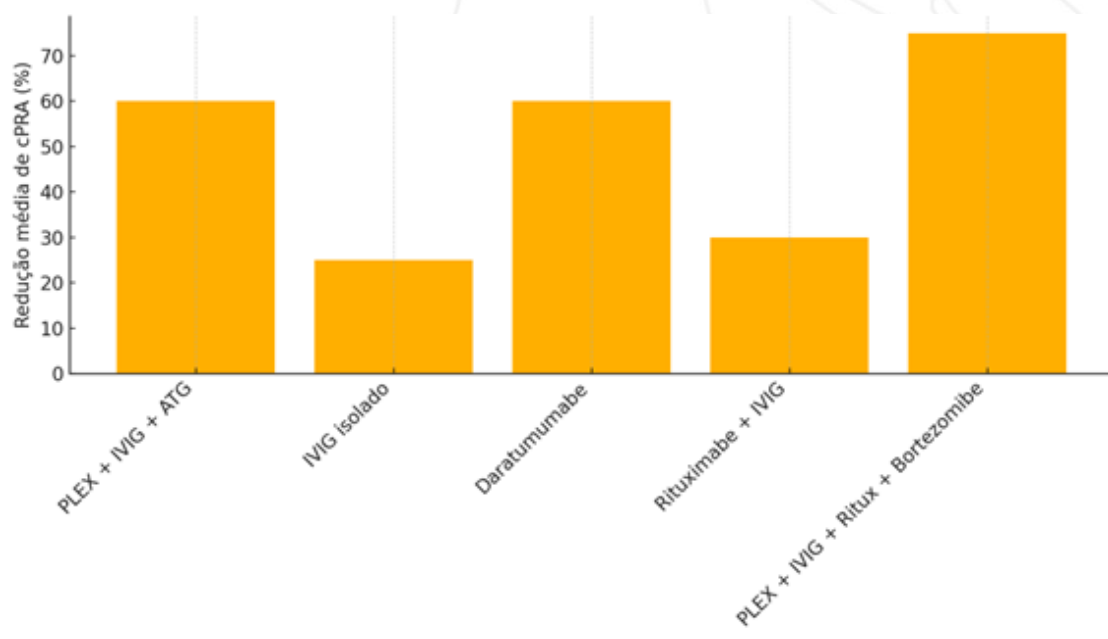
- I. O protocolo desenvolvido pela Universidade de Toronto, descrito por Aversa et al.<sup>9</sup>, exemplifica bem essa abordagem combinada. Pacientes com DSA positivos iniciam PLEX no intraoperatório, com mais cinco sessões seguidas por IVIG e ATG (globulina antitímócitos). A taxa de sobrevida em 10 anos foi semelhante à de pacientes não sensibilizados<sup>10</sup>. Isso reforça que, quando aplicados adequadamente, os protocolos de dessensibilização não comprometem os resultados de longo prazo.
- II. Goldsby et al.<sup>11</sup> estudaram o uso exclusivo de IVIG previamente ao transplante em pacientes com cPRA moderado, observando tendência à menor formação de DSA de novo e boa tolerabilidade. Este tipo de regime pode ser mais viável em pacientes com contraindicações à imunossupressão intensa ou risco infeccioso elevado.



- III. Casos mais complexos, com múltiplos DSA e alto cPRA, podem requerer terapias mais agressivas. Nicholas et al.<sup>12</sup> demonstraram a eficácia do daratumumabe previamente ao transplante em pacientes pediátricos, com queda expressiva do cPRA e perfil de segurança aceitável. Apesar de ainda pouco difundido, o uso de daratumumabe é promissor para situações refratárias.
- IV. Em complemento, estudos como o de Pinelli et al.<sup>13</sup> mostraram que, em alguns pacientes, a associação de até quatro agentes (PLEX, IVIG, rituximabe e bortezomibe) também previamente ao transplante resultou em redução sustentada de anticorpos. Contudo, a eficácia do protocolo depende fortemente do tempo entre o término da dessensibilização e a realização do transplante, como discutido a seguir.

A janela de oportunidade é curta. Estudos mostram que a eficácia da dessensibilização pode ser perdida em poucas semanas caso o transplante não seja realizado, devido ao chamado 'rebote de anticorpos'. Segundo Pinelli et al.<sup>13</sup>, pacientes transplantados em até 15 dias após o fim do protocolo mantiveram níveis reduzidos de DSA. Já aqueles que aguardaram mais de três semanas apresentaram retorno dos níveis pré-tratamento.

Essa constatação tem implicações práticas importantes. Pacientes dessensibilizados devem ser priorizados nas listas de alocação, e a equipe de transplante deve planejar ativamente a logística do procedimento. Em alguns centros, realiza-se crossmatch virtual contínuo para agilizar a identificação de doadores compatíveis nesse período crítico. A figura 4 mostra a eficácia de diferentes protocolos em redução do cPRA.



A imunossupressão mais intensa inerente à maioria dos protocolos de dessensibilização traz consigo riscos infecciosos, hematológicos e metabólicos. Eventos como neutropenia, citomegalovirose e sepse bacteriana foram relatados em diferentes estudos. No trabalho de Pinelli et al., houve registro de óbito relacionado a infecção oportunista.

Por essa razão, a indicação de dessensibilização deve ser ponderada com base no risco-benefício individual. Estratégias de profilaxia antimicrobiana, vigilância laboratorial e acompanhamento multidisciplinar são essenciais. Em casos de risco infeccioso elevado, pode-se optar por regimes mais brandos, como IVIG isolado ou monoterapia com rituximabe.

Importante ressaltar que os esquemas de dessensibilização dependem da disponibilidade dos fármacos, a experiência da equipe e os recursos laboratoriais do centro transplantador. Em instituições com acesso restrito a terapias biológicas, a PLEX e a IVIG ainda são as ferramentas principais. Já centros universitários ou de grande porte podem empregar protocolos mais complexos, inclusive de forma preemptiva.

O papel do laboratório de histocompatibilidade é central nesse processo. A correta identificação dos anticorpos, o uso de prova cruzada virtual e a interpretação dos resultados do Luminex orientam as decisões clínicas. Dessa forma, o trabalho conjunto entre imunologistas, pneumologistas e imunogeneticistas torna-se essencial para o sucesso da dessensibilização<sup>14</sup>.

## Conclusão

A imunologia do transplante pulmonar representa um campo complexo e em constante evolução, no qual o sistema HLA e as técnicas de prova cruzada desempenham papéis cruciais. A correta compreensão do sistema HLA, a escolha judiciosa das técnicas de prova cruzada e a avaliação cuidadosa dos anticorpos do receptor são elementos essenciais para a otimização da compatibilidade doador-receptor e a prevenção da rejeição.

Em última análise, o sucesso do transplante pulmonar depende da integração entre o conhecimento imunológico e a tomada de decisão clínica, em um esforço conjunto entre pneumologistas, imunologistas e outros especialistas envolvidos no cuidado do paciente transplantado. A contínua pesquisa e o desenvolvimento de novas abordagens são fundamentais para melhorar os resultados e a sobrevida dos pacientes que necessitam desta importante terapia.

## Referências

1. Chambers DC, Cherikh WS, Goldfarb SB, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fifth adult lung and heart-lung transplant report—2018; focus theme: multiorgan transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2018;37(10):1169-1183.
2. Bosma B, Ajzenberg H, Van de Wetering J, et al. The importance of HLA in lung transplantation. *Transpl Immunol*. 2020;62:101307.
3. Opelz G, Döhler B. Influence of HLA mismatching on long-term survival of lung transplants: a report from the Collaborative Transplant Study. *J Heart Lung Transplant*. 2012;31(11):1180-1186.
4. Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-mediated rejection of solid-organ allografts. *N Engl J Med*. 2018;379(12):1150-1160.
5. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969;280(14):735-739.
6. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*. 2013;95(1):19-47.
7. Leffell MS, Zachary AA. Using antibody detection to predict crossmatch results and graft outcome. *Hum Immunol*. 2013;74(6):811-818.
8. Jagannathan-Bogdan M, Dioun Broyles A, Rawa M, et al. Novel methods for detection of donor-specific antibodies in patients awaiting transplantation. *Am J Transplant*. 2016;16(1):294-309.
9. Aversa M. et al. Long-term outcomes of sensitized lung transplant recipients after peri-operative desensitization. *American Journal of Transplantation*, v. 21, p. 3444–3448, 2021.
10. Franz M. et al. Ten-Year Experience with Peritransplant Desensitization in Patients with Preformed Donor Specific Antibodies in Lung Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, Volume 43, Issue 4, S335
11. Goldsby J. et al. Preemptive immune globulin therapy in sensitized lung transplant recipients. *Transplant Immunology*, v. 80, p. 101904, 2023.
12. Nicholas S. K. et al. Daratumumab as salvage therapy in pediatric thoracic organ transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, Volume 40, Issue 4, S335, 2020.
13. Pinelli D. F. et al. Lung Waitlist Desensitization Requires Timely Transplantation for Durable Removal of HLA Antibodies. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, Volume 43, Issue 4, S335, 2024.
14. Young K. et al. Lung transplantation and the era of the sensitized patient. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 689420, 2021.