

1 2 9 0



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE D
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

FRANCISCO MARQUES SERRA

Identificação de anticorpos específicos do dador na etiologia de estenoses biliares não anastomóticas pós transplante hepático

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE CIRURGIA GERAL

Trabalho realizado sobre a orientação de:

DULCE HELENA SARAMAGO DIOGO CORTES
JOSÉ GUILHERME LOPES RODRIGUES TRALHÃO

JANEIRO 2022

Identificação de anticorpos específicos do dador na etiologia de estenoses biliares não anastomóticas pós transplante hepático

Dissertação de acesso ao Grau de Mestre em Medicina

Francisco Marques Serra

2019239826

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

framaserra@live.com.pt

Dulce Helena Saramago Diogo Cortes

Unidade de Transplantação Hepática de Adultos, Serviço de Cirurgia Geral, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

netdiogo@gmail.com

José Guilherme Lopes Rodrigues Tralhão

Serviço de Cirurgia Geral, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

jglrt@hotmail.com

Índice

Resumo	3
Abstract.....	5
Lista de Abreviaturas	6
Introdução.....	7
Materiais e métodos	9
Desenho do estudo.....	9
Seleção e descrição da amostra	9
Diagnóstico de estenose.....	9
Recolha de dados.....	9
Caracterização da amostra	10
Tempo de Isquemia	10
Pesquisa e identificação das especificidades dos anticorpos anti-HLA no soro de doentes e controlos	11
Avaliação estatística	11
Pesquisa bibliográfica	12
Resultados	13
1) Análise descritiva da amostra.....	13
1.1) Caracterização do grupo dos casos	14
1.2) Caracterização do grupo dos controlos.....	14
2. Distribuição da incidência das estenoses	15
3) Caracterização da aloreactividade dos doentes contra antígenos HLA de classe I e II.....	16
4) Presença de anti-HLA e ENA	18
5) Presença de AED e ENA	18
6) Presença de cPRA e ENA	19
Discussão e conclusão	20
Agradecimentos.....	24
Referências bibliográficas	25

Resumo

Nas últimas décadas, o transplante hepático assumiu um papel de importante relevo no tratamento de diversas patologias hepáticas. No entanto, a longo prazo este ainda apresenta uma elevada morbidade, destacando-se as complicações biliares como um dos principais problemas associados. Este projecto incidiu sobre a lesão imunomediada: em especial na avaliação pré transplante dos anticorpos específicos do dador (AED) e a sua relação com as estenoses biliares não anastomóticas (ENA) a longo prazo; tentando-se estabelecer uma relação entre a grande prevalência das ENA no grupo de estenoses biliares e a avaliação pré transplante dos AED, e das suas classes.

Para o efeito, realizou-se um estudo longitudinal retrospectivo caso controlo com base nos dados da Unidade de Transplantação Hepática de Adultos do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, avaliando os anticorpos anti-HLA de classe I e II, o crossmatch virtual positivo do dador e a reatividade calculada contra um painel de dadores (cPRA) pré transplante e a sua relação com o desenvolvimento de ENA.

Em relação à presença de anticorpos anti-antigénio leucocitário humano (HLA) e o desenvolvimento de ENA, para os anticorpos de classe I obtivemos um p de 0,840 e para os de classe II um p de 0,949 pelo que ambos os grupos não obtiveram uma relação de dependência com a presença de ENA. No caso dos AED, para a classe I obtivemos um p de 0,670 e para a classe II um p de 0,902, pelo que em ambas as classes não se obteve correlação com o desenvolvimento de ENA. Foi ainda avaliado a relação das ENA e os AED quando pelo menos um AED era positivo ($p=0,432$) e quando ambos eram positivos ($p=0,500$), concluindo que não há relação com estes subgrupos e o desenvolvimento de ENA. Relativamente à reatividade calculada contra um painel de dadores, um valor superior a 20% tanto para a classe I ($p=0,768$) como para a classe II ($p=0,652$) não demonstraram ser um bom preditor do desenvolvimento de ENA.

À luz destes dados, podemos sugerir que a determinação do perfil de alo-sensibilização, nomeadamente de anticorpos anti-HLA e anti-HLA específicos do dador no período pré transplante não é um fator preditivo de desenvolvimento de ENA a longo prazo.

Palavras-chave: transplante hepático; Estenoses biliares não anastomóticas; Anticorpos específicos do dador

Abstract

In the last few decades liver transplants have gained an important role in the treatment of several liver pathologies. However, in the long run, there's still a high morbidity rate with biliary complications being one of the main issues reported. This project focused mainly on immune-mediated injury: with emphasis on pre transplant assessment of donor-specific antibodies (DSA) and their relation with non-anastomotic biliary strictures (NAS) on the long term, attempting to establish a parallel between the high prevalence of NAS in the group of biliary strictures and the pre-transplant evaluation of DSA and its classes.

For this, a case-control with a retrospective longitudinal study was made, based on the data from the Adult Liver Transplantation Unit from the Centro Hospitalar Universitário de Coimbra. Assessing the antibodies anti-HLA 1 or 2, the positive virtual crossmatch for the donor, and the Calculated panel reactive antibody (CPRA) before transplant and its relation with the evolution of NAS.

Regarding the presence of anti-HLA antibodies and the development of NAS, for the class I antibodies, we got a p-value of 0.840, and for class II a p-value of 0.949. Whereby both groups didn't obtain a dependency relationship with the presence of NAS.

In the DSA case, for class I we got a p-value of 0.670 and for class II a p-value of 0.902, which leads to the conclusion of a lack of correlation with the development of NAS.

We also analysed the relationship between NAS and DSA, when at least one DSA is positive ($p=0.432$) and when both are positive ($p=0.500$), concluding that there isn't a correlation between these two subgroups and the development of NAS.

Comparatively, the calculated panel reactivity has a value higher than 20%, both for class I ($p=0.768$) and class II ($p=0.652$), proving that this is not a good predictor for the development of NAS.

With all of this taken into consideration, we can suggest that the determination of the allosensitization profile, specifically of anti-HLA antibodies and DSA in the period before transplant isn't a factor for predicting the development of NAS in long term.

Keywords: liver transplant, non-anastomotic biliary strictures, donor-specific antibodies

Lista de Abreviaturas

AED- Anticorpos específicos do dador

cPRA – Reatividade calculada contra um painel de dadores

CSTC – Centro do Sangue e da Transplantação de Coimbra

DSA – Donor-specific antibodies

EA – Estenose biliar anastomótica

ENA – Estenose biliar não anastomótica

HLA – sistema de antigénio leucocitário humano

IPST – Instituto Português do Sangue e Transplantação

MELD – Model for end-stage Liver disease score

NAS – Non-anastomotic biliary strictures

SENA – sem estenose biliar não anastomótica

TIF – tempo de isquemia fria

TIQ – tempo de isquemia quente

Introdução

Nas últimas décadas, o transplante hepático assumiu um papel de importante relevo no tratamento de doentes com doença hepática terminal de diversas etiologias entre as quais se destacam o carcinoma hepatocelular, doenças metabólicas e a cirrose (1). Apesar da sobrevivência a curto prazo ter melhorado significativamente nos últimos anos, a longo prazo, a elevada morbidade ainda é uma realidade(2).

Contribuem para este paradigma um conjunto de complicações que convencionalmente são divididas quanto à sua etiologia em vasculares, biliares, parenquimatosas e neoplásicas (3). Este trabalho aborda o grupo das complicações biliares no qual as estenoses representam cerca de 40%, sendo o resto dividido entre fugas biliares, disfunção do esfíncter de Oddi, hemobilia, obstrução biliar por mucocelo no ducto cístico, litíase e lama biliar. (4, 5)

As estenoses podem ser divididas em dois grandes grupos: estenoses biliares anastomóticas (EA) e estenoses biliares não anastomóticas (ENA), apresentando etiologias e prognósticos distintos.

A patogénese das ENA é multifatorial sendo destacadas três teorias fisiopatológicas quanto à sua génese, nomeadamente, a lesão isquémica, a lesão citotóxica e a lesão imunomediada. A lesão isquémica é resultante da agressão cirúrgica dos tecidos peri e loco regionais diminuindo o suprimento sanguíneo às vias biliares. A lesão citotóxica é induzida por sais biliares hidrofóbicos pelo seu efeito detergente para as membranas celulares lipídicas e pelo seu efeito na indução intracelular da apoptose. Por último, a lesão imunomediada resulta da lesão direta das células epiteliais ou pela formação de imunocomplexos nos vasos peribiliares ambas com subsequente lesão isquémica (6). Apesar de a patogénese não estar completamente esclarecida, são descritos alguns fatores de risco do dador e recetor que estão comprovadamente associados a lesão biliar nomeadamente a idade, transplante parcial/total, níveis elevados de aspartato aminotransferase e a mutação CCR5 Δ 32 indutora de perda de função.(7)

As variações na técnica, inerentes ao processo e complexidade dos fatores envolvidos, dificultam a associações de outros factores. O tempo de isquemia fria (TIF) e o tempo de isquemia quente (TIQ) do enxerto assim como a alteração da composição da bÍlis após transplante, são alguns dos exemplos que, devido à sua complexidade, ainda não permitiram obter uma clara associação dos mesmos; uma vez que a bibliografia disponível não é consensual nos seus resultados.(8)

Este projeto incidiu sobre a lesão imunomediada, em especial na avaliação dos anticorpos específicos do dador (AED) e a sua relação com as ENA, procurando perceber se a avaliação pré transplante dos AED e as suas classes influenciam o desenvolvimento de ENA a longo prazo. É importante referir que embora os AED que medeiam a rejeição possam ser dirigidos contra moléculas HLA, antígenos das células endoteliais e antígenos do sistema ABO, este trabalho incidiu especificamente sobre anticorpos anti-antígeno HLA.

Ainda que exista alguma informação referente a esta associação, não foram desenvolvidos estudos com um seguimento a longo prazo, reforçando a pertinência deste estudo.

Materiais e métodos

Desenho do estudo

Estudo longitudinal retrospectivo caso controlo.

Seleção e descrição da amostra

Foram selecionados adultos, recetores de fígado cujos transplantes ocorreram entre setembro de 2016 e outubro de 2018, utilizando uma base de dados com 78 doentes. Foram excluídos da amostra os doentes cujo transplante apresentava uma incompatibilidade do sistema ABO entre o recetor e o dador, doentes com um seguimento inferior a 6 meses após transplante e casos que não apresentavam resultados peritransplante referentes aos AED quer do dador ou recetor.

Diagnóstico de estenose

A caracterização das estenoses biliares foi revista, durante o mês de outubro de 2021, através da reavaliação de dados clínicos e imagiológicos por colangiopancreatografia por ressonância magnética, colangiopancreatografia retrograda endoscópica e colangiografia percutânea transhepática dos doentes assim como a consulta de novos registos e dados disponíveis na plataforma SClinico, tendo sido feita por uma única pessoa.

As EA foram definidas como aquelas que ocorreram a menos de 5 milímetros da anastomose sendo que doentes com anastomoses mistas, múltiplas e a mais de 5 milímetros da anastomose foram englobados na categoria ENA.

Recolha de dados

Foi utilizada uma base de dados anonimizada da Unidade de Transplantação hepática de Adultos do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra para a recolha e

análise de dados referentes ao recetor, ao dador e ao procedimento. Foram para isso incluídos: idade, compatibilidade ABO, tempo de isquemia fria, tempo de isquemia quente e ainda o MELD sódio score.

As amostras de sangue, ao dador e recetor, colhidas no período pré transplante foram processadas posteriormente no laboratório de histocompatibilidade do Centro do Sangue e da Transplantação de Coimbra (CSTC)-Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST)

O CSTC forneceu os dados referentes à presença de anticorpos anti-HLA contra antígenos HLA classe I e II, teste de crossmatch virtual e reatividade calculada contra um painel de dadores (cPRA) usando a ferramenta disponível cPRA calculator(9) e Virtual PRA calculator da EuroTransplant. (10)

Para o cumprimento das normas de ética, foi enviado um requerimento à comissão de ética da faculdade de medicina da universidade de Coimbra e procedeu-se à anonimização necessária dos dados.

Caracterização da amostra

Para a criação dos grupos caso e controlo, os doentes foram divididos em 2 grupos:

- o grupo dos casos: constituído por doentes que desenvolveram estenoses biliares não anastomóticas.
- o grupo de controlo: constituído pelos doentes sem estenoses biliares não anastomóticas (SENA) que incluem aqueles sem estenoses e aqueles com estenoses biliares anastomóticas (EA)

Tempo de Isquemia

O TIF foi definido como o intervalo de tempo que decorre desde a clampagem da aorta do dador até à retirada do fígado do gelo. O TIQ 1 corresponde ao período desde a retirada do fígado do gelo até à reperfusão do primeiro vaso. O TIQ 2 é referente ao período desde a reperfusão do primeiro vaso até à reperfusão do segundo;

Pesquisa e identificação das especificidades dos anticorpos anti-HLA no soro de doentes e controlos

A pesquisa e identificação das especificidades dos anticorpos anti-HLA foi executada usando os reagentes LabScreen Mixed Classe I e II e LabScreen Single antigen Assay classe I e Classe II da One Lambda – Thermo Fisher, em plataforma xMap – Luminex.

A tecnologia Luminex® utiliza esferas revestidas com antigénios HLA que são adicionadas ao soro do doente. Se existirem anticorpos anti-HLA específicos no soro do doente, estes ligam-se às esferas que possuem os antigénios para os quais são específicos. É, de seguida, introduzido um anticorpo anti-IgG conjugado com fluoresceína que identifica o anticorpo anti-HLA. Por último, os resultados são interpretados em software próprio, Fusion v4.6 da OneLambda, e os resultados expressos em valores médios de intensidade de fluorescência (MFI). Para este estudo, foi considerada que a presença do anticorpo específico é feita em valores superiores a 1000 MFI.

A avaliação dos AED foi realizada após avaliação das incompatibilidades HLA entre dador e doente para os locus HLA-ABCDQR.

Avaliação estatística

Para o tratamento de dados estatísticos utilizou-se o software IBM SPSS Statistics, versão 27.0.0.0. Para este estudo o nível de significância utilizado foi de 0.05, com um intervalo de confiança de 95%.

Para as comparações com variáveis quantitativas, em que os casos ou controlos não apresentam uma distribuição normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Recorreu-se ao Teste de Qui-Quadrado da independência para testar a existência de uma relação significativa entre duas variáveis categoriais, optando pelo teste de Pearson uma vez que cumpre os critérios de Cochran.

Pesquisa bibliográfica

A pesquisa bibliográfica foi realizada nas plataformas online *Pubmed* e *Embase* sendo o termo de pesquisa utilizado o seguinte: ('liver transplantation' OR 'hepatic transplantation' OR 'liver transplants' OR 'liver grafting' OR 'liver grafts') AND ('donor specific antibody' OR 'donor specific antibodies') AND ('biliary stenosis' OR 'biliary strictures' OR 'biliary stenoses' OR cholestasis). A pesquisa foi revista até ao dia 22 de janeiro de 2022.

Resultados

Do universo de 78 doentes que este estudo contempla, 55 foram alvo de avaliação. Dos restantes, foram alvo de exclusão 15 doentes por não apresentarem resultados pré transplante quer do dador ou recetor referentes ao perfil de alo sensibilização, um doente por incompatibilidade do sistema ABO entre o recetor e o dador e oito por apresentarem um seguimento inferior a seis meses.

1) Análise descritiva da amostra

O grupo dos casos e dos controlos foram comparados quanto à idade, sexo, MELD sódio score, TIF e TIQ 1 e 2.

Para a idade foi utilizado um teste de Mann-Whitney por o grupo dos controlos não apresentar uma distribuição normal, com um *p-value* de 0,772, logo podemos afirmar que não há uma diferença entre a idade dos casos e dos controlos.

Para o sexo foi utilizado um teste qui-quadrado de Pearson, tendo sido obtido um *p-value* de 0,652 e, portanto, podemos afirmar que não há diferença entre o sexo dos casos e dos controlos.

Para o MELD sódio foi utilizado um teste de Mann-Whitney por o grupo dos controlos não apresentar uma distribuição normal, com um *p-value* de 0,134, logo podemos afirmar que não há uma diferença entre o MELD sódio score dos casos e dos controlos.

Para o TIF foi utilizado um teste de Mann-Whitney por o grupo dos casos não apresentar uma distribuição normal, com um *p-value* de 0,063, logo podemos afirmar que não há uma diferença entre o TIF dos casos e dos controlos.

Para o TIQ 1 foi utilizado um teste de Mann-Whitney por o grupo dos controlos não apresentar uma distribuição normal, com um *p-value* de 0,333, logo podemos afirmar que não há uma diferença entre o TIQ 1 dos casos e dos controlos.

Para o TIQ 2 foi utilizado um teste de Mann-Whitney por o grupo dos casos não apresentar uma distribuição normal, com um *p-value* de 0,477, logo podemos afirmar que não há uma diferença entre o TIQ 2 dos casos e dos controlos.

1.1) Caracterização do grupo dos casos

A amostra dos casos é descrita na tabela 1 quanto às variáveis idade, género, MELD sódio score e tempo de isquemia fria e tempo de isquemia quente 1 e 2.

Tabela 1. Descritivos da amostra dos casos

Variáveis (n=17)	Mediana(min-max)	Média	Frequências/n
Idade(anos)	55(37-73)		-
Género			
Masculino			70,5% (n=12)
Feminino			29,4% (n=5)
MELD sódio	23(13-42)	23,69	-
TIF (min)	341(250-606)	353,65	
TIQ 1 (min)	51(35-76)	53,06	
TIQ 2 (min)	45(27-128)	51,82	

MELD- Model for end-stage Liver disease score; TIF- tempo de isquemia fria; TIQ – tempo de isquemia quente

1.2) Caracterização do grupo dos controlos

A amostra dos controlos é descrita na tabela 2 quanto às variáveis idade, género, MELD sódio score e tempo de isquemia fria e tempo de isquemia quente 1 e 2.

Tabela 2. Descritivos da amostra dos controlos

Variáveis (n=38)	Mediana(min-max)	Média	Frequências/n
Idade(anos)	56,5(23-69)		-
Género			
Masculino			76,3% (n=29)
Feminino			23,7% (n=9)
MELD sódio	17(7-38)	19,08	-
Tempo de isquemia fria	310(138-510)	314,54	
Tempo de isquemia quente 1	47(29-270)	59	
Tempo de isquemia quente 2	45(21-83)	45,84	

MELD- Model for end-stage Liver disease score; TIF- tempo de isquemia fria; TIQ – tempo de isquemia quente

2. Distribuição da incidência das estenoses

A distribuição da incidência de estenoses, tanto EA como ENA é descrita na tabela 3.

Tabela 3. Frequência de estenoses e seus subgrupos

	Número de casos (n=55)	Frequência
ENA	n = 17	30,9%
EA	n = 7	12,7%
SE	n = 31	56,4%

ENA – Estenose biliar não anastomótica; EA – Estenose biliar anastomótica; SE – Sem estenose

3) Caracterização da aloreactividade dos doentes contra antígenos HLA de classe I e II

A avaliação imunológica compreendeu caracterização da aloreactividade anti-HLA tanto de classe I (Gráfico 1) e de classe II (Gráfico 2), assim como de um crossmatch virtual positivo para anticorpos específicos do dador de classe I (Gráfico 3) e classe II (Gráfico 4) pré transplante.

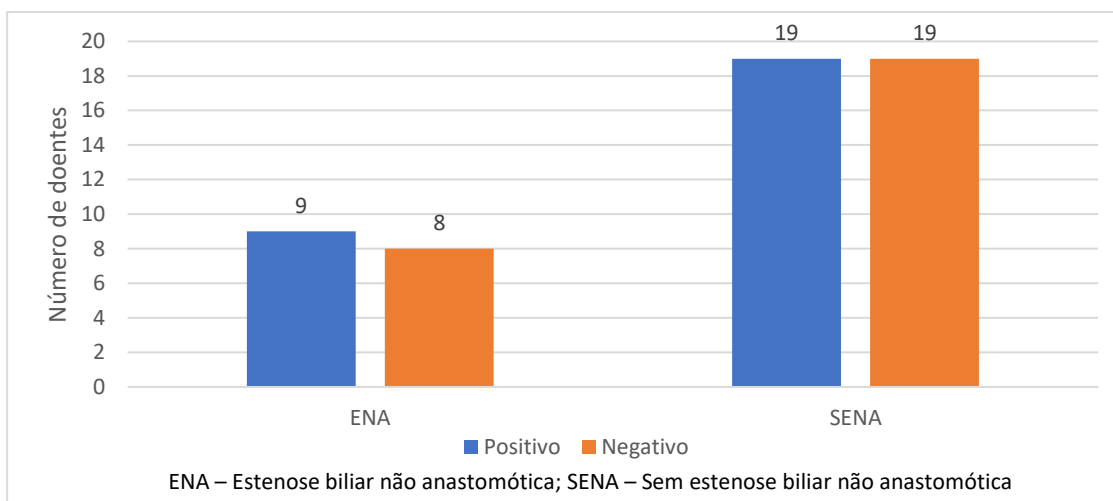


Gráfico 1. Comparação da aloreactividade anti-HLA I entre ENA e SENA

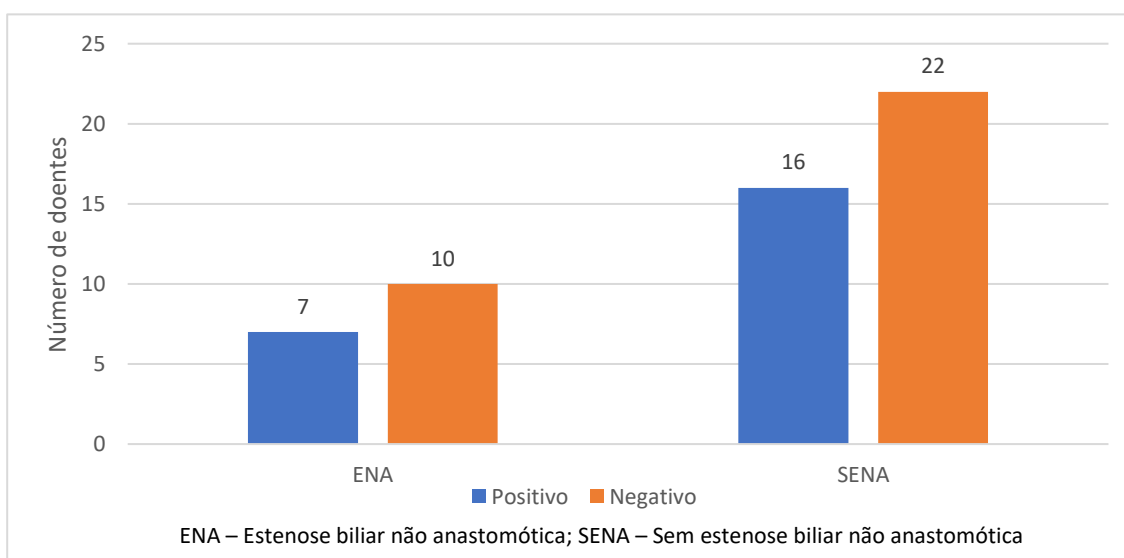


Gráfico 2. Comparação da aloreactividade anti-HLA II entre ENA e SENA

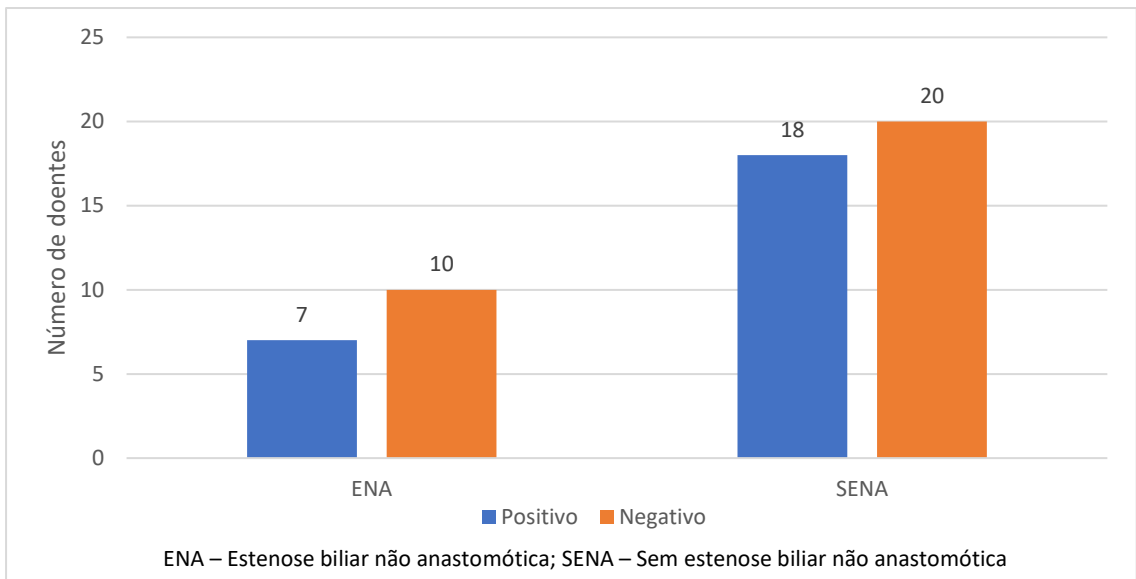


Gráfico 3. Comparação do resultado do teste de crossmatch virtual para classe I entre ENA e SENA

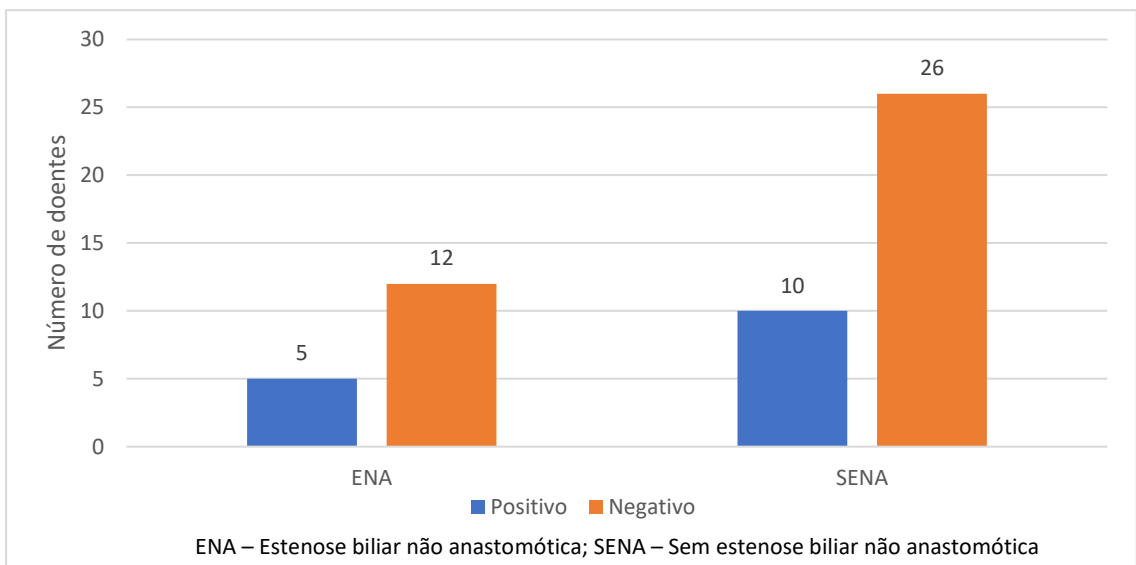


Gráfico 4. Comparação do resultado do teste de crossmatch virtual para classe II entre ENA e SENA

Foi ainda avaliado a reatividade calculada contra um painel de doadores para os recetores que apresentavam positividade para AED de classe I e de classe II (tabela 4).

TABELA 4. Descritores do valor calculado da reatividade ao painel

	Média(minino-máximo)	Erro padrão
cPRA classe I (n=27)	44,85(10-100)	30
cPRA classe II (n=29)	23,90(0-88)	26

cPRA - Reatividade calculada contra um painel de dadores

4) Presença de anti-HLA e ENA

A associação entre a presença de anticorpos anti-HLA e ENA foi pesquisada individualmente para classe I e para classe II através de um teste Qui-quadrado para o qual foram obtidos os valores na (tabela 5).

Para os anticorpos de anti-HLA de classe I foi obtido um valor de p de 0,84 e para os de classe II foi obtido um p de 0,95 pelo que não foi encontrada associação entre a presença de anticorpos anti-HLA, tanto de classe I como de classe II, e estenoses biliares não anastomóticas.

5) Presença de AED e ENA

A dependência entre a presença de um crossmatch virtual positivo para anticorpos específicos do dador e a presença de estenoses biliares não anastomóticas foi avaliada independentemente para os anticorpos de classe I e de classe II. Para a associação com os AED de classe I foi obtido um p -value de 0,67 e para os de classe II um p -value de 0,90, pelo que não foi encontrada diferença estatisticamente significativa para a relação.

A pesquisa englobou ainda a procura de associação quando pelo menos um dos AED era positivo (p -value=0,43) e quando ambos eram positivos (p -value=0,50) e a sua associação a ENA, não tendo obtido diferença estatisticamente significativa pelo que não foi possível afirmar a associação. (tabela 5).

6) Presença de cPRA e ENA

A relação entre a reatividade calculada ao painel de dadores e as estenoses biliares não anastomóticas foi avaliada utilizando um cut-off de 20% para a atribuição de um valor relevante de reatividade em concordância com os estudos do Instituto português do Sangue e da Transplantação.

A associação entre um valor de cPRA de classe I significativo e o desenvolvimento de ENA obteve um *p-value* de 0,768, pelo que não foi obtida diferença estatisticamente significativa para a associação.

A associação entre um valor de cPRA de classe II significativo e o desenvolvimento de ENA obteve um *p-value* de 0,652, pelo que não foi obtida diferença estatisticamente significativa para a associação. (tabela 5)

Tabela 5. Testes de independência para as diferentes variáveis e as ENA

	Anti HLA 1	Anti HLA 2	AED 1	AED 2	Pelo menos um AED positivo	Ambos AED positivos	cPRA classe I	cPRA classe II
<i>p-value</i>	0,840	0,949	0,670	0,902	0,432	0,500	0,768	0,652

AED- Anticorpos específicos do dador; cPRA – Reatividade calculada contra um painel de dadores;
HLA – sistema de antigénio leucocitário humano

Discussão e conclusão

As estenoses biliares são um fator importante de morbimortalidade para doentes sujeitos a transplantes hepáticos. A sua divisão em ENA e EA é dependente da sua localização em relação à anastomose cirúrgica, no entanto, diferem também quanto à sua etiologia. Enquanto as EA apresentam uma etiologia predominantemente associada à técnica cirúrgica, as ENA apresentam uma etiologia multifatorial e complexa com fatores associados tanto à técnica cirúrgica como independente desta.(6) Apresentam um sucesso terapêutico endoscópico inferior (50%-75%) e um risco de recorrência muito elevado quando comparadas com as EA, resultando numa difícil gestão dos doentes e numa crescente necessidade de prevenir o seu desenvolvimento. (11) Esta taxa de complicações associada a um difícil tratamento pode levar à perda do enxerto e à necessidade de retransplante. Este conjunto de fatores leva a que as complicações biliares tenham assumido o papel de calcanhar de Aquiles da transplantação hepática substituindo as complicações vasculares que têm visto a sua incidência em decréscimo na última década.(12)

O papel da imunidade celular no desenvolvimento de complicações biliares é um tema amplamente discutido sendo que, até recentemente, a imunomodulação intrínseca do fígado resultante da sua dupla irrigação sanguínea, a sua elevada massa relativa e as características específicas do parênquima levaram a que os AED fossem excluídos no processo de seleção de fígados para transplante contrariamente ao realizado para a seleção de outros órgãos, nomeadamente o rim. (13)

A dupla irrigação hepática, nomeadamente a circulação portal, permite uma exposição prolongada a um meio rico em micronutrientes, mas também em produtos da degradação bacteriana intestinal como endotoxinas que resultam num fenómeno descrito como tolerância a endotoxinas, levando a um ambiente imunologicamente tolerante com uma reduzida expressão de HLA de classe II nas células apresentadoras de antígenos. Por sua vez, o parênquima hepático que apresenta uma enorme capacidade de se regenerar sendo capaz de reverter a fibrose resultante da lesão imune, possuindo ainda uma variedade de leucócitos e células estaminais hematopoiéticas que contribuem para esta tolerância imunológica.(14)

Recentemente, a tolerância imunogénica hepática tem sido posta em causa e cada vez mais associada a complicações pós transplante hepático. (15-17)

Pela crescente importância do papel imunológico na transplantação hepática, este trabalho tem um enfoque na teoria da lesão imunomediada. Como tal, foram

cruzados os resultados entre os dadores e recetores para avaliar vários fatores de imunidade através da colheita de sangue no internamento pré transplante. Como abordagem inicial foram escolhidos a presença de anticorpos anti-HLA de classe I e classe II, a presença de crossmatch virtual para AED tanto de classe I como de classe II e a presença de cPRA superior a 20% como possíveis fatores de risco para ENA.

Esta abordagem permite uma visão geral sobre a lesão imunomediada visto que abordamos em primeira fase a presença de anticorpos anti-HLA classicamente associados com o reconhecimento proteico e lesão celular. Posteriormente, a abordagem aos AED permite uma especificidade superior avaliando a presença de, não só anticorpos, mas aqueles com afinidade para as células do dador. Por último, o cPRA permite determinar, num determinado doente, a probabilidade de este ter uma reação cruzada com o conjunto de dadores existentes. É, portanto, uma importante medida para prever a sensibilização do recetor e consequentemente a lesão imunomediada. (18)

Em relação à presença de anticorpos anti-HLA e o desenvolvimento de ENA, para os anticorpos de classe I obtivemos um p de 0,840 e para os de classe II um p de 0,949 pelo que ambos os grupos não obtiveram uma relação de dependência com a presença de ENA. No caso dos AED, para a classe I obtivemos um p de 0,670 e para a classe II um p de 0,902, pelo que em ambas as classes não se obteve correlação com o desenvolvimento de ENA. Foi ainda avaliado a relação das ENA e os AED quando pelo menos um AED era positivo ($p=0,432$) e quando ambos eram positivos ($p=0,500$), concluindo que não há relação com estes subgrupos e o desenvolvimento de ENA. Relativamente à reatividade calculada contra um painel de dadores, um valor superior a 20 tanto para a classe I ($p=0,768$) como para a classe II ($p=0,652$) não demonstraram ser um bom preditor do desenvolvimento de ENA.

Apesar da bibliografia disponível e dos mecanismos acima descritos, os AED e a sua associação com as ENA ainda é alvo de pouco consenso e literatura divergente. Enquanto trabalhos como o de Den Dulk et al. que usou uma amostra de 151 transplantados não encontrou associação num seguimento de 1 ano (19), Foley et al. usando uma amostra de 168 transplantados com um seguimento de um ano encontrou associação com AED de novo (20) e Löb et al. com uma amostra de 286 transplantados encontrou associação utilizando em simultâneo AED de classe II com uma fluorescência superior a 500 MFI e um crossmatch para linfócitos B. (21) Esta disparidade associada a uma variabilidade genética demográfica abre espaço para a procura de mais casuística e justifica o trabalho desenvolvido.

O estudo beneficiou de uma amostra homogénea colhida num único centro, com uma equipa cirúrgica experiente e efetiva diminuindo as variações na realização tanto de procedimentos como na colheita de amostras e na avaliação das mesmas, estando acoplado o tratamento das mesmas pelo Instituto Português do Sangue e da Transplantação. Estas características permitem diminuir a variância de métodos e interpretação de resultados.

Quanto às suas limitações, apesar de vários fatores de risco serem conhecidos, a amostra não apresentava tamanho suficiente para, aquando da sua estratificação para outras variáveis, permitisse uma avaliação estatística. A utilização de uma amostra de tamanho limitado, especialmente quando estratificada em grupos de estenoses diminui o seu poder estatístico e a sua significância. A transição de sistemas informáticos e a ainda incompleta centralização da informação referente aos dados dos doadores e recetores levou a viés de informação, tendo sido necessário excluir doentes com resultados pertinentes para o estudo por informação ausente ou incompleta.

O aumento amostral decorrente da realização contínua de transplantes por parte do centro, juntamente à colheita sanguínea de execução simples, economicamente viável e sistemática implementada, permitirá de futuro aumentar o poder estatístico da base de dados assim como definir novos fatores de risco e mecanismos para esta causa de morbimortalidade.

O próximo passo poderá incluir a realização de um estudo prospetivo, onde se realize uma colheita de amostras, no período pré e pós transplante tanto a 6 como a 12 meses, para verificar o desenvolvimento de AED de novo e a evolução daqueles formados pré transplante, estabelecendo a sua relação com as ENA. Este tipo de colheita periódica permite acompanhar a mudança do perfil de alo sensibilização que se desenvolve no período pós transplante.

A descoberta de novos fatores preditores de desenvolvimento de ENA ocupa um lugar de importante relevo para a prestação de cuidados de saúde. A identificação de fatores que influenciam este tipo de complicações pode mudar a abordagem pré e pós-operatória com o enfoque na antecipação de cuidados individualizados com vista a diminuir o tempo de internamento, a necessidade de reintervenção bem como os indicadores de qualidade de vida pós transplante.

À luz destes dados, podemos sugerir que a determinação do perfil de alo sensibilização imunológica nomeadamente de anticorpos anti-HLA e AED no

período pré transplante não é um fator preditivo de desenvolvimento de ENA a longo prazo.

Agradecimentos

Ao Professor Guilherme Tralhão, pelo profissionalismo e disponibilidade durante todo o processo.

À Dr^a Dulce Diogo, pela oportunidade e apoio ao longo de todo o percurso.

Ao Dr^o António Martinho e colaboradores, pela disponibilidade e simpatia no mundo da imunologia.

Aos doentes e dadores, que tornaram o estudo possível.

Ao Filipe, à Barbara, à Beatriz e ao Rodrigo pela amizade, conselhos e por partilharem comigo os momentos fáceis e difíceis deste desafio.

À minha família, pelas vivências e conselhos que moldaram o meu trabalho.

À Sara, pelo exemplo de bravura e determinação que me motivaram nos momentos de desalento.

Aos meus pais, por TUDO aquilo que nunca serei capaz de pôr em palavras.

Referências bibliográficas

1. Burra P, Burroughs A, Graziadei I, Pirenne J, Valdecasas JC, Muiesan P, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Liver transplantation. *Journal of Hepatology*. 2016;64(2):52.
2. Gelson W, Hoare M, Dawwas MF, Vowler S, Gibbs P, Alexander G. The pattern of late mortality in liver transplant recipients in the United Kingdom. *Transplantation*. 2011;91(11):1240-4.
3. Craig EV, Heller MT. Complications of liver transplant. *Abdom Radiol (NY)*. 2021;46(1):43-67.
4. Greif F, Bronsther OL, Van Thiel DH, Casavilla A, Iwatsuki S, Tzakis A, et al. The incidence, timing, and management of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation. *Ann Surg*. 1994;219(1):40-5.
5. Stratta RJ, Wood RP, Langnas AN, Hollins RR, Bruder KJ, Donovan JP, et al. Diagnosis and treatment of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation. *Surgery*. 1989;106(4):675-83; discussion 83-4.
6. Op den Dries S, Sutton ME, Lisman T, Porte RJ. Protection of bile ducts in liver transplantation: looking beyond ischemia. *Transplantation*. 2011;92(4):373-9.
7. Iacob S, Cicinnati VR, Dechêne A, Lindemann M, Heinemann FM, Rebmann V, et al. Genetic, immunological and clinical risk factors for biliary strictures following liver transplantation. *Liver Int*. 2012;32(8):1253-61.
8. Silva JACd. Estenoses biliares não anastomóticas pós transplante hepático: associação anatomopatológica 2019 [cited 2021. Available from: <http://hdl.handle.net/10316/89798>.
9. Services USDoHaH. CPRA Calculator 2021 [updated 2021 May 15 2021 november 20]. Available from: <https://optn.transplant.hrsa.gov/resources/allocation-calculators/cpra-calculator/>.
10. Laboratory ER. Virtual PRA Calculator 2022 [cited 2022. Available from: <https://www.etril.org/vPRA.aspx>.
11. Sharma S, Gurakar A, Jabbour N. Biliary strictures following liver transplantation: past, present and preventive strategies. *Liver Transpl*. 2008;14(6):759-69.
12. Pareja E, Cortes M, Navarro R, Sanjuan F, López R, Mir J. Vascular Complications After Orthotopic Liver Transplantation: Hepatic Artery Thrombosis. *Transplantation Proceedings*. 2010;42(8):2970-2.

13. Vionnet J, Sempoux C, Pascual M, Sánchez-Fueyo A, Colmenero J. Donor-specific antibodies in liver transplantation. *Gastroenterol Hepatol*. 2020;43(1):34-45.
14. Kern M, Popov A, Kurts C, Schultze JL, Knolle PA. Taking off the brakes: T cell immunity in the liver. *Trends Immunol*. 2010;31(8):311-7.
15. Jadowiec CC, Taner T. Liver transplantation: Current status and challenges. *World J Gastroenterol*. 2016;22(18):4438-45.
16. O'Leary JG, Kaneku H, Susskind BM, Jennings LW, Neri MA, Davis GL, et al. High mean fluorescence intensity donor-specific anti-HLA antibodies associated with chronic rejection Postliver transplant. *Am J Transplant*. 2011;11(9):1868-76.
17. Kaneku H, O'Leary JG, Taniguchi M, Susskind BM, Terasaki PI, Klintmalm GB. Donor-specific human leukocyte antigen antibodies of the immunoglobulin G3 subclass are associated with chronic rejection and graft loss after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2012;18(8):984-92.
18. Cecka JM. Calculated PRA (CPRA): the new measure of sensitization for transplant candidates. *Am J Transplant*. 2010;10(1):26-9.
19. den Dulk AC, Shi X, Verhoeven CJ, Dubbeld J, Claas FHJ, Wolterbeek R, et al. Donor-specific anti-HLA antibodies are not associated with nonanastomotic biliary strictures but both are independent risk factors for graft loss after liver transplantation. *Clin Transplant*. 2018;32(2).
20. Foley D, Ellis T, D'Alessandro A, Powell A, Levenson G, Musat A. De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies Are a Risk Factor for the Development of Biliary Strictures After DBD Liver Transplantation.: Abstract# 2121. *Transplantation*. 2014;98.
21. Löb S, Schadde E, Dutkowski P, Clavien P-A, J. B. Late extra-hepatic biliary strictures after liver transplantation are associated with pre-existing donor-specific antibodies. *Transplant international*. 2013;26(2).