

# Estágio Laboratorial de Histocompatibilidade e Imunogenética Clínica

Sandra dos Santos Rita Vaz Alcântara

Orientado por:

Professor Doutor Fernando Bellém (Escola Superior de Tecnologias da  
Saúde de Lisboa)

Dr. Luís Ramalhete (Instituto Português do Sangue e Transplantação)

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa  
para obtenção do grau de Mestre em **Tecnologias Clínico-Laboratoriais**

*Lisboa, Julho 2024*

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA  
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

## **Estágio Laboratorial de Histocompatibilidade e Imunogenética Clínica**

Autora: Sandra dos Santos Rita Vaz Alcântara

Orientado por:

Professor Doutor Fernando Bellém (Escola Superior de Tecnologias da  
Saúde de Lisboa)

Dr. Luís Ramalhete (Instituto Português do Sangue e Transplantação)

Presidente do Júri: Professora Doutora Edna Ribeiro (Escola Superior  
de Tecnologias da Saúde de Lisboa)

Arguente: Especialista Pedro Venturini (Direção Geral de Saúde)

(esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

*Lisboa, Julho 2024*

# Estágio Laboratorial de Histocompatibilidade e Imunogenética Clínica

Sandra dos Santos Rita Vaz Alcântara

2024

O presente relatório de estágio foi desenvolvido no **Instituto Português do Sangue e Transplantação** (IPST), no âmbito do mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais lecionado na **Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa** (ESTeSL), sob supervisão do Professor Doutor Fernando Bellém (ESTeSL) e do Dr. Luís Ramalhete (IPST).

O Instituto Politécnico de Lisboa tem o direito ilimitado e intemporal de arquivar e publicar este relatório através de cópias digitais ou físicas, ou qualquer outro meio que considerem adequado, com objetivos de investigação ou educação, não comerciais, desde que a autora seja reconhecida para tal.

Copyright © 2024 – Sandra Alcântara

*Ao meu querido pai que partiu no início deste desafio...*

## Agradecimentos

---

Agradeço a Deus por me ter ajudado e permitido não desistir e assim poder concluir mais uma etapa acadêmica e da minha vida profissional.

Ao Dr. Luís Ramalhete e ao Dr. Pedro Mendonça pelo privilégio que me deram na realização deste estágio, por todo o apoio demonstrado desde o início da organização deste estágio, que orientaram e partilharam toda a sua experiência para que novos conceitos, técnicas e conhecimentos pudessem ser consolidados e enriquecessem a minha formação.

A toda a equipa do Centro de Transplantação de Lisboa que tanto me ensinou ao longo deste período e me permitiu crescer e desenvolver nesta área. O meu “muito obrigado” ao Luís, Pedro, Paula, Ana, Isabel, Ascensão, Cristiana, Raquel, Olga, Artur e Dra. Alice Lima.

Ao Instituto Português do Sangue e da Transplantação, por permitir a realização deste estágio nas suas instalações.

Ao Professor Fernando Bellém por todo o apoio e orientação dados ao longo deste período.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer à minha querida mãe por todo o apoio ao longo deste período que foi tão difícil para nós, embora debilitada, esteve sempre presente, e às minhas irmãs Milú, Marta e Nazaré assim como ao Emery por tanta força que me deram e tornaram este desafio mais leve e possível. Não esquecendo do meu pai que foi muito importante na minha educação e formação e acima de tudo um colega de profissão. Dedico-lhe a ele este trabalho, que certamente deve estar muito orgulhoso de mim.

Quero também agradecer às minhas colegas e amigas Ana Raquel, Fernanda Resende e Inês Viriato por todo o incentivo e apoio em muitas situações.

Muito obrigado!

## Resumo

---

O Estágio Laboratorial em Histocompatibilidade e Imunogenética Clínica é um programa de formação profissional de grande relevância para a área da saúde, especificamente nas especialidades de imunologia e transplante. O enquadramento deste estágio é essencial para a formação de profissionais altamente qualificados na área laboratorial de Histocompatibilidade e Imunogenética Clínica, com foco na avaliação e seleção de pares dador/recetor para transplantes. A relevância desta etapa é notável, considerando que o sucesso dos transplantes depende em grande parte da compatibilidade entre dador e recetor.(1–3) A Imunogenética é uma área essencial para identificar as características genéticas e moleculares de órgãos, tecidos ou células, a fim de prevenir a rejeição e aumentar a sobrevivência dos aloenxertos transplantados.(4,5) A compreensão de sistemas como Complexo Major de Histocompatibilidade, mecanismos de resposta imunitário, entre outros, é crucial para a seleção de dadores compatíveis, minimizando riscos e maximizando os resultados do transplante.

**Palavras-chave:** Histocompatibilidade, Imunogenética, Transplante, HLA

## **Abstract**

---

The Laboratory Internship in Histocompatibility and Clinical Immunogenetics is a professional training program of great relevance to the health area, specifically in the specialties of immunology and transplantation. The framing of this internship is essential for the training of highly qualified professionals in the laboratory area of Histocompatibility and Clinical Immunogenetics, with a focus on the evaluation and selection of donor/recipient pairs for transplants. The relevance of this stage is remarkable, considering that the success of transplants depends largely on the compatibility between donor and recipient. Immunogenetics is an essential area for identifying the genetic and molecular characteristics of organs, tissues, or cells, in order to prevent rejection and increase the survival of transplanted allografts. Understanding systems such as Major Histocompatibility Complex, immune response mechanisms, among others, is crucial for the selection of compatible donors, minimizing risks and maximizing transplant outcomes.

Keywords: Histocompatibility, Immunogenetics, Transplant, HLA

## Abreviaturas

---

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
C1q	Fração C1q do Complemento
CDC	<i>Complement-dependent Cytotoxicity Crossmatch</i>
CEDACE	Registo Português de Dadores de Medula Óssea
CMH	Complexo Major de Histocompatibilidade
CMIA	<i>Chemiluminescence Microparticle Immunoassay</i>
CMV	Citomegalovírus
CN	Controlo Negativo
CP	Controlo Positivo
CPH	Células Progenitoras Hematopoiéticas
CRC	Configuração e Rastreamento do Citómetro
CST	Centro de Sangue e Transplantação
DECH	Doença do Enxerto contra o Hospedeiro
DPBS	Tampão de solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco
DSA	<i>Donor Specific Antibodies</i>
DTT	Ditriotreitol
EBV	Epstein-Barr Vírus
ESTeSL	Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa
FCM	<i>Flow Cytometry Crossmatch</i>
GCCT	Gabinete de Coordenação de Colheitas e Transplantes
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HTLV	Vírus Linfotrópico de Linfócitos T Humanos
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IMGT/HLA	Banco de dados de Imunogenética HLA
IPST	Instituto Português do Sangue e Transplantação
LusoT	Base de dados Luso Transplante
MFI	<i>Median Fluorescence Intensity</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	R – Ficoeritrina
PRA	Pesquisa de Anticorpos contra Painel

RENDA	Registo Nacional de Não Dadores
RLU	<i>Relative Light Unit</i>
RPMI	Meio de cultura celular <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RPT	Registo Português do Transplante
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TCEH	Transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas
UCLA	Universidade de Califórnia, Los Angeles
UK NEQAS	United Kingdom National External Quality Assessment
UTR	Unidade Transplante Renal
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeat</i>

---

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1.	Cronograma das atividades .....	1
1.2.	Objetivo do estágio .....	2
1.2.1	Objetivos gerais.....	2
1.2.2	Objetivos específicos.....	3
1.3.	Justificação e pertinência do estágio.....	4
1.4.	Caracterização do local de estágio .....	4
<b>2</b>	<b>Enquadramento teórico .....</b>	<b>6</b>
2.1.	Introdução ao sistema imunitário .....	6
2.1.1	Sistema imunitário.....	6
2.1.1.1	Sistema imunitário inato.....	6
2.1.1.2	Sistema imunitário adaptativo .....	6
2.1.2	Aloreconhecimento.....	7
2.1.2.1	Aloreconhecimento Direto .....	7
2.1.2.2	Aloreconhecimento Indireto.....	8
2.1.2.3	Aloreconhecimento Semidireto .....	8
2.2.	Histocompatibilidade e sistema HLA .....	9
2.2.1.	Estrutura e funções das moléculas HLA .....	9
2.2.2.	Nomenclatura do sistema HLA .....	11
2.2.3.	Banco de dados IMGT/HLA.....	11
2.3.	Transplantes de órgãos sólidos .....	12
2.3.1.	Dadores vivos.....	12
2.3.2.	Dadores falecidos.....	13
2.4.	Transplante de células estaminais hematopoiéticas .....	14
2.4.1.	Tipos de dadores.....	14
2.4.2	“CEDACE” .....	15
2.5	Complicações decorrentes dos transplantes.....	16
2.5.1	Rejeição de transplante .....	16
2.5.1.1	Rejeição em Transplantes de Órgãos Sólidos.....	16
2.5.1.2	Rejeição em TCEH .....	18

2.5.2	Infeção .....	20
2.6.	Processo de doação e transplante.....	20
2.7.	Processo de referenciação e testes de compatibilidade.....	22
2.8.	Transplante de Tecidos.....	23
<b>3</b>	<b>Descrição das atividades.....</b>	<b>24</b>
3.1.	Descrição das atividades por laboratório .....	24
3.2.	Laboratório de imunogenética e genotipagem molecular .....	24
3.2.1.	Workflow .....	25
3.2.2.	Extração de ADN.....	25
3.2.2.1.	Métodos de Extração de ADN.....	25
3.2.3.	Estudo de quimerismo.....	27
3.2.4.	Genotipagem HLA.....	29
3.2.4.1.	Genotipagem HLA utilizando o Kit LinkSeq.....	30
3.2.4.2.	Genotipagem HLA utilizando NGS .....	32
3.3	Laboratório de alossensibilização e serologia HLA .....	34
3.3.1.	Tipagem eritrocitária AB0 e Rh (D).....	34
3.3.2.	Isolamento de linfócitos T e B.....	35
3.3.3.	Deteção de anticorpos anti-HLA classe I, II e MICA .....	36
3.3.4.	Identificação de anticorpos anti-HLA classe I ou II.....	38
3.3.5.	Identificação de anticorpos anti-HLA com fração C1q .....	39
3.3.6.	Pesquisa de anticorpos anti-HLA contra Painel.....	41
3.3.7.	Crossmatch CDC.....	42
3.4.	Citometria de fluxo e separação celular .....	44
3.4.1.	Separação celular.....	44
3.4.2.	Crossmatch FCM.....	46
3.5.	Laboratório de agentes transmissíveis.....	48
3.5.1.	Determinação de marcadores serológicos.....	49
3.6.	Controlo de qualidade .....	51
3.6.1.	Controlo de qualidade interno.....	52
3.6.2.	Controlo de qualidade externo.....	52
<b>4</b>	<b>Casos práticos .....</b>	<b>53</b>
4.1	Monitorização de quimerismo .....	53

4.1.1 Caso 1.....	53
4.1.2. Caso 2.....	54
4.2. Estudo HLA para transplantação renal (recetor e dador vivo) .....	56
<b>5 Reflexão crítica.....</b>	<b>58</b>
<b>6 Proposta de trabalho de investigação na área.....</b>	<b>59</b>
<b>7 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>61</b>
<b>8 Anexos .....</b>	<b>67</b>
8.1 Anexo 1 – Lei nº 12/93, de 22 de Abril, republicada segundo a Lei n.º 22/2007, de 29 de Junho (versão atualizada pela Lei n.º 12/2009, de 26 de Março) .....	67
8.2. Anexo 2 – Lei nº 36/2013, de 12 de Junho.....	2
8.3. Anexo 3 – Despacho 22/95, de 4 de Agosto .....	11
8.4. Anexo 4 – Portaria nº165/2012, de 22 de Maio .....	13
8.5. Anexo 5 – Procedimento de Extração de ADN com Kit QIAGEN .....	17
8.6. Anexo 6 – Procedimento de Monitorização do Quimerismo Celular no Transplante de Medula Óssea Alogénico .....	22
8.7. Anexo 7 – Procedimento para aceitação de Amostras de Sangue.....	27
8.8. Anexo 8 – Procedimento da Genotipagem HLA por NGS .....	30
8.9. Anexo 9 – Procedimento da Tipagem Eritrocitária AB0/Rh em Card.....	46
8.10. Anexo 10 – Procedimento de Isolamento de Linfócitos T, B ou Totais do Sangue Periférico por Seleção Negativa Imunomagnética.....	50
8.11. Anexo 11 – Procedimento de Detecção de Anticorpos Anti-HLA classe I, II e MICA53 .....	59
8.12. Anexo 12 – Procedimento de Pesquisa e Identificação de Anticorpos anti-HLA Classe I e II Fixadores da Fração C1q do Complemento.....	59
8.13. Anexo 13 – Procedimento de Pesquisa de Aloanticorpos anti-HLA usando um Painel de Células.....	63
8.14. Anexo 14 – Procedimento de Crossmatch Anti-Linfocitário por Citotoxicidade Mediada pelo Complemento.....	66
8.15. Anexo 15 – Procedimento do Crossmatch Anti-Linfocitário por Citometria de Fluxo Rotina Protocolo Halifaster .....	69
8.16. Anexo 16 – Circular Normativa N°001-A/CN-IPST, IP/2018 de 11 de abril.....	74
<b>9 Apêndices.....</b>	<b>77</b>
9.1. Apêndice 1 – Dados do Caso 1 do Estudo de Quimerismo .....	77
9.2. Apêndice 2 – Dados do Caso 2 do Estudo de Quimerismo .....	87
9.3. Apêndice 3 – Dados do Caso de Dador Vivo .....	105

## **Índice de Figuras**

FIGURA 2.1. Representação esquemática do complexo HLA que se encontra no CMH localizado no braço curto do cromossoma 6p21.3.....	9
FIGURA 2.2. Estrutura das moléculas HLA classe I e II (letras A e B, respetivamente).....	10
FIGURA 2.3. Nomenclatura do sistema HLA.....	11
FIGURA 3.2. Grau de aglutinação, relatório gerado pelo equipamento Echo Immucor .....	35
FIGURA 3.3. Resultados da técnica de aglutinação em Card Gel.....	35
FIGURA 3.4. Resultados de CDC.....	44

## **Índice de Tabelas**

TABELA 1.1. Cronograma da distribuição das diferentes atividades realizadas ao longo do estágio. ....	2
TABELA 2.1. Comparação dos mecanismos de aloreconhecimento. ....	7
TABELA 2.2. Dados dos antígenios HLA da classe I (Abril 24).....	12
TABELA 3.1. Descrição das diferentes atividades realizadas por laboratório ao longo do estágio. ....	24
TABELA 3.2. Tipos de quimerismo.....	28

# 1 Introdução

---

O presente relatório integra-se no âmbito do estágio do segundo ano do Mestrado em Tecnologias Clínicas Laboratoriais, realizado na Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL).

A realização de um estágio de natureza profissional permite o aprofundamento dos conhecimentos já adquiridos assim como a aquisição de novas competências. Desta forma, um estágio promove um conhecimento teórico-prático integrado e atualizado que permite uma resposta adequada e eficaz aos novos desafios principalmente em áreas como a Transplantação, onde a grande componente prática leva a um maior confronto com o ambiente laboratorial e tecnológico.

O estágio relatado decorreu de 02 de novembro de 2023 a 30 de abril de 2024 no Centro de Sangue e Transplantação (CST) de Lisboa do Instituto Português do Sangue e Transplantação (IPST), mais concretamente na área da Transplantação – Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética Clínica.

O estágio permitiu compreender profundamente os processos de avaliação da compatibilidade – um fator crítico para o sucesso dos transplantes –, incluindo por exemplo a genotipagem do Complexo Major de Histocompatibilidade (CMH), também conhecido como *Human Leucocyte Antigen* (HLA) ou Antígeno Leucocitário Humano, testes de *crossmatch* e a importância da imunogenética na personalização dos protocolos de transplantação.

## 1.1. Cronograma das atividades

O estágio foi dividido pelos vários laboratórios do Centro de Transplantação (Tabela 1.1), como o laboratório de Imunogenética e Genotipagem Molecular, o laboratório de Alossensibilização e Serologia HLA, o laboratório de Citometria de Fluxo e Separação Celular e o laboratório de Agentes Transmissíveis e Seroteca, de forma que houvesse um contacto mais preciso e focado nas várias técnicas.

**TABELA 1.1. Cronograma da distribuição das diferentes atividades realizadas ao longo do estágio.**

	2023		2024			
	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril
Laboratório Imunogenética e Genotipagem Molecular	X	X				X
Alossensibilização e Serologia HLA			X	X		X
Citometria de Fluxo e Separação Celular					X	X
Agentes Transmissíveis					X	X
Fundamentação de casos de estudo						X
Interpretação dos resultados de casos de estudo						X

## 1.2. Objetivo do estágio

### 1.2.1 Objetivos gerais

Os objetivos propostos para a realização deste estágio foram:

- Desenvolver competências na área da saúde para atuar em laboratórios especializados em Histocompatibilidade e Imunogenética: este objetivo visa proporcionar uma formação abrangente e aprofundada, capacitando os estagiários para lidar com as complexidades e exigências dos procedimentos laboratoriais na área da transplantação.
- Adquirir competências em novos procedimentos e protocolos das técnicas laboratoriais: a atualização constante sobre as técnicas mais recentes é fundamental para garantir a excelência e precisão nos resultados laboratoriais.

- Melhorar a capacidade de interpretação de resultados: a interpretação correta, precisa e crítica dos resultados laboratoriais é crucial para o apoio na tomada de decisões clínicas.
- Organizar o tempo disponível de forma a programar, executar e avaliar o trabalho de maneira eficaz e eficiente: a gestão eficaz do tempo e dos recursos é essencial para a produtividade e qualidade do trabalho realizado no laboratório.
- Contribuir para o bem-estar da equipa de trabalho: um ambiente de trabalho colaborativo e positivo é fundamental para o sucesso coletivo. Este objetivo destaca a importância de promover a cooperação, comunicação e bem-estar entre os membros da equipa.

Além destes objetivos, pretende-se que seja desenvolvida uma atitude profissional e ética. A formação contínua, o espírito crítico e a capacidade de adaptação a novas situações foram igualmente fomentadas ao longo do estágio, preparando os futuros profissionais para enfrentar os desafios da área de Histocompatibilidade e Imunogenética.

### 1.2.2 Objetivos específicos

Aprendizagem de técnicas laboratoriais como:

1. Extração de Ácidos Desoxirribonucleicos;
2. Monitorização do Quimerismo Pós-transplante de Células Estaminais Hematopoiéticas;
3. Genotipagem do Antígeno Leucocitário Humano por *Next Generation Sequencing*;
4. Estudo de Compatibilidade ABO e Rh par dador/recetor;
5. Isolamento de células mononucleares por separação magnética negativa;
6. *Crossmatch* Linfocitário por Citotoxicidade mediada pelo Complemento;
7. *Crossmatch* Linfocitário por Citometria de Fluxo;
8. Avaliação do perfil de aloreatividade anti-Antígeno Leucocitário Humano, no peri-transplante, por tecnologia Xmap;
9. Análise de anticorpos anti-Antígeno Leucocitário Humano, no período pós-transplante com identificação de Anticorpos Específicos do Dador por tecnologia Xmap;
10. Pesquisa de marcadores para agentes transmissíveis por Quimioluminescência;
11. Interpretação, validação de resultados e emissão dos relatórios no contexto clínico do doente;
12. Adquirir conhecimentos em imunogenética e imunologia de transplantação;
13. Ética e confidencialidade.

### **1.3. Justificação e pertinência do estágio**

O estágio profissional é um processo de aprendizagem indispensável na transição entre a formação académica e a inserção no mercado de trabalho, servindo como uma ponte crucial para aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos em ambiente académico num contexto real de trabalho. Durante este período, os estagiários não só se familiarizam com o ambiente laboral, mas também adquirem competências profissionais e pessoais. Além disso, os estágios proporcionam uma oportunidade para construir relações profissionais e uma rede de contactos que poderá ser útil no futuro. Neste momento, é também dada a oportunidade de desenvolver competências sociais a nível da comunicação, trabalho em equipa, resolução de problemas e adaptabilidade. Competências essas, essenciais no mercado de trabalho atual e que contribuem significativamente para o desenvolvimento quer profissional quer pessoal do indivíduo.

Um estágio proporciona ainda a compreensão em primeira mão de como uma organização funciona, incluindo a cultura da instituição e as expectativas da mesma em relação a futuras oportunidades de carreira. Estes estágios também são um período de avaliação pessoal que permite aos alunos avaliar se a área escolhida realmente corresponde aos seus interesses e expectativas.

Deste ponto de vista, este estágio torna-se imensamente valioso por fornecer a possibilidade de adquirir experiência prática, que enriquecerá o currículo tanto do ponto de vista académico como profissional, especialmente na área de Histocompatibilidade, sendo uma experiência decisiva para aprofundar a compreensão prática e impulsionar a carreira futura.

Durante o estágio, houve sempre o objetivo de aperfeiçoar a capacidade em executar as técnicas propostas, analisar/interpretar resultados e compreender como essas informações influenciam as decisões em processos de transplante, para que com dedicação, precisão e entusiasmo, fosse possível assegurar que todos os procedimentos eram cumpridos e ajudar a equipa na obtenção dos melhores resultados.

### **1.4. Caracterização do local de estágio**

O estágio foi realizado na área de Transplantação do CST de Lisboa, pertencente ao IPST, cujas instalações se localizam no Hospital Pulido Valente (Lisboa) desde 2005.

O IPST é um instituto público integrado na administração indireta do Estado, mas dotado de autonomia técnica, administrativa, financeira e património próprio. O instituto resultou da fusão do antigo Instituto Português do Sangue, dos Centros de Histocompatibilidade de Lisboa, Porto e Coimbra e de parte da extinta Autoridade para os Serviços de Sangue e da Transplantação(6).

As principais funções do IPST são:

- Assegurar (a nível nacional e regional) a colheita, processamento, armazenamento e distribuição de sangue e seus componentes;
- Gerir o Registo Português de Dadores de Medula Óssea (“CEDACE”);
- Gerir o processamento, armazenamento e distribuição de tecidos e células do cordão umbilical de origem humana e as atividades relacionadas com a colheita de órgãos e tecidos;
- Assegurar a realização dos estudos laboratoriais de doentes necessários à transplantação de órgãos, tecidos e células.

Para isso, o IPST possui várias áreas laboratoriais que permitem o estudo da transplantação, quer de órgãos sólidos quer de progenitores hematopoiéticos, como por exemplo a genotipagem do sistema HLA, identificação de aloanticorpos HLA, estudo de doenças transmissíveis, imunidade celular e citometria de fluxo.

## 2 Enquadramento teórico

---

### 2.1. Introdução ao sistema imunitário

#### 2.1.1 Sistema imunitário

O sistema imunitário é composto pelo conjunto de órgãos, tecidos e células responsáveis pela defesa do organismo contra agentes estranhos (vírus, bactérias, etc). A principal função fisiológica do sistema imunitário passa por prevenir infeções e erradicar infeções estabelecidas, mas também tem um papel essencial na identificação e destruição de células cancerígenas, ajudando a prevenir o desenvolvimento e a progressão de tumores. Tal processo é resultado da capacidade que este sistema tem em distinguir o que “é próprio” (*self*) do que “não é próprio” (*non-self*) do organismo e fornece proteção crucial ao hospedeiro contra agentes patogénicos. O sistema imunitário pode ser dividido em dois sistemas principais que interagem entre si, o sistema imunitário inato (imunidade inata) e o sistema imunitário adaptativo (imunidade específica ou adquirida).(7)

##### 2.1.1.1 Sistema imunitário inato

O sistema imunitário inato é o primeiro a responder a um agente estranho, sendo a primeira linha de defesa contra os agentes patogénicos.(8) Tem uma resposta rápida e inespecífica, envolvendo barreiras físicas e/ou químicas, células fagocíticas (como neutrófilos e macrófagos) e substâncias antimicrobianas.(7) Este sistema é responsável pela eliminação de agentes patogénicos simples, como bactérias e vírus. O sistema imunitário inato tem ainda a capacidade de apresentar os antígenos às células do sistema imunitário adaptativo através de células apresentadoras de antígenos ou *Antigen Presenting Cells* (APC), como os macrófagos e as células dendríticas.(9)

##### 2.1.1.2 Sistema imunitário adaptativo

O sistema imunitário adaptativo é mais específico e organizado, mediado por, mas não exclusivamente, linfócitos B (que produzem anticorpos) e linfócitos T (que coordenam a resposta imunológica celular). Estas células têm na sua membrana celular um conjunto de recetores de reconhecimento de antígenos altamente específicos – recetores de células T e recetores de células B, respetivamente.(8)

É este sistema o responsável pela eliminação de agentes patogénicos mais complexos, como bactérias resistentes ou vírus que evoluíram para escapar do sistema imunitário inato,(7) sendo rigidamente controlado por redes de sinalização em todos os tipos de células imunológicas, para lançar uma resposta imunitária apropriada contra infeções sem causar danos aos tecidos.(8)

Enquanto o sistema imunitário inato responde de forma genérica a qualquer agente patogénico, o sistema imunitário adaptativo pode reconhecer e lembrar agentes patogénicos previamente apresentados devido à ação dos linfócitos T e B. Esta capacidade de memória permite uma resposta mais rápida e eficaz em encontros subsequentes com o mesmo patógeno. Além disso, o sistema adaptativo pode adaptar-se e evoluir ao longo do tempo, desenvolvendo respostas mais fortes e direcionadas contra os agentes patogénicos. A especificidade e memória do sistema imunitário adaptativo são cruciais para a eficácia das vacinas e para a proteção a longo prazo contra doenças infecciosas.(10,11)

## 2.1.2 Alloreconhecimento

O alloreconhecimento é um mecanismo fundamental na rejeição do transplante. Existem três vias principais de alloreconhecimento: direto, indireto e semidireto (Tabela 2.1). Cada uma destas vias tem um papel distinto na ativação do sistema imunológico do recetor e na subsequente rejeição do enxerto.(12,13)

**TABELA 2.1. Comparação dos mecanismos de alloreconhecimento.**

<b>Aloreconhecimento</b>	<b>Velocidade</b>	<b>Principais Células Imunitárias</b>	<b>Tipo de Rejeição</b>	<b>Mecanismo</b>
<b>Direto</b>	Rápido	Linfócitos T citotóxicos (CD8+) e auxiliares (CD4+)	Principalmente aguda	Reconhecimento direto das moléculas de CMH do dador.
<b>Indireto</b>	Mais lento	Linfócitos T auxiliares (CD4+)	Principalmente crónica	APCs do recetor apresentam fragmentos de CMH do dador nas suas próprias moléculas de CMH
<b>Semidireto</b>	Intermédio	Linfócitos T (CD4+ e CD8+)	Tanto aguda quanto crónica	APCs do recetor apresentam moléculas de CMH do dador diretamente aos linfócitos T

### 2.1.2.1 Alloreconhecimento Direto

No reconhecimento direto, os linfócitos T do recetor reconhecem diretamente as moléculas de CMH do dador que estão presentes nas células do enxerto como antígenos estranhos.

O alloreconhecimento direto é particularmente importante nas fases iniciais do transplante pois, se não for bloqueado atempadamente, este processo de rápida ativação dos linfócitos T citotóxicos resulta numa resposta imunitário aguda e intensa, levando à rejeição aguda.(14)

O processo de reconhecimento direto pode ser dividido nos seguintes passos:

1. Apresentação de antígenos: As células do enxerto apresentam diretamente os antígenos de CMH às células T do recetor.

2. Ativação dos linfócitos T: Os linfócitos T citotóxicos (CD8+) e os linfócitos T auxiliares (CD4+) reconhecem estas moléculas de CMH alogénicas.
3. Resposta imunitário: A ativação dos linfócitos T leva à proliferação e diferenciação em células efectoras que atacam o enxerto, resultando num processo de destruição dos tecidos, que por sua vez irá promover a inflamação e citotoxicidade.(15,16)

#### 2.1.2.2 Aloreconhecimento Indireto

Neste mecanismo, as APCs do recetor processam fragmentos das proteínas do CMH do dador e apresentam-nos nas suas próprias moléculas de CMH. Este processo é mais lento que o reconhecimento direto e está associado a uma resposta imunitária crónica.

O processo de reconhecimento indireto pode ser dividido nos seguintes passos:

1. Captura de antigénios: As APCs do recetor capturam, processam e apresentam fragmentos das proteínas de CMH do dador.
2. Ativação dos linfócitos T auxiliares (CD4+): Estes linfócitos reconhecem os antigénios apresentados pelas APCs do recetor.
3. Produção de anticorpos: A ativação prolongada dos linfócitos T auxiliares leva à ativação de linfócitos B e subsequente produção de anticorpos específicos contra os antigénios do dador. Este processo contribui para a rejeição crónica, que envolve a formação de anticorpos e a inflamação persistente.(14,16,17)

#### 2.1.2.3 Aloreconhecimento Semidireto

Esta via combina características dos mecanismos direto e indireto. Neste processo, os linfócitos T do recetor reconhecem as moléculas de CMH do dador apresentadas pelas células do enxerto que foram adquiridas por APCs do recetor. Isto permite uma ativação mista onde tanto o reconhecimento direto quanto o indireto ocorrem simultaneamente. Desta forma, o reconhecimento semidireto pode contribuir tanto para a rejeição aguda quanto para a crónica, proporcionando um mecanismo contínuo de reconhecimento do enxerto.

O processo de reconhecimento semidireto pode ser dividido nos seguintes passos:

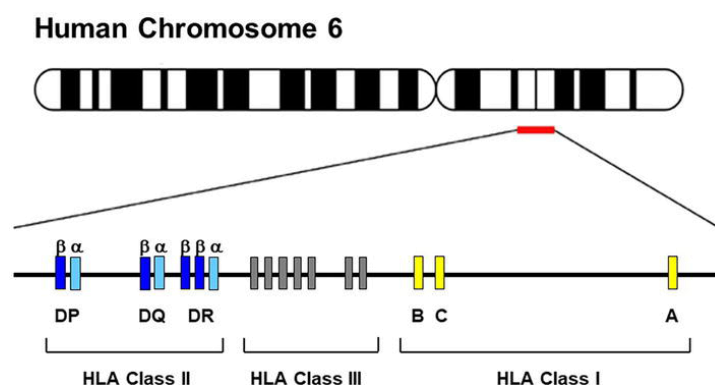
1. Aquisição de antigénios do CMH do dador: As APCs do recetor capturam as moléculas de CMH intactas das células do dador.
2. Apresentação a linfócitos T: As APCs do recetor que adquiriram as moléculas de CMH do dador apresentam estas moléculas diretamente aos linfócitos T do recetor.
3. Resposta imunitário mista: Este reconhecimento semidireto permite uma ativação mista, onde tanto a resposta direta quanto a indireta ocorrem simultaneamente. Pode contribuir para a rejeição tanto aguda quanto crónica, proporcionando um mecanismo contínuo de reconhecimento do enxerto. (16,18)

## 2.2. Histocompatibilidade e sistema HLA

A histocompatibilidade é um conceito central na biologia e imunologia, referindo-se à compatibilidade entre tecidos de diferentes indivíduos. Esta compatibilidade é crucial para diversas interações imunológicas, determinando como o corpo reconhece e responde a substâncias estranhas. A histocompatibilidade na transplantação é determinada pelos genes HLA que se encontram codificados no CMH, localizado no braço curto do cromossoma 6, na banda 6p21.3. (Figura 2.1). Existem três classes de HLA: a classe I, a classe II e a classe III, mas a classe I e II são as mais relevantes na histocompatibilidade pois são expressas na superfície das células.(19,20)

A pesquisa contínua no campo da histocompatibilidade e imunologia procura estratégias para minimizar a incidência de rejeições e outros eventos adversos melhorando assim a esperança e qualidade de vida. O CMH desempenha um papel fundamental na resposta imunológica e na determinação da compatibilidade entre dador e recetor em transplantes. A correspondência adequada nos alelos HLA é essencial para minimizar o risco de rejeições, que é crucial para o sucesso dos transplantes.(19,21)

Além do papel fundamental na resposta imunológica em transplantação, a variabilidade nos genes HLA é associada a uma predisposição a várias doenças autoimunes, por exemplo, certos alelos HLA são mais comuns em indivíduos com condições como diabetes tipo 1, esclerose múltipla e artrite reumatoide. Nesses casos, a identificação inadequada de antígenos próprios pelo sistema imunológico leva a uma resposta contra os próprios tecidos do corpo, resultando em inflamação e dano tecidual.(19,22–24)



**FIGURA 2.1.** Representação esquemática do complexo HLA que se encontra no CMH localizado no braço curto do cromossoma 6p21.3. (Fonte: 10.5772/intechopen.1001105)

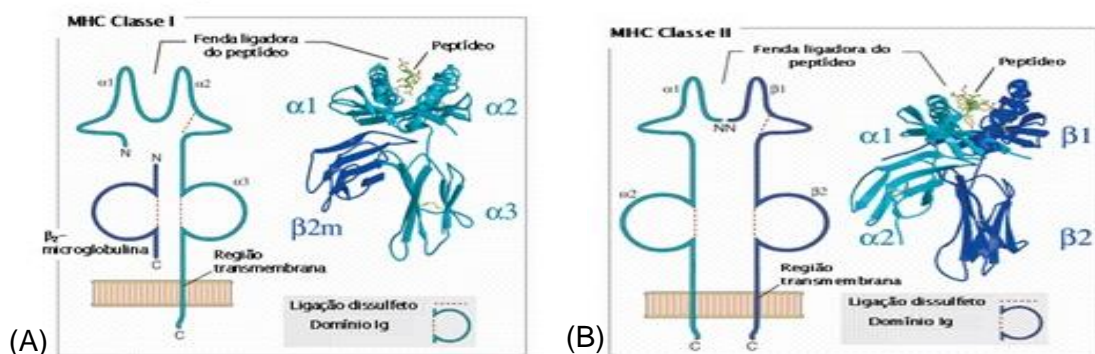
### 2.2.1. Estrutura e funções das moléculas HLA

As moléculas pertencentes ao sistema HLA têm como principal função apresentar os péptidos derivados de agentes patogénicos aos linfócitos T, levando a que estes desencadeiem a resposta imunitária adaptativa. O linfócito T reconhece a molécula HLA e o péptido que esta

apresenta, tendo a capacidade de distinguir entre o *self* e *non-self*, o que constitui a principal barreira imunológica à transplantação.(19,25,26)

As moléculas da classe I encontram-se associadas com a  $\beta_2$ -microglobulina, codificada pelo cromossoma 15.(27) Está ancorada à membrana apenas pela sua cadeia  $\alpha$ , formada por três domínios extracelulares,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ , um domínio transmembranar e um citoplasmático. Os domínios  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  formam o local de ligação aos péptidos (Figura 2.2 A). A classe I apresenta os péptidos intracelulares provenientes do citoplasma aos linfócitos T citotóxicos CD8+, que desencadeiam uma resposta imunitária e conseqüente morte das células infetadas. Estas moléculas são expressas na maioria das células nucleadas, podendo variar no seu nível de expressão.(28,29)

As moléculas da classe II são formadas por duas cadeias polimórficas associadas não covalentemente, a  $\alpha$  e a  $\beta$ , sendo que ambas atravessam a membrana. Cada uma das cadeias possui dois domínios,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  (Figura 2.2 B). Os péptidos ligam-se aos domínios  $\alpha_1$  e  $\beta_1$ , local que permite a ligação de péptidos maiores devido à sua conformação. A principal função da classe II é apresentar péptidos extracelulares aos linfócitos T auxiliares CD4+. A resposta imunitária incluirá a ativação dos linfócitos B para produção de anticorpos e posterior ativação de linfócitos T.(19,30–32)



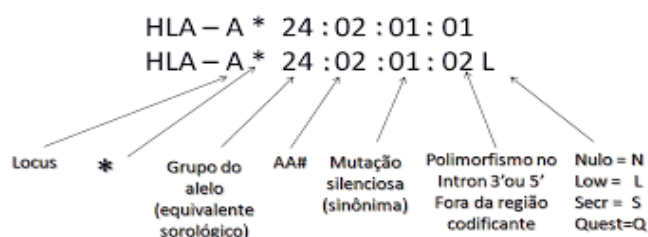
**FIGURA 2.2. Estrutura das moléculas HLA classe I e II (letras A e B, respectivamente).** (Fonte: <https://cromosomowiki.blogspot.com/2017/02/nocoes-basicas-de-imunogenetica.html>)

As proteínas de CMH de classe I formam um recetor funcional na maioria das células nucleadas do corpo e os principais genes responsáveis pela sua codificação são o HLA-A, HLA-B e HLA-C. As proteínas da classe II normalmente são encontradas em APCs e os principais genes são o HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP. As proteínas da Classe III correspondem a componentes do sistema do complemento.(19,33)

## 2.2.2. Nomenclatura do sistema HLA

Devido à imensa diversidade genética resultante do elevado polimorfismo do sistema HLA, foi necessário atribuir uma nomenclatura aos loci HLA, pelo Comité de Nomenclatura da Organização Mundial de Saúde (OMS).(34)

A nomenclatura HLA é um sistema padronizado para identificar e nomear os diferentes alelos dos genes do CMH em humanos e é continuamente atualizada na base de dados IMGT/HLA à medida que novos alelos são descobertos e caracterizados. A identificação de um alelo HLA é composta por uma série de letras e números que denotam características específicas do gene (Figura 2.3). A forma da expressão de determinados alelos é sinalizada pela introdução dos sufixos adicionais. O sufixo N (de *null*) indica alelos nulos, genes que não codificam produtos proteicos; L (de *low*) indica que o gene codifica uma proteína de baixa expressão; S (de *secreted*) codifica uma molécula encontrada na forma solúvel e não expressa na superfície celular; e Q (de *questionable*) indica que é indefinido, ainda sem definição se a mutação gera ou não modificação na expressão.(35,36)



**FIGURA 2.3. Nomenclatura do sistema HLA.** (Fonte: <https://www.sanarmed.com/artigos-cientificos/nomenclatura-dos-fatores-do-sistema-hla>)

## 2.2.3. Banco de dados IMGT/HLA

O banco de dados IMGT/HLA contém as sequências alélicas dos genes do sistema HLA, localizados dentro do CMH, um dos sistemas mais complexos e polimórficos do genoma humano. A nomeação de novos genes HLA e sequências de alelos é responsabilidade do Comité de Nomenclatura para Fatores do Sistema HLA da OMS. A base de dados IMGT/HLA fornece as ferramentas necessárias, sequências genéticas, informações funcionais e dados relacionados a esses alelos para o controlo de qualidade destas sequências, bem como a divulgação destes dados.(37)

O banco de dados é atualizado regularmente para refletir novas descobertas e atualizações na nomenclatura dos alelos HLA. A divulgação de novos nomes e sequências de alelos é de extrema importância no ambiente clínico e investigacional na medida em que ajuda no estudo da variabilidade genética do sistema HLA, importante em transplantes e em compreender as respostas imunológicas.

Atualmente, já foram descritos e guardados no banco de dados IMGT/HLA sequências e referências de muitos alelos de HLA de classe I e de classe II. O HLA-B é o alelo mais polimórfico entre os HLA classe I, como demonstra a tabela 2.2 com dados atualizados em abril de 2024.

**TABELA 2.2. Dados dos antígenios HLA da classe I (Abril 24).**

CHM Classe I		
Locus	Alelos	Proteínas
<i>Antígenios Major</i>		
HLA-A	8288	4848
HLA-B	9877	5883
HLA-C	8361	4604

(Fonte: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/about/statistics/>)

## 2.3. Transplantes de órgãos sólidos

Entre os órgãos transplantados, pode enumerar-se o rim (o mais comum), coração, fígado, pâncreas e pulmão, entre outros. Existem dois tipos de doadores de órgãos: os doadores vivos e os doadores falecidos.

### 2.3.1. Doadores vivos

A doação de órgãos por doadores vivos é um gesto altruísta e nobre, onde um indivíduo saudável voluntariamente se submete a uma cirurgia para beneficiar outra pessoa. Este processo é feito com rigorosas considerações éticas e legais (Anexo 1), garantindo que o dador esteja plenamente ciente dos riscos e consequências da cirurgia, bem como dos benefícios que a sua ação proporcionará ao recetor. Nenhum órgão pode ser removido de indivíduos incapazes de dar o seu consentimento informado, como menores de idade ou pessoas legalmente incompetentes, salvo em circunstâncias excepcionais previstas pela lei, que são cuidadosamente reguladas para proteger os direitos e o bem-estar do dador. (38,39) Os doadores vivos podem doar uma variedade de órgãos e tecidos. A doação de um rim é a mais comum, pois os seres humanos podem viver com apenas um rim saudável. Além disso, é possível doar parte do fígado, dado que este órgão tem a capacidade de regeneração, permitindo que tanto o dador como o recetor recuperem a função hepática completa após a cirurgia. Partes do pâncreas e do pulmão também podem ser doadas, embora estes procedimentos sejam mais complexos e muito raros. A doação de órgãos por doadores vivos pode, assim, salvar vidas e melhorar significativamente a qualidade de vida dos recetores.(40)

Os dadores vivos podem ser:

- Dadores geneticamente relacionados ao recetor, como pais, irmãos ou filhos, o que muitas vezes resulta em maior compatibilidade imunológica e melhores resultados no transplante;
- Dadores emocionalmente relacionados, como cônjuges ou amigos próximos, também são comuns e partilham um vínculo afetivo significativo com o recetor, motivando a doação;
- Dadores não relacionados, onde existem programas que permitem a doação renal cruzada, onde pares de dadores e recetores incompatíveis trocam órgãos, aumentando as hipóteses de encontrar uma compatibilidade adequada. Podem ser voluntários altruístas dispostos a ajudar um desconhecido em necessidade, independentemente do tipo de relação.

Todos os dadores vivos passam por uma avaliação médica e psicológica rigorosa para garantir que estão aptos a doar sem comprometer a sua própria saúde e bem-estar.

Assim, a doação de órgãos por dadores vivos continua a ser uma prática vital que salva-vidas, destacando a importância da generosidade e do espírito humano em situações de necessidade médica.(40)

### 2.3.2. Dadores falecidos

A maioria dos órgãos e tecidos utilizados nos transplantes provém de dadores falecidos. Segundo o Decreto-Lei nº 36, de 2013 (Anexo 2), todos os cidadãos nacionais e estrangeiros residentes em Portugal são considerados potenciais dadores falecidos, a menos que tenham manifestado formalmente a sua vontade de não serem dadores junto do Ministério da Saúde, passando a pertencer ao Registo Nacional de Não Dadores (RENDA).(40,41)

Existem dois tipos principais de dadores falecidos, cada um com características específicas que determinam quais órgãos e tecidos podem ser doados:

- Dador em morte cerebral: Este tipo de dador é identificado quando há uma cessação completa e irreversível de todas as funções cerebrais, enquanto o coração e os pulmões continuam a funcionar com suporte artificial. A morte cerebral é confirmada através de critérios clínicos e neurológicos, incluindo exames de imagem, testes de reflexos neurológicos, entre outros. Dadores em morte cerebral são potenciais dadores de todos os órgãos vitais, tais como coração, pulmões, fígado, pâncreas, intestinos e rins, além de diversos tecidos como córneas, ossos e vasos sanguíneos. A manutenção artificial da circulação sanguínea e oxigenação dos órgãos permite que estes sejam colhidos em condições ótimas para transplante.(42)
- Dador em paragem cardiocirculatória: Também conhecidos como dadores após morte circulatória, estes indivíduos são aqueles cujo coração parou de bater de forma irreversível. A paragem cardiorrespiratória é confirmada quando há ausência de

batimentos cardíacos e de respiração espontânea por um determinado período de tempo, conforme protocolos específicos. A colheita de órgãos nestes casos requer uma coordenação rápida e precisa para garantir a viabilidade dos órgãos, que incluem rins, fígado, pâncreas e pulmões, além de vários tecidos. A abordagem deve ser rápida para minimizar o período de isquemia quente, onde os órgãos não recebem oxigenação adequada.(43)

A legislação portuguesa visa maximizar a disponibilidade de órgãos e tecidos para transplante, garantindo simultaneamente o respeito pelos desejos dos indivíduos. O sistema de "opt-out" implementado em Portugal, onde todos são presumidos doadores a menos que registem a sua oposição, tem-se mostrado eficaz na ampliação do número de doadores disponíveis, salvando inúmeras vidas e melhorando a saúde de muitos pacientes.

## **2.4. Transplante de células estaminais hematopoiéticas**

O transplante de células estaminais hematopoiéticas (TCEH) envolve a transfusão de células progenitoras hematopoiéticas (CPH) saudáveis no recetor. Estas células substituem as células doentes na medula óssea e restabelecem a hematopoiese saudável.(44,45)

O TCEH tornou-se ao longo das últimas décadas um meio de tratamento para diferentes patologias, é efetuado não só em pacientes com doenças hematológicas malignas, mas também em pacientes com distúrbios hematológicos não-malignos, como algumas anemias hereditárias, imunodeficiência congénita e algumas doenças metabólicas hereditárias.(46)

O processo de TCEH é um procedimento complexo. Para se realizar o transplante, o doente não deve estar numa fase aguda da doença e tem de estar estável, para que não haja alterações genéticas que interfiram na sua genotipagem HLA (que se refere a identificação dos alelos específicos dos genes HLA presentes no Ácidos Desoxirribonucleicos (ADN) de um individuo, que pertencem a diferentes classes e loci dentro do CMH e são: HLA Classe I: HLA-A,-B,-C e HLA Classe II: HLA-DRB1, HLA-DRB3/4/5, HLA-DQB1 e HLA-DPB1).Dependendo do tipo de patologia, maligna ou não-maligna, pode ter de ser induzida uma aplasia medular ao doente, através da toma de fármacos para que as células não continuem a sua proliferação e possa haver a sua substituição por células do dador.(47,48)

### **2.4.1. Tipos de doadores**

Os doadores de células estaminais hematopoiéticas podem ser classificados em três categorias principais: doadores aparentados, doadores não-aparentados e doadores autólogos.(49)

Cada tipo de dador oferece as suas vantagens e desafios. A escolha do tipo de dador depende de vários fatores, incluindo a compatibilidade HLA, a condição médica do recetor, a disponibilidade de doadores e a urgência do transplante. A contínua pesquisa e o

desenvolvimento de tecnologias de transplante, juntamente com a expansão dos registos de dadores, têm melhorado significativamente os resultados e a acessibilidade dos transplantes de células estaminais hematopoiéticas.(47)

#### Dadores aparentados:

- Dadores idênticos: O dador é um irmão ou irmã do recetor e possui uma correspondência completa de HLA. A compatibilidade total HLA é ideal para minimizar o risco de rejeição do enxerto e da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH).(50,51)
- Dadores haploidênticos: O dador é um parente próximo, como um pai, mãe ou irmão, que partilha metade dos antígenos HLA com o recetor. A doação haploidêntica é uma alternativa viável quando não há um dador totalmente compatível disponível, embora os riscos de DECH sejam maiores.(52,53)

#### Dadores não-aparentados:

- Dadores compatíveis não-aparentados: Encontrados através de registos de dadores voluntários, estes dadores não têm ligação genética com o recetor, mas possuem uma compatibilidade HLA adequada. A identificação de um dador compatível envolve a pesquisa em bancos de dados internacionais, como “CEDACE” e outros registos internacionais.(54)
- Cordão umbilical: As células estaminais hematopoiéticas também podem ser obtidas do sangue do cordão umbilical de recém-nascidos. Esta fonte é vantajosa devido à maior plasticidade das células estaminais e à menor probabilidade de causar DECH severa, apesar de a quantidade de células disponíveis ser limitada.(40)

#### Dadores autólogos:

Transplante Autólogo: As células estaminais são colhidas do próprio paciente antes de receber tratamentos como quimioterapia ou radioterapia. Após o tratamento, as células são reintroduzidas no paciente para reconstituir a medula óssea. Embora não seja uma opção para todos os tipos de doenças, este tipo de transplante elimina o risco de DECH uma vez que o dador e o recetor são a mesma pessoa, embora não seja uma opção para todos os tipos de doenças.(55)

### 2.4.2 CEDACE

Como mencionado anteriormente, nem todos os recetores de um TCEH têm acesso a um dador dentro da sua família direta. Para responder às necessidades dos doentes que necessitam de um TCEH e não possuem um dador familiar compatível, foi necessário criar um Registo Nacional de Dadores Voluntários de Medula Óssea.

O Registo foi criado em 1995 pelo Despacho 22/95 de 4 de agosto (Anexo 3) com a designação de “CEDACE”. Anteriormente integrado na estrutura do Centro de

Histocompatibilidade do Sul, a atividade do “CEDACE” foi introduzida na orgânica do IPST em agosto de 2012 dando cumprimento ao disposto na Portaria n.º 165/2012 de 22 de maio (Anexo 4).(41,56)

Em termos de organização e por definição do despacho, compete ao “CEDACE”:

- Organizar os pedidos de doadores de células de medula óssea, estaminais ou de sangue do cordão, nacionais ou internacionais;
- Coordenar as atividades de doação, conservação e transplante de células de medula óssea, estaminais ou de sangue de cordão;
- Coordenar e organizar em colaboração com os Centros de Histocompatibilidade o recrutamento e aconselhamento de doadores;
- Coordenar os dados de tipagem de doadores eventuais e manter atualizado o respetivo registo.
- Manter uma relação e informação permanente sobre os doadores eventuais com os centros hospitalares de colheita e transplantação e com as unidades de Imunohemoterapia.(56)

## 2.5 Complicações decorrentes dos transplantes

### 2.5.1 Rejeição de transplante

A transplantação de CPH e de órgãos sólidos representa uma oportunidade vital para pacientes com doenças terminais ou debilitantes. No entanto, um dos maiores desafios destes procedimentos é a rejeição do transplante, onde nos transplantes de órgãos sólidos o sistema imunológico do recetor identifica o tecido transplantado como estranho e desencadeia uma resposta imune contra ele, ou no transplante de progenitores hematopoiéticos do sistema imunológico do dador identifica tecidos do doente como estranhos, criando uma resposta imunológica contra o mesmo. Todo este processo se deve à aloreatividade, ou aloreconhecimento, que ocorre quando o sistema imunológico reconhece os antígenos do dador – ou recetor no caso de transplante de medula óssea – como estranhos, desencadeando uma resposta imunológica e rejeição do enxerto.(57,58)

#### 2.5.1.1 Rejeição em Transplantes de Órgãos Sólidos

Nos transplantes de órgãos sólidos, como rins, fígado e coração, a rejeição pode ser categorizada em vários tipos, cada um com mecanismos imunológicos distintos:

- **Rejeição hiperaguda:** Esta forma de rejeição ocorre minutos a horas após o transplante. É mediada por anticorpos pré-existentes no recetor que reconhecem os antígenos do dador como estranhos. Estes anticorpos ativam rapidamente o sistema complemento, levando à destruição imediata do tecido transplantado. Este tipo de

rejeição apesar de atualmente ser rara, é frequentemente irreversível e resulta na perda imediata do enxerto. É geralmente causada pela presença de anticorpos anti-HLA ou anti-ABO no recetor antes do transplante.

- **Rejeição Aguda**: Esta forma de rejeição pode ocorrer em qualquer momento, desde semanas até meses após o transplante. É mediada principalmente por linfócitos T que reconhecem os antígenos do CMH do dador, muito embora também possa ser provocada por anticorpos anti-HLA de resposta de memória ou em baixo título. A rejeição aguda é caracterizada pela infiltração de células T no tecido do enxerto, causando danos celulares e vasculite. No caso da resposta imune celular, pode resultar em inflamação e danos ao tecido transplantado, mas usualmente com uma intervenção rápida, como o ajuste da terapia imunossupressora, a rejeição aguda pode ser controlada e o enxerto salvo. No caso da rejeição aguda mediada por anticorpos, esta ocorre devido à presença de anticorpos resultantes de eventos sensibilizantes prévios (ex: gravidez, transplantes anteriores ou transfusão de componentes sanguíneos). Neste caso, se tiver passado bastante tempo após a exposição, os anticorpos encontram-se num título tão baixo que são praticamente indetectáveis durante os testes de compatibilidade, no entanto, quando os antígenos são identificados novamente no enxerto, os anticorpos, mesmo em pouca quantidade, conseguem desencadear uma resposta de memória rápida.(33) O processo da rejeição aguda pode ser dividido em:

- **Celular**

1. **Ativação de linfócitos T**: Os linfócitos T do recetor reconhecem os antígenos do CMH do dador através dos mecanismos de aloconhecimento direto, indireto e semidireto.
2. **Inflamação e citotoxicidade**: A ativação dos linfócitos T leva à produção de citocinas e à ativação de outras células imunes, resultando em inflamação e danos ao tecido transplantado.
3. **Memória imunológica**: A memória imunológica desempenha um papel crucial na rejeição aguda. Linfócitos T de memória que foram previamente sensibilizados aos antígenos do dador podem ser reativados rapidamente após o transplante, resultando numa resposta imune acelerada e potente contra o enxerto.
4. **Intervenção terapêutica**: A rejeição aguda pode ser controlada com o ajuste da imunossupressão, que inclui medicamentos para suprimir a resposta imune do recetor.(26)

- **Humoral**

1. Anticorpos de baixo título: Em alguns casos de rejeição aguda, o recetor pode apresentar anticorpos de baixo título contra os antígenos do dador. Estes anticorpos podem não causar uma resposta imediata, mas podem contribuir para a rejeição ao promover a ativação das células do sistema imunitário.
  2. Memória imunológica: Os anticorpos, produzidos pelos linfócitos B, desempenham um papel crucial na neutralização de patógenos e na marcação deles para destruição. No contexto de transplantes de órgãos, a rejeição ocorre quando o sistema imunológico identifica o tecido transplantado como estranho e cria uma resposta contra ele. Esse processo pode ser mediado por anticorpos ou linfócitos T, levando a diferentes tipos de rejeição, como a hiperaguda, aguda e crónica. A prevenção da rejeição envolve o uso de medicamentos imunossuppressores para reduzir a atividade imunológica e aumentar a aceitação do órgão transplantado.(33,59)
- **Rejeição Crónica**: Desenvolve-se ao longo de meses ou anos após o transplante, é caracterizada por uma resposta imunológica contínua e progressiva contra o enxerto. Envolve tanto componentes celulares como humorais do sistema imunitário. Clinicamente, manifesta-se como uma deterioração lenta e gradual da função do enxerto. A rejeição crónica é difícil de tratar e muitas vezes leva à perda do enxerto a longo prazo. Este tipo de rejeição é frequentemente associado à fibrose intersticial e perda de vasos do enxerto.(58)

#### 2.5.1.2 Rejeição em TCEH

A complicação significativa do TCEH é a Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (DECH), que ocorre quando as células imunológicas do dador atacam os tecidos do recetor.(44,45)

Um dos fatores cruciais na prevenção da DECH é a compatibilidade entre os antígenos HLA do dador e do recetor. A probabilidade de encontrar um dador totalmente compatível é maior entre irmãos, devido à herança genética dos pais. Contudo, quando um dador HLA-idêntico não está disponível, podem ser utilizados dadores com compatibilidade parcial ou não aparentados, aumentando o risco de DECH.(60)

A presença de anticorpos anti-HLA no recetor, desenvolvidos em resposta a exposições anteriores (como transfusões de sangue, gestações ou transplantes anteriores), também pode aumentar significativamente o risco de DECH e de rejeição do enxerto. Estes anticorpos reconhecem os antígenos HLA do dador como estranhos e iniciam uma resposta imune contra eles.(61)

Assim o teste de compatibilidade HLA e a detecção de anticorpos anti-HLA são etapas críticas no processo de seleção de dadores para transplante. A combinação ideal envolve a ausência de anticorpos anti-HLA e a maior compatibilidade possível entre os antígenos HLA do dador e do receptor, minimizando assim os riscos de DECH aguda e melhorando os resultados do transplante.

A DECH pode ser dividida em:

- **DECH Aguda:** Ocorre geralmente nas primeiras semanas após um transplante de progenitores hematopoéticos. Esta condição é mediada pelos linfócitos T do dador, que reconhecem os tecidos do receptor como estranhos e os atacam. Os principais órgãos afetados pela DECH aguda incluem:
  - **Pele:** A pele, sendo um dos maiores órgãos do corpo e possuindo um sistema imunológico ativo com APCs, como as células de Langerhans, é altamente eficaz na apresentação de antígenos às células T do sistema imunológico. Na DECH aguda, os linfócitos T do dador reconhecem as células da pele do receptor como estranhas, resultando em uma resposta inflamatória e em lesões cutâneas.
  - **Fígado:** O fígado é um órgão vital envolvido no metabolismo, desintoxicação e regulação imunológica. Além disso, ele possui um grande número de células imunes residentes, incluindo células de Kupffer (macrófagos hepáticos). Na DECH aguda, os linfócitos T do dador podem reconhecer as células hepáticas como estranhas, causando inflamação e danos ao tecido hepático. Além disso, o fígado filtra o sangue proveniente do trato gastrointestinal, o que o expõe a antígenos e células imunes que podem amplificar a resposta da DECH.
  - **Trato gastrointestinal:** O trato gastrointestinal possui uma extensa rede de tecido linfóide associado ao intestino, que contém muitas células imunes, incluindo células T, células B e APCs. A barreira epitelial intestinal é constantemente exposta a antígenos alimentares e à microbiota comensal, tornando-o um alvo principal na DECH aguda. A inflamação resultante da resposta dos linfócitos T do dador contra as células do intestino pode causar danos severos à mucosa intestinal, resultando em diarreia e outros sintomas gastrointestinais.(62)
- **DECH crônica:** Desenvolve-se mais tarde e pode persistir por anos. É caracterizada por uma resposta imune prolongada e persistente, que pode afetar múltiplos órgãos e sistemas, incluindo pele, olhos, boca, fígado e pulmões. A DECH crônica pode ter uma apresentação semelhante a doenças autoimunes e pode resultar em fibrose e disfunção dos órgãos afetados. A cronicidade desta condição pode levar a complicações graves e a uma deterioração significativa da qualidade de vida dos pacientes.(63,64)

Apesar dos problemas associados à DECH, quando devidamente controlada com imunossuppressores, esta complicação consegue converter-se num benefício para os doentes com leucemia, uma vez que as células do dador atacam as células leucémicas do recetor. A este fenómeno chama-se de efeito enxerto contra leucemia, proporcionando uma vigilância imunológica contra a recidiva da leucemia.(44,45)

### 2.5.2 Infeção

A imunossupressão tem um papel importante no transplante de órgãos sólidos uma vez que aumenta a sobrevivência do enxerto.(65) No entanto, apesar dos avanços dos imunossuppressores e cuidados de higiene e proteção, as infeções são uma das principais complicações no pós-transplante. Num estudo de 2014, estimava-se que cerca de 13 a 16% das mortes em recetores de transplantes de rim e coração foram causadas por infeções, assim como mais de 21% das mortes em recetores de transplantes de pulmões.(66)

O risco de infeção após transplante envolve dois fatores (1) a exposição epidemiológica do paciente e do dador, incluindo exposições recentes, nosocomiais e remotas, e (2) o estado de imunossupressão do recetor.(67) As infeções podem ser das mais variadas etiologias como bacterianas, fúngicas, virais ou parasitárias.(67)

## 2.6. Processo de doação e transplante

O processo de doação e transplante é um procedimento médico composto por uma série de passos ordenados de forma precisa que mantêm a viabilidade dos órgãos de forma a serem transplantados. É um processo que envolve dezenas de profissionais e que pode durar de 12 horas a mais de 72 horas.

Este processo inicia-se com a identificação de um potencial dador e termina com o transplante, tendo a sociedade como fornecedora de órgãos e tecidos no início e também como beneficiada pelos transplantes no final.(40)

No caso de dadores falecidos, os passos do processo de doação e transplantação são os seguintes:

1. Identificação do potencial dador durante os cuidados prestados em fase terminal em cada hospital – esses potenciais dadores vêm do Pré-hospitalar, Urgência e Unidade de Cuidados Intensivos;
2. Referenciação ao Coordenador Hospitalar de Doação;
3. Avaliação do dador, manutenção do dador e seleção do dador, bem como a certificação adequada da morte. Consulta ao RENNDA;
4. Todos os exames laboratoriais (por exemplo, identificação do tecido relativamente a HLA e teste de compatibilidade, despistagem de infeções, análises patológicas) deverão ser realizados em laboratórios certificados, utilizando métodos e técnicas

certificadas e sujeitos a controlo de qualidade por meio de métodos internos e externos;

5. Alocação dos Órgãos: segue as seguintes prioridades: Prioridade Nacional ou Listas especiais (Transplante pediátrico, Pedidos urgentes ou superurgentes (SU), multiórgãos e doentes hiperimunizados); Eletivo; Critério Local; Critério Regional; Critério Nacional; Critério Internacional. Os candidatos em SU têm prioridade, bem como os candidatos a transplantação multiórgãos. A oferta a nível internacional é apenas feita quando não for encontrado nenhum recetor a nível regional e nacional;(40)

A colheita de órgãos e tecidos é assegurada pelo gabinete de coordenação e colheita e transplante (GCCT). A colheita é feita por um cirurgião experiente, respeitando os tempos de isquemia quente e fria. A isquemia é um conceito fundamental no contexto da colheita e transplante de órgãos, dividindo-se em duas fases principais: isquemia quente e isquemia fria. Ambas têm um impacto significativo na viabilidade dos órgãos para transplante e precisam ser cuidadosamente geridas pelos cirurgiões.

- Isquemia Quente: Refere-se ao período durante o qual o órgão permanece sem circulação sanguínea, a uma temperatura corporal normal, após a interrupção da circulação, mas antes da perfusão com a solução de preservação fria. Durante a isquemia quente, o órgão ainda está a uma temperatura fisiológica, o que resulta em um metabolismo celular ativo e, conseqüentemente, em maior dano celular devido à falta de oxigenação e nutrientes. A minimização do tempo de isquemia quente é crucial para reduzir danos ao órgão. O período de isquemia quente começa no momento da paragem cardíaca e termina com a perfusão do órgão com a solução de preservação fria.
- Isquemia Fria: Refere-se ao período durante o qual um órgão removido do corpo do dador é mantido em uma solução de preservação fria até ser transplantado no recetor. Este processo de arrefecimento diminui significativamente o metabolismo celular, retardando o processo de degradação e aumentando o tempo em que o órgão pode ser viável para transplante.
  - Tempos Limites para Isquemia Fria:
    - Coração: Menos de 4 horas.
    - Pulmão: Menos de 8 horas.
    - Pâncreas: Menos de 12 horas.
    - Fígado: Menos de 12 horas.
    - Rim: Menos de 24 horas.

Um dos principais objetivos da coordenação de colheita e transplantação é garantir uma cooperação contínua e eficiente entre as diferentes equipas envolvidas na doação, colheita,

preservação, partilha de órgãos e implantação, colheita de tecidos, processamento e armazenamento em banco de tecidos.(40)

## **2.7. Processo de referenciação e testes de compatibilidade**

O processo de referenciação do dador até a chegada das amostras ao laboratório é influenciado por diversos fatores essenciais, sendo da competência dos Gabinetes de Coordenação de Colheitas e Transplantes e do Coordenador Hospitalar. O serviço de prevenção e urgência do CST, está assegurado 24 horas por dia, 365 dias por ano, por dois técnicos de laboratório escalados. É da responsabilidade dos elementos da equipa de urgência o conhecimento da legislação em vigor aplicável, a realização e validação dos ensaios/procedimentos laboratoriais, o contacto telefónico com os GCCT e com as Unidades de transplantes renais (UTR) para oferta dos candidatos da lista de alocação renal e suporte nos resultados de histocompatibilidade e prioridade de oferta. Se necessário o responsável do serviço de urgência do CST fará o suporte da especialidade de histocompatibilidade clínica e processo de alocação.

Ao chegarem ao laboratório as amostras são submetidas a testes de compatibilidade, onde a imunogenética desempenha um papel crucial, que permite uma avaliação precisa da compatibilidade entre dador e recetor. Cada fase deste processo tem uma grande importância e culmina com a seleção adequada de par dador/recetor e, por conseguinte, na otimização do sucesso do transplante.

A transplantação só é considerada se existir compatibilidade com o sistema ABO do dador, crossmatch anti-linfocitário negativo por citotoxicidade com o último soro, genotipagem HLA e virologia negativa (salvo exceções de Circulares Normativas dos serviços, como Epstein-Barr Vírus (EBV), Citomegalovirus (CMV) que são informativos).(68)

O processo de transplantação envolve várias fases, várias equipas multidisciplinares e é longo e em muitos casos envolve várias pesquisas preliminares e o estudo de vários potenciais dadores, até que se encontre um dador com a compatibilidade mínima necessária e seja proposto o transplante. É uma etapa crítica que envolve uma avaliação abrangente do recetor, do dador e da compatibilidade genética entre eles, garantindo assim, o melhor resultado possível para o recetor.

Realização e validação dos ensaios laboratoriais de acordo com os procedimentos:

1. Referenciação do Potencial Dador multiorgânico por GCCT e registados no Registo Português de Transplantação (RPT);
2. Início do trabalho laboratorial
  - Painel de marcadores infecciosos (Virus da Imunodeficiência Humana (VIH) 1/2, Virus da Hepatite B (VHB), Virus da Hepatite C (VHC), Vírus Linfotrópico de Linfócitos T Humanos (HTLV) I/II, CMV, EBV, Sífilis);

- Grupo sanguíneo AB0/Rh(D) e Du, se Rh(D) negativo;
  - Genotipagem HLA-ABC DRDQDP;
  - Matching LusoT (Base de dados Luso Transplante) seriação de acordo com a prioridade para transplante;
  - Crossmatch anti-linfocitário por Citotoxicidade Dependente do Complemento ou *Complement-dependent Cytotoxicity Crossmatch* (CDC) em linfócitos T e B;
  - Crossmatch anti-linfocitário por citometria de fluxo ou *Flow Cytometry Crossmatch* (FCM) em linfócitos totais
  - Testes de ácidos nucleicos (TAN) (realizado no CST – Área do Sangue)
3. Envio de resultados LusoT para RPT
  4. Envio da lista de candidatos a transplantação renal do LusoT para RPT
  5. Alocação de candidatos a transplantação renal no RPT
  6. Alocação dos órgãos/rins
  7. Comunicação da lista final com oferta dos candidatos prioritários às Unidades de Transplante.(69)

No caso dos candidatos Pulmão/Coração, os resultados e alocação e/ou comunicação dos resultados, são feitos, após terem sido carregados os relatórios para todos os candidatos apresentados, via telefone, comunicação ao GCCT que está a coordenar para informar de que os resultados estão disponíveis para avaliação da unidade.

Quanto ao Fígado, é de responsabilidade do CST fazer apenas o Painel de marcadores infecciosos e Grupo sanguíneo AB0/Rh(D) e Duffy, se Rh(D) negativo.

## **2.8. Transplante de Tecidos**

O Transplante de tecidos representa também uma opção terapêutica no tratamento de diferentes patologias, conduzindo à necessidade de disponibilização de tecidos humanos para aplicação clínica com todas as garantias de qualidade e segurança.(70)

O Banco de Tecidos do IPST é um banco multitecidual que prepara e distribui diferentes tipos de tecidos, designadamente:

- Cardiovascular: válvulas cardíacas (aórtica e pulmonar) e segmentos vasculares (artérias e veias);
- Músculo-esquelético: osso (cortical, esponjoso, cortico-esponjoso, osteocondral), tendão, menisco e fáscia lata;
- Membrana amniótica: para oftalmologia, cirurgia plástica, tratamento de queimados;

## 3 Descrição das atividades

### 3.1. Descrição das atividades por laboratório

TABELA 3.1. Descrição das diferentes atividades realizadas por laboratório ao longo do estágio.

Laboratórios	Descrição das Atividades
Laboratório Imunogenética e Genotipagem Molecular	<ul style="list-style-type: none"><li>• Extração de ADN</li><li>• Estudo de Quimerismo</li><li>• Genotipagem HLA</li></ul>
Laboratório Alossensibilização e Serologia HLA	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tipagem Eritrocitária AB0 e Rh(D)</li><li>• Isolamentos de Linfócitos T e B</li><li>• Detecção de Anticorpos Anti-HLA Classe I, II e MIC A</li><li>• Identificação de Anticorpos Anti-HLA Classe I ou II</li><li>• Identificação de Anticorpos Anti-HLA com Fração C1q</li><li>• Pesquisa de Anticorpos Anti-HLA contra Painel (PRA)</li><li>• CDC</li></ul>
Laboratório Citometria de Fluxo e Separação Celular	<ul style="list-style-type: none"><li>• Separação Celular</li><li>• FCM</li></ul>
Laboratório de Agentes Transmissíveis e Seroteca	<ul style="list-style-type: none"><li>• Determinação de Marcadores Serológicos</li><li>• Seroteca</li></ul>
Todos os Laboratórios	<ul style="list-style-type: none"><li>• Controlo de Qualidade<ul style="list-style-type: none"><li>○ CQ Interno</li><li>○ CQ Externo</li></ul></li></ul>

### 3.2. Laboratório de imunogenética e genotipagem molecular

No laboratório de Imunogenética e Genotipagem Molecular, são efetuadas as técnicas para extração de ADN, estudo de quimerismo e genotipagem HLA. As amostras são provenientes do “CEDACE”, candidatos a transplante, familiares dos candidatos e estudo HLA doença.

### 3.2.1. Workflow

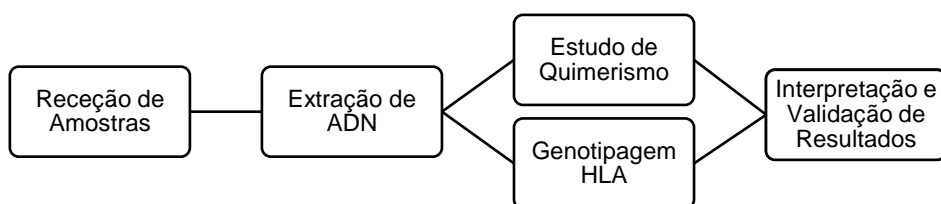


FIGURA 3.1. Esquema do workflow do Laboratório de Genética.

### 3.2.2. Extração de ADN

A extração de ADN é uma técnica fundamental e amplamente utilizada nos laboratórios de genética. O objetivo principal desta técnica é isolar o ADN proveniente de uma variedade de amostras biológicas, como sangue, saliva, tecidos, plantas e microrganismos.

#### 3.2.2.1. Métodos de Extração de ADN

A extração de ADN pode ser realizada de forma manual (Anexo 5) ou automática, dependendo dos recursos disponíveis e do volume de amostras a serem processadas.

#### Extração Manual

Resumidamente, a primeira etapa envolve a recolha da amostra biológica. O tipo de amostra depende do organismo de interesse e da finalidade do estudo. Posteriormente procede-se à lise celular por métodos físicos ou químicos de forma a libertar o conteúdo celular, incluindo o ADN. O passo seguinte inclui a remoção de contaminantes, onde proteínas, lípidos e outros componentes celulares são removidos. Neste procedimento enzimas como a proteinase K podem ser usadas para degradar proteínas. Após este passo procede-se à precipitação e lavagem do ADN para remover contaminantes residuais. E finalmente o ADN purificado é dissolvido numa solução tampão apropriada.

A extração manual é um método que evita o desperdício de amostra, pelo que é usada quando a quantidade de amostra é reduzida, para técnicas usadas na urgência (dadores falecidos) e para a técnica de monitorização de quimerismo e zangatoas bucais.

Este processo é executado recorrendo a uma coluna de afinidade para ácidos nucleicos fornecida pela empresa QIAGEN<sup>(71)</sup> que utiliza sais quaternários de guanidina numa membrana de sílica com afinidade para os ácidos nucleicos para a filtração de lisados de células nucleadas. A lavagem de *debris* celular é feita pela passagem de soluções de força iónica decrescente através da membrana até à eluição final do ADN genómico com uma solução de força iónica baixa a pH neutro. (71)

Posteriormente, o ADN extraído é avaliado espectrofotometricamente para a quantificação do ADN e a verificação da sua pureza, no equipamento espectrofotómetro NanoDrop2000.

Na quantificação do ADN devemos ter atenção a manipulação da amostra para evitar contaminação, bolhas de ar durante a pipetagem, presença de impurezas, concentração elevada e má pipetagem da amostra.

Antes de iniciar a leitura no espectrofotómetro tem de se fazer o Branco de Reagente (leitura apenas do reagente de base) que ajusta a leitura inicial como zero e corrige qualquer interferência que o comprimento de onda do reagente possa ter nos resultados de forma a garantir uma leitura precisa e específica da amostra.

Preende-se uma concentração de ADN no intervalo entre 20 e 40 ng/ $\mu$ L.

Vantagens da Extração Manual:

- Custo baixo: Requer menos investimento inicial em equipamentos.
- Flexibilidade: Pode ser ajustado para diferentes tipos de amostras e condições específicas.

Desvantagens da Extração Manual:

- Tempo-consumo: Processo demorado, especialmente para um grande número de amostras.
- Variabilidade: Resultados podem variar dependendo da habilidade do operador.
- Risco de contaminação: Maior risco de contaminação cruzada entre amostras.

### Extração Automática

Trata-se de um procedimento em tudo semelhante ao método manual. As amostras são colocadas em um sistema automatizado que realiza a lise celular, remoção de contaminantes, precipitação e lavagem do ADN de forma integrada e controlada. Finalmente o ADN purificado é automaticamente dissolvido numa solução tampão apropriada.(72)

Vantagens da Extração Automática:

- Maior Eficiência: Permite o processamento simultâneo de um grande número de amostras.
- Redução de Erros: Minimizando a intervenção humana, reduz-se a possibilidade de erros técnicos.
- Reprodutibilidade: Garante consistência nos resultados.

Desvantagens da Extração Automática:

- Custo Elevado: Equipamentos automatizados são caros.
- Manutenção: Necessidade de manutenção regular dos equipamentos.

- Dependência de Equipamento: Pode haver limitações em caso de avaria do equipamento.

Durante o processamento da técnica, de um modo geral, podem ocorrer alguns problemas técnicos, como por exemplo: Problemas de pipetagem (volume incorreto de reagentes ou amostras dispensadas durante a pipetagem); obstrução nas linhas de fluido do sistema; baixo rendimento na eluição final do material extraído; erros na identificação ou etiquetagem das amostras; falhas no processo de entrada de dados; falhas de software e erros causados por fatores humanos. Deve-se verificar sempre os procedimentos e fazer limpeza e desinfecção semanalmente.

É fundamental garantir que o ADN extraído esteja livre de proteínas, ácidos ribonucleicos e outros contaminantes que possam interferir em análises subsequentes. Além disso, o ADN extraído deve ser quantificado, utilizando espectrofotometria.

No caso particular deste estágio, a extração de ADN pode ser feita de forma automática no equipamento QIASymphony SP que isola e purifica o ADN genómico, utilizando uma tecnologia de micropartículas magnéticas que se irão ligar ao ADN. Este procedimento tem quatro fases: lise celular, ligação, lavagem e eluição. A enzima protéase K é utilizada para induzir a lise celular.(72)

### 3.2.3. Estudo de quimerismo

Quimerismo corresponde à presença de diferente material genético no mesmo indivíduo.

No TCEH alogénico em que ocorre substituição hematopoiética completa com as células do dador, o quimerismo é completo ou total (Tabela 3.2). No caso em que há persistência de células do recetor, com coexistência de células do dador e recetor, o quimerismo designa-se misto. A determinação da percentagem de quimerismo permite avaliar o sucesso do transplante e a probabilidade da ocorrência de DECH.(73,74)

Este estudo permite estabelecer uma constelação de alelos de marcadores genéticos informativos do tipo repetição em tandem curta ou *Short Tandem Repeat* (STR) e repetição em tandem de número variável ou *Variable Number of Tandem Repeat* (VNTR) nos pares dador-recetor de TCEH para quantificação do quimerismo no pós-transplante, de forma a monitorizar a função do enxerto e na identificação do risco de recidiva.(75–77)

Para que isto possa ocorrer, é necessário que, antes do transplante, seja obtida a referência do dador e do recetor para que, posteriormente ao transplante, se possa comparar o eletroferograma obtido com os correspondentes ao dador e recetor. São analisados 13 loci (12 loci STR autossómicos altamente polimórficos e o locus amelogenina, marcador de sexo).(75–77)

**TABELA 3.2. Tipos de quimerismo**

<b>Tipo do Quimerismo</b>	<b>Definição</b>
<b>Quimerismo Completo</b>	100% de células do dador
<b>Quimerismo Misto</b>	5 a 95% de células do dador
<b>Quimerismo Split</b>	Uma linhagem é de origem do recetor e outra do dador
<b>Microquimerismo</b>	< 1% de células do recetor
<b>Rejeição do Enxerto</b>	< 5% de células do dador

(Fontes: DOIs: 10.1016/j.humimm.2021.07.013 e 10.1007/978-3-031-44080-9\_21)

Assim, o estudo do quimerismo é realizado em 3 fases distintas do processo de transplantação de forma a estabelecer os seguintes genotípicos:

- Perfil genotípico pré-transplante do dador;
- Perfil genotípico pré-transplante do doente (a amostra do doente deve ser colhida numa situação em que a doença esteja controlada, o doente não deve estar na fase aguda proliferativa da doença, para garantir precisão nos resultados, uma vez que na fase aguda da doença há um aumento significativo na produção e proliferação de células, e isto pode dificultar a interpretação dos resultados, pois a deteção de células do dador pode ser confundida com a proliferação intensa das células do paciente);
- Análise pós-transplante do perfil genotípico do sistema hematopoiético do doente sobre células de sangue periférico ou células de aspirado de medula óssea ou células de linhagem mieloide/linfoide isoladas dos tecidos anteriores;

Esta determinação é efetuada em células totais do sangue periférico, células totais do aspirado de medula óssea ou em subpopulações celulares, com o auxílio de separação celular efetuada por citometria de fluxo (Anexo 6). As condições necessárias para a aceitação das amostras estão descritas no Anexo 7. A análise do quimerismo nas diferentes subpopulações, garantem uma avaliação completa e precisa da reconstituição hematopoiética e imunológica após TCEH.

Diferentes tipos celulares têm diferentes tempos e padrões de reconstituições após um TCEH. A análise específica permite avaliar se cada tipo celular está a ser eficazmente reconstituído pelo enxerto do dador. Em alguns casos, algumas populações celulares do enxerto podem ser rejeitadas enquanto outras são aceites, assim é possível identificar rejeições parciais e tomar medidas preventivas.

A determinação do quimerismo em diferentes populações é crucial para uma avaliação abrangente e precisa da reconstituição pós-transplante. Fornece informações detalhada sobre o transplante e reconstituição imunológica e possíveis complicações, permitindo uma ação clínica eficaz para melhorar a vida dos pacientes transplantados. Permite determinar a correta

percentagem de quimerismo para as diferentes linhagens celulares. Esta abordagem permite uma maior sensibilidade e especificidade, permitindo visualizar quimerismo misto mais precocemente, que pode não ser visível em células totais.(78)

O principal objetivo da monitorização pós-transplante em doentes submetidos a TCEH é prever eventos como a recidiva da doença, rejeição do enxerto e DECH, de forma a iniciar o tratamento. Neste contexto a análise de quimerismo é, sem dúvida, um importante método de monitorização do sucesso pós TCEH.(79)

Existem várias técnicas de biologia molecular usadas para estabelecer o estado de Quimerismo em pacientes sujeitos a TCEH alogénico. Este estudo pode ser feito por técnicas como Multiplex, *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (PCR), *Next Generation Sequencing* (NGS), Single, Droplet Digital PCR e Plate-based digital PCR. No entanto, a técnica utilizada no Centro de Transplantação é o Multiplex, o método *Gold Standard*. A amplificação de um painel de marcadores STR/VNTR altamente polimórficos, baseada numa reação de PCR, é tida como uma das técnicas mais informativas e sensíveis.(80)

Para fazer esta monitorização são realizados alguns procedimentos até obter o resultado para análise: Separação Celular, Extração e Quantificação de ADN, Amplificação por PCR, Desnaturação, Eletroforese Capilar, Análise de Eletroferograma e Emissão de relatórios clínicos com base na informação clínica do doente.

Na execução da técnica deve ter-se atenção à manipulação das amostras para que não haja contaminações e trocas de amostra. Na interpretação dos resultados do eletroferograma deve ter-se em conta a Stutter Band e Bleeding. Estes artefactos são supostamente, resultado do desemparelhamento da cadeia durante a amplificação dos fragmentos de ADN, se existirem sinais Stutter em comum com os alelos STR do dador ou do recetor, eles irão alterar a exatidão da quantificação.(81)

Bleeding é uma sobreposição de picos adjacentes no eletroferograma, tornando difícil a distinção entre os diferentes alelos ou fragmentos de ADN.

Ao interpretar o eletroferograma é necessário considerar a possibilidade desses dois artefactos para uma análise precisa.

Mais uma vez, é fundamental fazer manutenção e calibração dos equipamentos, implementar praticas rigorosas de manipulação de amostras para minimizar a contaminação.

### 3.2.4. Genotipagem HLA

A tipagem HLA e identificação de polimorfismo é muito importante na seleção do par dador/recetor para o TCEH, transplantes de órgãos sólidos e estudos HLA-Doença (estudos que fazem uma associação entre predisposições genéticas e doenças, nomeadamente as autoimunes) e ainda nos estudos farmacogenéticos para despiste de perfil genético envolvido em reação de hipersensibilidade a fármacos.

A genotipagem, neste laboratório, é feita por NGS, apesar de já se terem utilizado outras técnicas previamente, como PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers), PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction - Sequence-Specific Oligonucleotide) e SBT (Sequencingbased Typing). É utilizado o sistema One Lambda AllType NGS 11 loci para a amplificação seletiva e sequenciação dos genes HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DRB3/4/5, HLA-DQA1, HLA DQB1, HLA-DPA1 e HLA-DPB1 (Anexo 8).

#### 3.2.4.1. Genotipagem HLA utilizando o Kit LinkSeq

Esta é uma técnica que estabelece o genótipo HLA dos 11 genes HLA-A, B, C classe I e HLA-DRB1/3/4/5; DQA1/B1 e DPA1/B1 classe II em amostras usadas no contexto de urgência (dadores de órgãos falecidos).

O kit de tipagem HLA LinkSeq combina PCR com a deteção direta de ADN, eliminando muitas das etapas exigidas por outros métodos. Este método único usa uma forma de SSP combinada com um corante fluorescente de ligação ao ADN (SYBR Green) para fornecer resolução de nível intermedio de alelos HLA Classe I e Classe II, sem a necessidade de eletroforese em gel ou métodos de sonda, economizando tempo e esforço. O *software* de análise SureTyper é usado para automatizar todo o processo de tipagem e inclui relatórios completos, controlo de qualidade e segurança.(82,83)

A metodologia de PCR-SSP é baseada no princípio de que os *primers* de oligonucleotídicos compatíveis amplificarão uma sequência alvo de forma mais eficiente do que os *primers* incompatíveis, ao usar uma ADN polimerase recombinante apropriada. Sob condições de PCR estritamente controladas, os pares *primers* são projetados para detetar apenas um único alelo ou grupo de alelos. Os pares de *primers* compatíveis resultam na amplificação de sequência alvo (ou seja, um resultado positivo), enquanto os pares de *primers* incompatíveis não resultam em amplificação (ou seja, um resultado negativo). Nos kits de tipagem LinkSeq, um corante fluorescente de ligação ao ADN de cadeia dupla (SYBR Green) é usado para identificar a presença ou ausência de produtos amplificados. Um equipamento de PCR em tempo real é usado para detetar esse produto. Dados de fluorescência bruta, primeira derivada e temperatura são exportados do equipamento de PCR em tempo real.(82,83)

Os conjuntos de *primers* amplificam os alelos descritos pela base de dados IMGT/HLA. O teste é realizado em 3 etapas básicas:

1. O tampão LinkSeq é combinado com uma amostra de ADN genómico humano e ADN polimerase e dispensado na placa LinkSeq;
2. A placa vai ao termociclador, amplificando o ADN com *primers* de sequência específica;

3. Os dados de dissociação (curva de fusão) são recolhidos num equipamento de PCR em tempo real e exportados para o software SureTyper para interpretação e relatório do genótipo;

Uma vez que a especificidade do sistema de tipagem é parte do processo de amplificação por PCR, o processamento pós-amplificação das amostras é reduzido ao mínimo. Neste sistema, a deteção dos amplicons HLA e Controlo Interno (CI) é feita adquirindo para cada reação da placa de 384 LynkSeq Tray, os sinais de fluorescência pela molécula de intercalação ADN double stranded bindin SYBR-Green da curva de dissociação relativa à temperatura de melting (TM) dos fragmentos de ADN em dupla cadeia. A PCR da placa de 384 reações e a aquisição dos sinais fluorescentes da curva de dissociação é feita no sistema ABI QuantStudio5, sob controlo do software QuantStudio Design and Analysis Software. Os resultados da análise da derivada dos sinais relativos a fluorescência SYBR-Green são exportados e integrados do software de interpretação SureTyper que estabelece a especificidade dos picos de fluorescência de cada reação tendo em consideração a TM estabelecida pelo fabricante para cada fragmento em cada reação específico HLA e CI. A integração dos resultados positivos/negativos estabelece o genótipo HLA para os genes HLA ABC e DRB1/3/4/5, DQA1/B1 e DPA1/B1 do CMH classe I e II respetivamente e os respetivos equivalentes serológicos.(82,83)

Para esta técnica é usado ADN genómico humano extraído a partir de amostras de sangue colhidas em anticoagulante ACD ou EDTA. A solução de ADN genómico humano deve estar corretamente identificado com concentração > 50ng/μL e relação A260/280 >1,8-2,0.

Na validação, existem três parâmetros de controlo de qualidade no sistema LinkSeq:

1. Controlo Interno: existe um conjunto de *primers* de controlo interno em cada poço de ensaio. Este conjunto de *primers* amplifica uma região conservada dentro de um gene específico. Na ausência de um pico específico de HLA, a presença do pico de controlo indica que os reagentes e amostra foram adicionados a cada poço. Controlos falhados invalidam o resultado do teste.
2. No Template Control (NTC): o poço de reação NTC contém todos os reagentes, exceto a amostra de ADN. Se um pico for detetado neste poço, isso pode sugerir contaminação com ADN e, portanto, resultados comprometidos. As reações são validadas de acordo com a razão entre os picos das curvas referentes à reação específica e à reação controlo negativo (CN).
3. ADN Quality Control (DQC): o ensaio DQC amplifica um amplicons ao longo de um gene específico. A ausência de um pico de controlo neste poço indica possíveis problemas de qualidade da amostra de ADN. O DQC é usado como uma referência para solucionar problemas de amostra.(82,83)

Se a qualidade das curvas está boa, a qualidade do ADN não teve impacto nos resultados;

Se as curvas são fracas e/ou com múltiplos picos, analisar a fundo toda a placa.

A química LinkSeq é altamente robusta e pode produzir resultados válidos, mesmo com falhas no DQC; no entanto, no caso de um resultado de tipagem ambíguo, reações que falhem ou um resultado homozigótico, uma falha no DQC pode indicar ADN de baixa qualidade e o teste deve ser repetido com uma amostra nova. A lista de equivalentes consta do *software* de interpretação e são atribuídos automaticamente.(82)

O SYBR Green emite fluorescência quando ligado a um ADN amplificado de cadeia dupla. Quando o ADN amplificado é submetido a uma faixa de temperaturas que gera a desnaturação, dá-se a separação do corante e é detetada uma variação de emissão de fluorescência. Os valores de fluorescência obtidos no sistema ABI QuantStudio5 são processados pelo software de análise SureTyper. Este software analisa os dados de cada poço de reação para gerar uma curva de desnaturação, que é avaliada dentro das faixas predefinidas de temperatura, para valores calculados de reações negativas e positivas. Este método de análise de curva de desnaturação é utilizado para avaliar o resultado de cada poço como positivo ou negativo e que se traduz na identificação ou não de um ou mais alelos específicos. O SureTyper analisa o conjunto de reações positivas e negativas de cada poço, interpreta e atribui o genótipo HLA da amostra. A emissão do resultado inclui os 11 loci do gene HLA: -A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQB1, -DQA1, -DPB1, -DPA1 e ainda os equivalentes serológicos.(82,83)

#### 3.2.4.2. Genotipagem HLA utilizando NGS

NGS é uma tecnologia recente usada para fazer a sequenciação de ADN e a deteção de variantes e/ou mutações que permite sequenciar milhares de genes ou até o genoma inteiro num curto período. Desta forma, é possível definir um alelo nas suas diferenças codificantes e não codificantes.

Esta técnica envolve várias etapas, como Extração e Quantificação de ADN, Amplificação PCR-multiplex Long Range, Purificação dos amplicons PCR, Quantificação e Normalização, Indexação da Biblioteca com os Sample BarCodes e Universal BarCodes, Amplificação Secundária da Biblioteca Pool, Purificação e Quantificação, Quantificação e Normalização da Biblioteca para a Amplificação Isotérmica no Ion Chef; Programação do plano de trabalho no SS Torrent Server e Configuração do Sistema Ion Chef e Ion GeneStudio S5 Plus.

São utilizados para a realização da técnica os equipamentos Ion Chef™ Instrument e o Ion GeneStudio™ S5 System. A tecnologia Ion Torrent usa um chip semiconductor e deteta a libertação de iões de hidrogénio cada vez que um nucleótido é incorporado na cadeia de ADN, durante a sua síntese. O Ion GeneStudio S5 que analisa o chip, transfere a interpretação da sequenciação das classes I (A, B e C) e II (DRB1, DRB3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1 e DPB1) para o software TypeStream onde se efetua a interpretação e validação dos resultados.(84)

O equipamento obtém a informação de inúmeros fragmentos, sendo que quanto maior o número, mais significativa é a sequenciação.

Compete ao técnico verificar todas as informações fornecidas, sendo que o equipamento reconhece mismatches e fornece alternativas equivalentes de genotipagem. A impressão de relatório dos resultados é feita com base na história clínica do doente.

As vantagens da metodologia de sequenciação por NGS:

- Sequenciação de grande número de bases por corrida;
- Sequenciação de muitos genes em simultâneo;
- Sequenciação de um número vasto de amostras ao mesmo tempo, grande volume de sequências geradas por corrida de uma única vez em alta resolução e genotipagem alélica;

NGS permite a caracterização completa em alta resolução de alelos novos e já existentes. O que permite ter implicações relevantes para o TCEH, transplantes de órgãos sólidos e para outras doenças associadas ao sistema HLA. A adoção da tecnologia de NGS nos últimos anos impulsionou um aumento no número de alelos e no comprimento das sequências submetidas.(85)

Nesta técnica também pode ocorrer alguns problemas que podem resultar na ausência de amplificação, tais como:

- Baixa quantidade de ADN inicial (decorrente de problemas na extração de ADN);
- Baixa qualidade do ADN (pode estar contaminado ou degradado);
- Condições de reagentes, temperaturas incorretas e mau funcionamento do primer;
- Existência de Homopolímero, que se refere a repetições de nucleótidos idênticos numa sequência de ADN, o que origina erros na sequenciação, pois a leitura de várias cópias consecutivas de um mesmo nucleótido pode ser difícil para as plataformas de sequenciação, o que pode originar problemas de interpretação dos dados, especialmente em regiões de Homopolímero longas.

Na interpretação dos resultados deve haver atenção à ambiguidade de alelos (que pode ocorrer devido as mutações e variações genéticas), erros de sequenciação (inserções ou deleções incorretas) e elevado polimorfismo. Além disso, devem ser utilizados métodos de análise bioinformática avançados para resolver ambiguidades e identificar alelos com maior segurança, realizar controlo de qualidade rigoroso durante o processo de sequenciação, utilizar banco de dados de alelos HLA atualizados e ferramentas especializadas para análises de variantes específicas do HLA, implementar práticas rigorosas de manipulação de amostras para minimizar a contaminação.

### 3.3 Laboratório de Alossensibilização e serologia HLA

O laboratório de Alossensibilização e Serologia HLA é especializado na identificação e caracterização de anticorpos anti-HLA e na avaliação do estado imunológico de pacientes. Este laboratório desempenha um papel crucial na seleção do par dador/recetor, minimizando o risco de rejeição do aloenxerto e melhorando os resultados dos transplantes.

Neste laboratório são realizadas diversas técnicas como: Determinação do Grupo Sanguíneo, Detecção de Anticorpos Anti-HLA Classe I, II e MIC A, Identificação de Anticorpos Anti-HLA Classe I e II, Identificação de Anticorpos Anti-HLA com capacidade de fixação da fração C1q do complemento, Isolamento de Linfócitos T e B, PRA e CDC.

#### 3.3.1. Tipagem eritrocitária AB0 e Rh (D)

A tipagem AB0 baseia-se na determinação simultânea do grupo pela prova direta e pela prova reversa. A prova direta (ou prova celular) consiste em pôr em evidência os antígenos A e B presentes nas células da amostra (eritrócitos) por aglutinação destas células com antissoros conhecidos. A prova reversa (ou prova indireta) consiste em pôr em evidência os anticorpos Anti-A e Anti-B presentes no plasma da amostra com a ajuda de células conhecidas A1, A2, B e 0.(86) O teste do grupo sanguíneo é feito a partir de amostra de sangue periférico colhida com anticoagulante e deve ser efetuada por duas técnicas diferentes para garantir a precisão e a confiabilidade dos resultados e para minimizar o risco de erros: a técnica automatizada e a técnica manual, sendo que ambas devem ser concordantes.

A amostra de sangue cumpre os critérios de aceitação se corretamente identificada, colhida há menos de 48 horas e sem sinais de hemólise, lipémia ou contaminação bacteriana.

A técnica automatizada é efetuada no equipamento Immucor Galileo Echo que realiza testes imunohematológicos *in vitro*, sendo que todas as suas funções são completamente automatizadas, incluindo o manuseamento das amostras e reagentes, as pipetagens, incubações, lavagens, centrifugações, leitura e interpretação de resultados. O Gallileo Echo utiliza o princípio da hemoaglutinação, que é a capacidade de partículas, como os eritrócitos, se agregarem quando expostas a anticorpos específicos. O processo ocorre em microplacas que contêm pequenos poços, nos quais as reações de aglutinação são monitorizadas.(87)

Antes de serem colocadas amostras, são passados três controlos com grupos conhecidos, diariamente.

No fim da análise feita pelo equipamento é necessário verificar se existe algum resultado Rh negativo, e caso exista é feita a pesquisa do D fraco, sendo estas amostras novamente processadas automaticamente no Gallileo Echo.

### Resultados - ABOD Full

Identificação da amostra	Interpretação.	Avisos	Rh Ctl	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D1	Anti-D2	Células A1	Células B
232179245098616447 WB corQC 1	A Pos		0	4+	0	3+	3+	3+	0	4+
233179245099422030 WB corQC 2	B Neg		0	0	4+	4+	0	0	3+	0
234179245090096233 WB corQC 3	O Pos		0	0	0	0	4+	4+	3+	4+

FIGURA 3.2. Grau de aglutinação, relatório gerado pelo equipamento Echo Immucor

A técnica manual, em Cards é feita através de cartões Gel DG ABO/RH com 8 colunas da Diagnostic Grifols (Anexo 9). Esta é uma técnica de aglutinação em coluna onde é possível realizar tanto a prova reversa quanto a direta, simultaneamente, e ainda fazer a tipagem Rh. As amostras são dispostas nos cartões de acordo com a técnica prescrita. Após o preenchimento destes, são submetidos à centrifugação através da centrífuga DG Spin da Grifols.

A leitura dos resultados é visual, quando há existência de banda na parte superior da coluna significa que estamos perante uma reação de aglutinação positiva.(88)

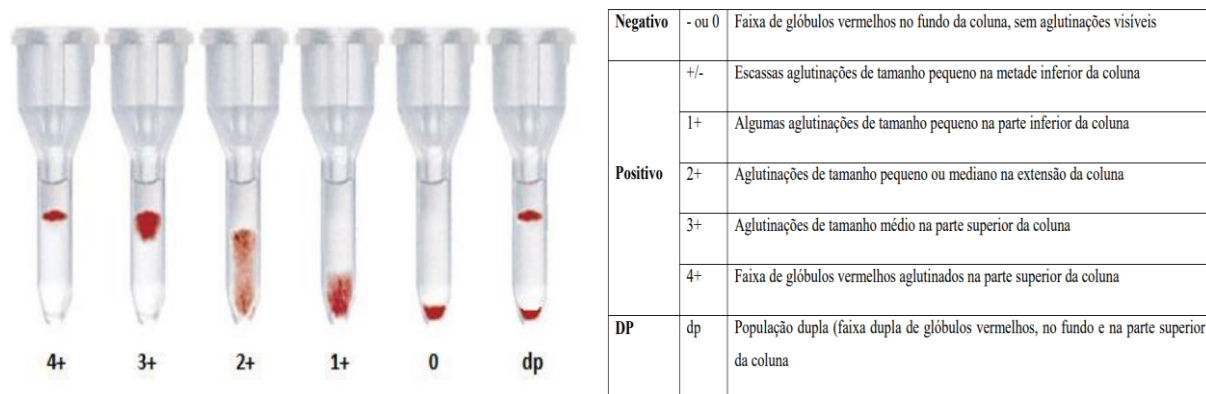


FIGURA 3.3. Resultados da técnica de aglutinação em Card Gel.

Fonte: [http://www.hu.ufsc.br/documentos/pop/serviço\\_de\\_hemoterapia/POP\\_Tipagem\\_sanguinea.pdf](http://www.hu.ufsc.br/documentos/pop/serviço_de_hemoterapia/POP_Tipagem_sanguinea.pdf)

### 3.3.2. Isolamento de linfócitos T e B

Nestes procedimentos são utilizados cocktails de anticorpos que realizam uma seleção negativa das células alvo (Anexo 10). Utiliza esferas magnéticas revestidas por misturas de anticorpos que reconhecem marcadores específicos das células, exceto os marcadores específicos dos linfócitos T ou B, fazendo uma seleção negativa dessas células

O objetivo é obter uma suspensão de linfócitos o mais pura possível. A contagem é realizada num contador hematológico Sysmex XT1800i e a viabilidade é observada em microscopia de

fluorescência com corante laranja de acridina + brometo de etídio ou em Câmara de NeuBauer com azul trypan de modo a obter as contagens e viabilidade dos linfócitos.

É uma técnica rápida que permite uma depleção de 99,9% dos glóbulos vermelhos, sem necessidade de lise, e uma pureza de mais de 96% das células isoladas. As células isoladas depois de acertada a concentração celular (para assegurar que os ensaios sejam realizados com um número adequado de células viáveis, ajustar a densidade celular para evitar o supercrescimento ou subcrescimento que podem afetar a funcionalidade das células e minimizar a variabilidade) podem ser diretamente utilizadas em testes de CDC (acertadas a 2,5 milhões) ou por Citometria de Fluxo (acertadas a 10 milhões).(89)

A variabilidade mínima aceitável geralmente é superior a 80%

### 3.3.3. Detecção de anticorpos anti-HLA classe I, II e MICA

Esta detecção é feita pelo método de citometria com esferas utilizando o Kit LabScreen MIXED (One Lambda, Inc) e tecnologia Xmap.(90)

Os antígenos HLA constituem um sistema de glicoproteínas que desempenham um papel funcional na apresentação peptídica no sistema imunitário. Sendo que a presença de anticorpos dirigidos contra este sistema, especialmente se forem anticorpos específicos do dador ou *Donor Specific Antibodies* (DSA), determinam a sobrevivência do enxerto originando respostas mediadas por anticorpos humorais. São várias as possíveis causas do aparecimento destes anticorpos nomeadamente gravidez, transfusões de sangue e derivado e transplante de órgão ou tecidos vascularizados.

Este kit detecta anticorpos anti-HLA Classe I, Classe II e MICA (do inglês *Major Histocompatibility Complex class I chain-related molecule A*), provenientes de diversas linhagens celulares (Anexo 11).(90)

Na detecção de anticorpos contra antígenos da Classe I o kit dispõe de vários conjuntos de esferas. Cada esfera é revestida por moléculas HLA que funcionam como alvo a que correspondem 3 dadores diferentes, totalizando 18 antígenos HLA por esfera (6 HLA-A, 6 HLA-B e 6 HLA-C), mas cada conjunto de esferas não se pode dissociar na interpretação.(90)

No caso dos antígenos da Classe II os conjuntos são de 5 esferas que correspondem a 5 dadores diferentes, totalizando um mínimo de 30 antígenos HLA diferentes por esfera. Estas esferas estão classificadas para os antígenos HLA: 10 HLA-DR e DRB3/4/5 correspondentes, 10 HLA-DQ (cadeia alfa e beta) e 10 HLA-DP (cadeia alfa e beta), não sendo possível a dissociação dos antígenos para efeitos de interpretação.

Para detecção de anticorpos anti-MICA existem 2 conjuntos de esferas, cada qual com 5 antígenos MICA. Para essa identificação os kits dispõem de microesferas de poliestireno codificadas por um fluorocromo e revestidas por moléculas HLA oriundas de linhas celulares. Cada microesfera está revestida por um conjunto de moléculas correspondentes a 3 ou mais

dadores. Após incubação do soro com as esferas, os anticorpos ligam-se aos antígenos HLA e marcam-se com soro com Imunoglobulinas G (IgG) caprino anti-humano conjugado com R-Ficoeritrina (PE). Após lavagens para eliminar tudo o que não se ligou, as amostras estão prontas para a aquisição e análise. A detecção é efetuada por um sistema transdutor de citometria de fluxo (Plataforma Luminex XMAP LAB scan100 ou LABScan3D). Este analisador LABscan deteta a emissão de fluorescência interna identificando a esfera em questão e externa (PE – avaliação do analito) de cada esfera.(90)

As amostras de soro devem ser, de preferência, colhidas em tubo gel. Contudo, também é possível utilizar amostras de plasma colhidas em EDTA. O volume mínimo a utilizar na técnica deve ser de 150µL. A amostra de sangue cumpre os critérios de aceitação se corretamente identificada, colhida há menos de 48 horas e sem sinais de hemólise, lipémia excessiva ou contaminação bacteriana. Em análises futuras podem ainda ser utilizadas amostras colhidas previamente, e respeitando as condições iniciais de aceitação, tenham sido congeladas a -20°C.(90)

A amostra deve ser aliquoteada e mantida de 2-8°C se processada em 48 horas, ou congeladas a -20°C até processamento. Os ciclos de congelação/descongelação devem ser evitados e as amostras inativadas pelo calor devem ser rejeitadas. No caso de amostra de soro, esta deve ser tratada com EDTA 6%. Para isso devem ser adicionados 2,5 µL de solução EDTA 6% a 47,5µL de soro num microtubo de 500µL devidamente identificado. Este procedimento pode ser realizado em placa de 96 poços, para tal devem adicionar-se 1 µL de EDTA 6% a 19 µL de soro na placa, tendo o cuidado de homogeneizar a mesma.(90)

As amostras de plasma EDTA devem ser utilizadas diretamente sem necessidade de adição de anticoagulante EDTA.

O ensaio é verificado pelos controlos internos (positivo e negativo), sendo que o CN são esferas não revestidas que testam a especificidade da reação e o controlo positivo (CP) são esferas revestidas com IgG humano purificadas, que se deverão ligar ao anticorpo secundário para produzirem um sinal positivo. Para além dos controlos internos do kit, deve ser introduzido um CN (amostra conhecida sem anticorpos anti-HLA), um CP (amostra positiva com anticorpos anti-HLA) e uma amostra com padrão de reatividade anti-HLA conhecida.

A análise do perfil de aloreatividade anti-HLA de uma amostra deve:

- I. Ter em conta a informação clínica;
- II. Sempre que possível por comparação com uma amostra prévia do mesmo doente;
- III. Os valores de CP, CN e número mínimo de esferas analisadas por *gate*;
- IV. A análise dos resultados deve ser realizada em *Raw data*, com exceção dos casos em que o valor da esfera CN for superior a 500 *Median Fluorescence Intensity* (MFI). Nesta situação a amostra deve ser adsorvida com reagente de eliminação de fundos,

podendo ser aprovados valores com CN ligeiramente aumentados desde que avaliados em *Baseline*.

- V. CP, esfera revestida com Imunoglobulina IgG humana purificada, irá ligar-se ao segundo anticorpo para produzir um sinal positivo. O valor do CP deve ser superior a 500 e pelo menos o dobro de CN.(90)

Nos Anticorpos anti-HLA Classe I e II, a positividade de cada amostra pode ser calculada através do sinal de fluorescência emitido por cada esfera recoberta, depois de ter sido corrigida a união não específica da esfera ao CN. Todos os resultados são normalizados, de acordo com os resultados obtidos com o CN.

Nos Anticorpos anti-MICA, a positividade é definida quando a MFI do anticorpo HLA é superior a 1000. A validação é feita pelo resultado obtido nos CN e pelo número de esferas analisadas (mínimo de 50 por *gate*). O resultado não deve ser valorizado quando o CN for superior a 500 MFI, se valor for superior a 500, adsorver a amostra com esferas de adsorção e repetir o procedimento. O valor do CP deve ser superior a 500 e pelo menos duas vezes o valor do CN. Na ocorrência desta última situação, o soro deve ser centrifugado a 10000g durante 10 minutos e o teste repetido. Se o resultado continuar a ser o mesmo, repetir o teste com nova amostra.(90)

#### 3.3.4. Identificação de anticorpos anti-HLA classe I ou II

Esta técnica é parecida com a anterior, enquanto a detecção dá uma visão geral da presença de anticorpos, a identificação fornece detalhes específicos, determina contra quais antígenos HLA específicos os anticorpos estão direcionados.

Esta detecção é efetuada, tanto no pré como no pós-transplante, de forma a verificar se o candidato possui ou desenvolveu algum tipo de DSA contra antígenos HLA do dador.(91)

Esta técnica consiste na pesquisa e identificação de anticorpos Anti-HLA Classe I ou Classe II pelo método de citometria com esferas, pelo kit LabScreen SingleAntigen e a tecnologia Xmap®. Para esta identificação os kits dispõem de microesferas revestidas por moléculas HLA puras, que correspondem à definição de um alelo HLA por esfera. Na classe I são identificados anticorpos contra antígenos alvo HLA do locus HLA-A, -B e -C, e na classe II são identificados anticorpos contra antígenos alvo dos loci HLA-DRB1, -DQA1, DQB1, DPA1, DPB1.(91)

Nesta técnica utiliza-se um painel de até 100 microesferas codificadas com diferentes cores revestidas por antígenos HLA purificados. Podem-se combinar diferentes esferas na suspensão de um único teste. Após a incubação do soro com as esferas, os anticorpos ligam-se aos antígenos HLA e após lavagens com solução tampão para remover o que não se ligou, marca-se com soro IgG caprino anti-humano conjugado com PE.

A deteção é efetuada por um sistema transdutor de citometria de fluxo – Luminex XMAP LABscan200 ou LABScan3D, que vai detetar a emissão de fluorescência interna e externa de cada esfera, identificando a esfera em questão e a fluorescência do que está ligado ao exterior da esfera (os anticorpos).

A amostra utilizada deve ser soro, de preferência proveniente de tubo Seco (9mL). Contudo também se pode realizar a partir de amostras de plasma colhidas em EDTA. No caso dos soros, é necessário fazer um tratamento às amostras com EDTA 6% de forma a remover a interferência do complemento na identificação dos anticorpos, via interrupção da cascata do complemento por remoção do cálcio da amostra.

A amostra de sangue cumpre os critérios de aceitação se corretamente identificada, colhida há menos de 48 horas e sem sinais de hemólise. Em análises futuras podem ainda ser utilizadas amostras que colhidas previamente e respeitando as condições iniciais de aceitação tinham sido congeladas a -20°C.

O ensaio é controlado pelos controlos internos positivos e negativos. O CN corresponde a esferas não revestidas, que vão testar a existência de um possível interferente por ligação à esfera e não aos possíveis antígenos HLA na superfície da esfera, o CP são esferas revestidas com IgG humana purificadas que se deverão ligar ao anticorpo secundário de forma a produzirem um sinal positivo.(91)

A análise dos resultados é feita com base no perfil de aloreatividade anti-HLA de cada amostra, que deve ter em conta a informação clínica presente, uma comparação com uma amostra prévia do mesmo doente e os valores dos controlos positivo e negativo.(91)

Se houver uma discrepância na interpretação dos resultados em relação a amostra anterior, pede-se nova amostra para confirmar a técnica ou deve-se contactar a unidade para perceber se o doente fez alguma transfusão, medicação nova ou se teve alguma infeção.

O CN deve ter uma MFI inferior a 500 e CP superior a 1000. Quando CN for superior a 500 MFI, a amostra deve ser adsorvida com reagente de eliminação de fundos

Uma amostra positiva é definida quando a MFI do anticorpo HLA é superior a 1000.(91)

### 3.3.5. Identificação de anticorpos anti-HLA com fração C1q

Esta técnica trata-se de uma modificação da anterior, pretendendo-se fazer a identificação de anticorpos anti-HLA classe I e classe II citotóxicos, fixadores da fração C1q do complemento, pelo método de citometria com esferas utilizando o kit LabScreen SingleAntigen (One Lambda) e a tecnologia Xmap (Anexo 12).(92)

Sendo o complemento um mediador crucial da resposta inflamatória, é composto por conjunto de proteínas, C1 a C9 que atuam em forma de cascata. A fração C1q, é em transplantação uma subunidade do complemento muito importante, uma vez que ativa a via clássica ao ligar-se a imunoglobulinas fixadas a antígenos em patógenos ou células anormais, desencadeando

uma cascata que resulta na formação do complexo de ataque à membrana (MAC) e lise celular. Durante a rejeição de transplantes, C1q pode ligar-se a anticorpos anti-HLA no enxerto, ativando o complemento e causando lesão endotelial e inflamação, contribuindo para a rejeição do mesmo. A monitorização dos anticorpos que ativam o complemento indicam maior risco de rejeição.

Este imunoensaio tem por base ensaios de citometria de esferas, revestidas com antígeno único como alvo para a ligação de um anticorpo específico provenientes de amostras de soro humano (LabScreen SingleAntigen, One Lambda). Após remoção da atividade do complemento na amostra de soro, a amostra a avaliar é adicionada ao reagente LabScreen SingleAntigen, na presença de uma fonte de complemento exterior (C1q). Ao formarem-se complexos antígeno-anticorpo (IgG1, IgG3 ou Imunoglobulina M (IgM)), o complemento C1q liga-se a este complexo. Após a adição de um anticorpo secundário anti-C1q, marcado com PE e incubação, procede-se à remoção do anticorpo secundário não ligado (por processo de lavagem). A Fluorescência final é medida através de um Citómetro de fluxo (LABScan) desenhado para a leitura dupla automática – tecnologia Xmap, indicando a quantidade relativa de anticorpo presente.(92)

Para esta identificação os kits possuem microesferas revestidas por moléculas HLA puras, sendo que cada uma está revestida por moléculas que correspondem à definição de um alelo HLA. Neste método, o conjugado com PE está marcado com um anticorpo C1q anti-humano, a fim da deteção de anticorpos Anti-HLA com fração C1q. Os alvos desta marcação são anticorpos IgG e IgM, no entanto podem ser identificados apenas IgG caso as amostras sejam submetidas a tratamento com Ditriotreitol (DTT) ou a desnaturação da IgM.

Os resultados são obtidos na plataforma Luminex – Técnica XMAP (Kit Onelambda). Um analisador de fluxo LABscan® deteta a emissão de fluorescência da PE de cada esfera, emitindo assim os resultados. A análise dos resultados é efetuada pelo software HLA Fusion, tendo em conta a informação clínica presente na folha de entrada, sempre que possível comparar com uma amostra anterior do mesmo doente, o CN deve ser sempre inferior a 500 MFI, nos casos em que o CN for superior a 500 MFI, a amostra deve ser adsorvida com reagente de eliminação de fundos. O CP (esfera revestida com Imunoglobulina IgG humana purificada) deve ser superior a 500 e pelo menos o dobro do CN. Uma amostra positiva é definida quando a MFI do anticorpo HLA é superior a 300.(92)

Na transplantação, a identificação destes anticorpos revela-se crucial nas amostras dos recetores de órgãos, uma vez que proporciona uma previsão da rejeição mediada por anticorpos, desencadeada pela ativação da cascata do complemento e, por conseguinte, pela formação do componente citotóxico responsável pela lise das células do órgão transplantado.(93)

### 3.3.6. Pesquisa de anticorpos anti-HLA contra Painel

Esta técnica permite a pesquisa de aloanticorpos anti-HLA por microlinfocitotoxicidade mediada pelo complemento, usando um painel de linfócitos com tipagem HLA conhecida (Anexo 13).

Esta pesquisa permite detetar, identificar e conhecer percentagem de anticorpos anti-HLA dos candidatos a transplante. De acordo, com o algoritmo de alocação de aloenxertos renais, este procedimento é um dos fatores de ponderação (% PRA CDC), contribuindo para a identificação do par dador/recetor a transplantar, uma vez que medem a probabilidade de um determinado recetor ter um crossmatch negativo.(94)

O teste é efetuado utilizando a técnica de microlinfocitotoxicidade mediada pelo complemento, em que as células alvo (45-50), tipadas em HLA -A e -B, e representativas da população portuguesa. As células mononucleares que constituem este painel são essencialmente linfócitos T.(94)

A amostra utilizada são suspensões celulares de linfócitos T e amostras de soro de candidatos a transplante. A suspensão celular deve ter sido separada há menos de 48 horas e mantida a 4°C até processamento, sem sinais de contaminação bacteriana. As populações celulares devem apresentar uma viabilidade maior de 80%. A amostra de soro cumpre os critérios de aceitação se corretamente identificada, colhida há menos de 48 horas e sem sinais de hemólise, lipémia excessiva ou contaminação bacteriana.(94)

É utilizado sempre um soro CN, que é um soro AB de homem não imunizado, que não tenha feito nenhuma transfusão ou transplante prévio. O CP contém um pool de soros de doentes hiperimunizados com imunização anti-HLA superior a 85%, sendo que este deve ser sempre o último a ser colocado na placa devido à sua concentração muito elevada. Ainda é utilizado um soro de validação (com histórico) ou seja conhecemos a sensibilização e especificidades, o que no fundo é o indicador da homogeneidade do painel de pesquisa para pesquisa.(94)

A leitura é feita através de observação microscópica e a classificação das reações é de acordo com o *score* internacional de zero (0) a oito (8), sendo que zero é negativo e oito positivo forte. Se no microscópico se observar um campo com células coradas de vermelho significa que as células estão mortas; se estiverem verdes significa que estão viáveis. Isso acontece porque é usado dois corantes específicos, como laranja de acridina + brometo de etídio, para distinguir as células viáveis e células mortas com base na integridade da membrana celular. Quando o corante, brometo de etídio entra na célula lisada e liga-se ao ADN, devido a sua afinidade com ADN, as células ficam vermelhas, o que indica mortalidade celular.

O resultado obtido do estudo de cada antissoro utilizando um painel de células deve ser avaliado por meios informáticos relativamente a positividade contra o painel e as especificidades Anti-HLA encontradas. Na ficha de cada doente relativamente a cada

antissoro estudado devem constar a positividade e as especificidades Anti-HLA desde que o coeficiente de correlação seja superior a 0,50. Se os antissoros estudados forem negativos, ou tiverem positividade inferior a outros existentes podem ser eliminados desde que não seja o último soro do doente nem o soro antes do transplante.(94)

A validação do ensaio é garantida pela inclusão em cada placa de CN e CP. Se o CP não funcionar a interpretação do teste continua a ser válida se a viabilidade das células for igual ou superior a 80% e na placa em questão existirem reações positivas. A validação do painel de células é garantida pela inclusão de uma amostra com padrão de aloreatividade e especificidade conhecida.(94)

Um PRA alto indica uma maior sensibilização, o que pode limitar as opções de dadores compatíveis.

### 3.3.7. Crossmatch CDC

Anticorpos anti-HLA são produzidos em resposta a vários estímulos. Como já referidos anteriormente, os mais comuns são a aloimunização por gestações, transfusões e transplantes prévios.

Esta técnica deteta a presença de anticorpos fixadores do complemento (IgM, IgG1 e IgG3) anti- dador pré-formados no soro dos potenciais recetores. São utilizadas como células alvo, linfócitos viáveis de sangue periférico (Anexo 14).(95)

No crossmatch anti-HLA classe I podem utilizar-se linfócitos totais, que são predominantemente T e expressam antigénios HLA classe I ou linfócitos T, no crossmatch anti-HLA classe II utilizam-se linfócitos B que expressam antigénios HLA da classe I e II. Além, de reações positivas contra antigénios HLA da classe I ou II, podem ocorrer reações falsas positivas resultado da presença de anticorpos não HLA fixadores do complemento. Este crossmatch é efetuado pela técnica de citotoxicidade dependente do complemento e tem por objetivo detetar anticorpos anti-HLA da classe I e da classe II no recetor contra o potencial dador.(95)

No caso de reações positivas, presença de anticorpos contra um dador de órgãos sólidos, o recetor deixa de ser eletivo para o transplante com este dador (sempre que o teste seja efetuado sem redução das IgM em paralelo). A presença de anticorpos anti-HLA contra o dador pode levar a uma reação hiperaguda, com conseqüente perda do enxerto.(95)

Este procedimento é efetuado prospectivamente a todos os candidatos a transplante de órgãos sólidos.

Amostra do dador, são linfócitos T e B, isolados por seleção negativa com esferas imunomagnéticas (técnica já referida neste relatório, com viabilidade celular superior a 90%). Amostra do recetor, deve ser uma amostra de soro recente, que não deve ultrapassar 3 a 4 meses para candidatos a transplante renal e reno-pancreático e 6 meses para candidatos a

transplante cardíaco, pulmonar e pancreático isolado. No caso de existirem eventos sensibilizantes recentes reportados, se a amostra biológica tiver menos de 15 dias após o evento, o crossmatch deve ser realizado com uma amostra o mais recente possível. Podem ainda ser incluídos soros históricos (transplante de órgãos cardio-torácicos), nomeadamente soro pós-transfusão e soro de pico. Os soros usados no crossmatch previamente ao transplante são criopreservados em Seroteca.(95)

A amostra de soro do recetor deve ser tratada para inativação das IgM, sempre que:

- Crossmatch de urgência com dador falecido;
- Todos os recetores candidatos a transplante cardíaco e pulmonar;
- Candidatos a transplante renal ou reno-pancreático referenciados;
- Crossmatch com dador vivo para transplante de órgãos sólidos; sempre que o resultado for positivo.(95)

Nestas situações, o soro inativado deve ser estudado em paralelo com o soro não inativado. A pesquisa de anticorpos é feita numa microplaca. Para dar início às reações, é necessário parafinar a placa de Terasaki (que ajuda a evitar evaporação e contaminação, mantendo a integridade das amostras) em seguida pipetar as amostras e os controlos. Antes de carregar o Crossmatch, é muito importante verificar a viabilidade das células depois de separadas. Para tal junta-se lhes uma mistura de laranja de acridina com brometo etídio, que vai permitir, em microscópio de fluorescência, verificar a viabilidade celular.

Para controlar o Crossmatch, são usados CP e CN em todas as placas. O CN é um soro AB de homem não imunizado. O CP contém um pool de soros de doentes hiperimunizados com imunização anti-HLA superior a 85%, sendo que este deve ser sempre o último a ser colocado na placa devido à sua concentração elevada.(95)

A placa é incubada à temperatura ambiente durante 35 minutos para que ocorra a reação antigénio-anticorpo. De seguida são adicionados 5µL de complemento de coelho + 50% de meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (se houver formação de complexo antigénio-anticorpo, o complemento será ativado, resultando na lise das células do dador) com solução corante AO/EB *stock*, que deve ser adicionada ao complemento na proporção 10µL para 1mL de complemento. É depois feita uma incubação de 1h15, ao abrigo da luz.(95) A leitura e interpretação das placas são realizadas num Microscópio Binocular Invertido de Fluorescência e são executadas por dois profissionais de saúde qualificados. E a classificação das reações é de acordo com o *score* internacional de zero (0) a oito (8), sendo que zero é negativo e oito positivo forte, que está associada a percentagem de mortalidade. As reações devem ser consideradas positivas quando a mortalidade é superior ao CN.(95)

No Autocrossmatch, na primeira fila da placa é colocado o soro do próprio doente em 3 dos 6 poços, sendo que este é diluído com soro AB não imunizado nos restantes 3 poços da fila. Isto é efetuado de forma a prevenir fenómenos de pró-zona que possam ocorrer devido a uma

concentração demasiado elevada de anticorpos. As células são colocadas utilizando uma microsseringa Hamilton, que dispensa 1µL para cada um dos poços.

Se no microscópico se observar um campo com células coradas de vermelho significa que as células estão mortas; se estiverem verdes significa que estão viáveis. Uma reação positiva, é quando o corante entra na célula e brometo liga-se ao ADN, devido a sua afinidade com ADN, as células ficam vermelhas, o que indica mortalidade celular, impedindo desta forma o seguimento com o transplante. O score de classificação será de 8 positivo forte, que está associada a uma percentagem de mortalidade.

Nas reações negativas há predominância de células verdes (não houve entrada do corante brometo de etídio), logo o recetor não tem anticorpos contra o dador e por isso o transplante pode avançar.

Na inativação das IgM, é necessário realizar um tratamento com DTT (agente redutor que quebra as pontes dissulfeto presentes nas moléculas de IgM, levando a sua desnaturação, o que permite diferenciar os anticorpos IgM e IgG, perdendo a sua funcionalidade e capacidade de ligação ao antigénio) nas amostras, na proporção de 1 para 1 e incubá-las a 56°C durante 30 minutos, de forma a desnaturar as IgM, para perceber se o resultado positivo se deve às IgM ou às IgG. Se após este procedimento e a realização da técnica novamente, a reação for positiva, significa que esta é provocada por anticorpos IgG, impedindo assim o transplante, dado que IgG positivas provocam rejeição aguda ao tecido. Caso o resultado seja negativo, significa que a reação positiva inicial era provocada por IgM e por isso pode-se dar seguimento ao transplante.(95)

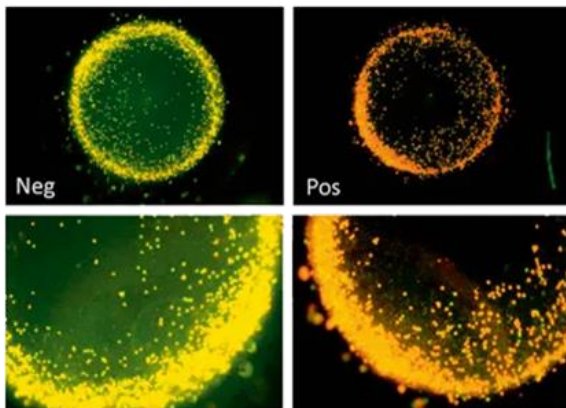


FIGURA 3.4. Resultados de CDC.

Fonte: <https://abdominalkey.com/histocompatibility-in-renal-transplantation>

### 3.4. Citometria de fluxo e separação celular

#### 3.4.1. Separação celular

A separação celular é um procedimento que permite a separação e isolamento de populações celulares específicas e homogêneas com base nas suas características morfológicas,

estruturais e moleculares, a partir de uma amostra heterogênea, proporcionando uma abordagem precisa para análise celular.

No decurso deste estágio o citómetro utilizado é um BD FACSAria™ III Cell Sorters. É um citómetro de fluxo avançado utilizado para a classificação de células com base nas suas propriedades físicas e características fluorescentes. Este equipamento combina os princípios de dispersão de luz e fluorescência para fornecer uma análise detalhada das células.

Os princípios de funcionamento envolvem, em primeiro lugar, a dispersão de luz, que pode ser de dois tipos: a dispersão frontal (FSC - Forward Scatter), onde a luz dispersa num ângulo pequeno (0-10 graus) fornecendo informações sobre o tamanho das células, e a dispersão lateral (SSC - Side Scatter), onde a luz dispersa num ângulo superior (90 graus) fornece informações sobre a complexidade interna das células, como a granularidade e a estrutura interna. Além da dispersão de luz, a técnica beneficia da fluorescência. As células são previamente marcadas com anticorpos monoclonais específicos conjugados com fluorocromos. Estes anticorpos ligam-se a componentes celulares específicos, permitindo a identificação e caracterização das células com base na emissão de fluorescência quando excitados por um laser. Quando o laser do citómetro incide sobre as células marcadas, os fluorocromos absorvem a energia e emitem luz em comprimentos de onda específicos, que são então detetados por fotomultiplicadores no citómetro.

O funcionamento do BD FACSAria™ III inicia-se com a preparação da amostra. As células são suspensas num fluido e introduzidas no citómetro, onde fluem numa fila única através de um capilar fino onde são excitadas ou estimuladas por um ou mais feixes de laser. À medida que cada célula passa pelo feixe de laser, ocorre a dispersão de luz e emissão de fluorescência. Os sinais de dispersão de luz (FSC e SSC) e os sinais fluorescentes são então adquiridos por detetores específicos e processados para fornecer informações quantitativas e qualitativas sobre cada célula. Com base nas características detetadas, as células podem ser classificadas em diferentes populações. O citómetro pode então direccionar as células para diferentes recipientes para recolha posterior, utilizando cargas eletrostáticas para desviar as gotas contendo as células de interesse. Ao fazer incidir sob a amostra lasers com comprimentos de onda específicos os corantes emitem fluorescência, e os detetores do citómetro medem a intensidade e a cor dessa fluorescência. Este processo permite a identificação e a seleção de populações celulares com base em marcadores moleculares específicos.(96)

As aplicações do BD FACSAria™ III são variadas, incluindo imunofenotipagem, onde se identifica e quantifica subpopulações celulares específicas com base na expressão de marcadores de superfície ou intracelulares; isolamento de células, que permite a separação de células raras ou específicas para estudos subsequentes como cultura celular, análise

genética ou pesquisa de doenças; e diversas pesquisas biomédicas, tais como estudos sobre a progressão de doenças, resposta imunológica e desenvolvimento de terapias celulares.

As vantagens deste equipamento incluem alta precisão na análise e classificação de células, versatilidade para uma ampla gama de aplicações em pesquisa e diagnóstico, e processos automatizados que aumentam a eficiência e a reprodutibilidade.

No caso específico deste estágio o equipamento é utilizado para a separação de diferentes populações celulares para a avaliação de quimerismo em transplantados de progenitores hematopoiéticos, a partir de amostras de sangue periférico ou sangue medular. Dependendo das populações pretendidas para a análise, podem ser utilizados diversos marcadores de diferenciação (CD) conjugados com diferentes fluorocromos (ex: CD33 linhagem mieloide, CD3 linhagem linfóide e CD34). As CD33+ são marcadas com Alofocianina (APC), enquanto as CD3+ são marcadas com PE. No caso de amostras de medula, estas são usadas na sua totalidade já que a quantidade de células (leucócitos) é maior que no caso do sangue periférico.(96)

Durante o procedimento as amostras de sangue periférico ou de medula, são colocados tubos de acordo com o tipo de células a separar, aos quais é adicionado o anticorpo monoclonal desejado. Deste modo é possível separar até 4 tipos de células. As células passam pelos lasers através de foco hidrodinâmico. Quando as células, marcadas com fluorocromos passam pelo laser, absorvem energia e passam ao seu estado excitado. Quando retomam ao seu estado inicial, libertam energia que é emitida através de luz.(97)

Antes do processamento das amostras, é feito o controle de qualidade diário, para garantir o bom funcionamento do equipamento com Esferas de Configuração e Rastreamento do Citómetro (CRC), para definir os valores base e para direcionar os Sorters. Para além disso, são utilizadas Accudrops para determinar o intervalo de tempo entre o momento em que a partícula atravessa o laser e em que atinge o ponto em que a gota é cortada.

No final, são feitos ajustes no software, nas *gates* para ser verificada a pureza da população separada. São colocados tubos correspondentes para cada uma das populações separadas no suporte de amostra e adquirir preferencialmente 1000 eventos. É importante deixar passar água entre cada tubo para evitar a contaminação entre populações.(96)

A partir desta técnica vão ser obtidas populações isoladas das linhagens linfóide, mieloide e hematopoiética da amostra do paciente que serão usadas no estudo de quimerismo.

### 3.4.2. Crossmatch FCM

De igual modo, ao anteriormente apresentado na separação celular, *Cell sorting*, o princípio básico de funcionamento do equipamento é o mesmo. Neste caso, o citómetro vai identificar as células com base na sua complexidade, tamanho, marcação com anticorpos específicos CD3 e CD19 para os linfócitos T e linfócitos B respetivamente. É adicionalmente utilizado um

anticorpo anti-Pan IgG humana para avaliar se á superfície dos linfócitos existe algum anticorpo anti-IgG ligado.

A técnica de FCM tem como objetivo a determinação de anticorpos pré-formados, neste caso específico Pan IgG dirigidos contra-estruturas à superfície de um linfócito, nomeadamente dirigidos contra antigénios HLA (Anexo 15). Esta técnica apresenta uma sensibilidade muito superior ao verificado com CDC, possibilitando a identificação da presença de anticorpos de baixo título, responsáveis pela rejeição aguda.(98)

Neste laboratório, por forma a aumentar a sensibilidade da técnica, reduzir os custos esta técnica é efetuada recorrendo, inicialmente a uma purificação celular, por forma a obter os linfócitos totais e de seguida a um tratamento enzimático dos linfócitos por forma a reduzir um conjunto de ligações inespecíficas. O tratamento enzimático é efetuado com duas enzimas: pronase, que é uma enzima com atividade proteolítica que diminui os recetores FcγRII aumentando a especificidade da ligação da Anti-IgG aos linfócitos B e assim a sensibilidade do teste, e a ADNse, que por sua vez reduz a formação de agregados celulares facilitando a aquisição e células isoladas no citómetro.(98)

Sempre que há um potencial dador em estudo, de órgão sólido, seja de um dador vivo ou dador falecido, é efetuado um Crossmatch por citometria de fluxo com marcação específica das células B usando CD19+ e T usando CD3+. Neste procedimento, o soro do doente é incubado em contacto com as células do dador, de forma a verificar a presença de anticorpos contra antigénios presentes no dador. Para que este procedimento possa ocorrer, a amostra colhida em heparina é centrifugada e é retirado o *buffy coat*, a partir do qual se procede à separação dos linfócitos totais. Utiliza-se o Kit EasySep™ Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit, da STEMCELL Technologies. Este corresponde a um isolamento linfocitário por separação magnética negativa com beads, que estabelecem ligações com várias moléculas presentes noutras populações celulares, e não em linfócitos. Resultado deste processo as células marcadas são atraídas para o suporte magnético, deixando em suspensão apenas os linfócitos (seleção negativa). Este processo é realizado três vezes até obter uma solução de linfócitos o mais pura possível. Depois de obtida a solução de linfócitos, estes são submetidos a um tratamento enzimático com a Pronase e ADNse. A seguir é feita a distribuição nos poços, juntamente com os CP (soros obtidos de pools constituídos por mais de 10 amostras provenientes de doentes hiperimunizados para IgG, e que vai ser usado em duas diluições diferentes de forma a controlar a positividade do cut-off), CN (soro humano proveniente de homens não imunizados, do grupo sanguíneo AB, num total de 3 amostras diferentes), a(s) amostra(s) a testar, sempre em duplicado e uma amostra para avaliação da auto fluorescência das populações celulares (linfócitos T e linfócitos B).(98)

Após o tempo de incubação de 20 minutos efetuam-se 4 lavagens, que possibilitam eliminar os anticorpos IgG que não se ligaram às células. De seguida, adicionam-se 50µL do “cocktail”

de anticorpos monoclonais: anti-CD3+ que vai marcar os linfócitos T, anti-CD19+ que vai marcar os linfócitos B, Anti-IgG Fitc (fluorocromo isotiocianato de fluoresceína) e Tampão de solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS).

Após uma incubação de 5 minutos efetuam-se duas lavagens e ressuspendem-se as células em 200 µL da solução de lavagem.(98)

A aquisição é feita num Citómetro – BD FACSLyric. O protocolo de aquisição está configurado para a aquisição de 500 células CD19+, isto é, linfócitos B.

A análise e interpretação dos resultados é efetuada no programa de análise FlowJo, assim como a validação dos controlos e das amostras.

A interpretação do crossmatch envolve a comparação da intensidade de fluorescência das células do dador misturadas com o soro do paciente com a das mesmas células do dador misturadas com um soro de CN conhecido. Estes valores de fluorescência são então matematicamente convertidos em valores de Rácio Numérico Relativo (NR) usando a fórmula:  $NR = (\text{Canal Médio da Amostra} / \text{Canal Médio do CN})$ . Um resultado de FCM é classificado como negativo se  $NR \leq 1.5$ , fracamente positivo se  $1.5 < NR \leq 1.8$ , e positivo se  $NR > 1.8$ . O valor de corte de NR foi baseado na média mais três vezes o desvio padrão de todos os resultados do FCM verdadeiramente negativos.

Para a técnica do Crossmatch ser considerada válida, os resultados dos controlos devem estar de acordo com o controlo usado (negativo e positivo). Os valores de MFI dos CN obtidos devem estar dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para os controlos a uso.

Como controlo interno do equipamento, usam-se as Esferas CRC que são micropartículas fluorescentes com características físicas e óticas conhecidas como tamanho e intensidade da fluorescência, o que permite ajustes precisos e garante a precisão e consistência das medições de fluorescência durante as análises das amostras. Com base nos resultados obtidos, faz-se a avaliação do risco imunológico do transplante, categorizando-o em níveis que variam de mínimo a elevado, incluindo ainda a classificação como muito elevado e contraindicado.

Esta técnica também pode ser utilizada como seguimento pós-transplante para verificar a presença de anticorpos entretanto desenvolvidos nos pós-transplante.

### **3.5. Laboratório de agentes transmissíveis**

Neste laboratório realizam-se análises de marcadores serológicos de agentes de doenças transmissíveis em dadores e candidatos a transplantação de órgãos sólidos e em potenciais dadores do “CEDACE”. Além disso, faz-se a preparação de placas e separação dos soros em alíquotas para realização de técnicas no laboratório de serologia e para envio de amostras para outros centros de transplantação, caso o candidato ao transplante esteja inscrito noutras

regiões ou conste na lista de candidatos nacional. As restantes alíquotas são guardadas a -30°C na Seroteca, caso seja necessário para serem utilizadas em contexto de urgência.

### 3.5.1. Determinação de marcadores serológicos

Marcadores serológicos são substâncias presentes no sangue que podem ser detetadas e medidas para ajudar no diagnóstico e prognóstico de várias doenças. Esses marcadores geralmente incluem anticorpos, antígenos, proteínas e enzimas que estão associadas a uma resposta imunológica ou a características específicas de uma doença.

Neste laboratório, é feita a determinação de marcadores serológicos de agentes de doenças transmissíveis em dadores e em candidatos a transplantação renal e os critérios de aceitação e de exclusão em potenciais dadores do “CEDACE”, e também em dadores falecidos, em contexto de urgência.(99)

Marcadores serológicos de doenças transmissíveis a realizar:

- VHB: Antígeno HBs (Ag HBs), Anticorpo Anti HBc (Anti HBc), Antígeno HBe (Ag HBe), Anticorpo IgM anti HBc (Anti HBcM), Anticorpo anti HBc IgG (Anti HBcG), Anticorpo Anti Hbe (Anti Hbe), Anticorpo Anti HBs (Anti HBs);
- VHC: Anticorpo Anti VHC (Anti VHC);
- VIH: Anticorpo Anti VIH1/2 (Anti VIH 1/2);
- HTLV: Anticorpo Anti HTLV I/II (Anti HTLV I/II);
- Serologia da Sífilis: Teste Sífilis (Anticorpo Treponema Pallidum IgG/IgM);
- CMV: Anticorpo Anti CMV IgG;
- EBV: Anticorpo Anti EBV IgG.(99)

Após centrifugação das amostras (soro) no programa adequado. As amostras são analisadas no Equipamento Alinity i da Abbott, que utiliza um *Chemiluminescence Microparticle Immunoassay* (CMIA) ou Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência para obtenção de resultados.

É realizada uma incubação da amostra, com micropartículas magnéticas revestidas com o antígeno ou anticorpo para o microrganismo em pesquisa e com um diluente. Desta forma, as imunoglobulinas presentes na amostra do paciente ligar-se-ão ao antígeno das micropartículas, ou vice-versa. Em seguida, realiza-se uma lavagem para remover todas as partículas não ligadas, são colocadas imunoglobulinas anti-humanas marcadas com acridina e a solução é incubada. Depois de um ciclo de lavagem, são adicionadas as soluções pré-ativadora e ativadora. A solução pré-ativadora (peróxido de hidrogénio) cria um ambiente ácido que vai evitar a libertação prematura de energia, evita que as micropartículas se aglomerem e eliminem a matéria corante da acridina do conjugado ligado ao complexo de micropartículas. A solução pré-ativadora também permite que o sistema ótico CMIA efetue

uma leitura de fundo. Esta leitura é feita antes da adição da solução ativadora, que cria um ambiente alcalino. A exposição ao peróxido de hidrogénio no ambiente alcalino faz com que a matéria corante da acridina seja sujeita a uma reação oxidativa. Esta reação provoca uma reação quimiluminescente, que é medida pelo sistema ótico CMIA ao longo de um tempo predefinido. A reação de CMIA é medida em Unidade Relativas de Luz ou *Relative Light Units* (RLU). A presença ou ausência de anticorpos/antígenos na amostra do paciente é determinada por comparação com os RLU de um calibrador.(100)

O resultado obtém-se através da comparação do RLU com o valor do cut-off da calibração do Kit. Assim, a amostra com a presença de analito tem um resultado reativo com as RLU iguais ou superiores ao valor do cutoff.(100)

É necessário proceder ao controlo de qualidade antes de processar as amostras no equipamento, para isso são programados os controlos internos positivos e negativos de cada kit, assim como os controlos externos positivos para cada teste. Estes controlos externos positivos consistem em soros humanos previamente identificados como positivos para os testes em questão e são conhecidos como Accuruns. Servem para monitorar e validar o desempenho dos testes garantindo assim a precisão e a confiabilidade dos resultados.

Após a validação dos controlos, que devem estar dentro de um intervalo de valores específicos e definidos, permanecem válidos por um período de 24 horas, as amostras são colocadas no equipamento para serem processadas.(99)

Sempre que há um resultado positivo (exceto CMV IgG, Anti-HBs e EBV) tem de ser confirmado, repetido em duplicado. É válido o resultado concordante em dois dos duplicados. De acordo com a Circular Normativa Nº 001-A/CN-IPST, IP/2018, DE 11 de abril, emitida pelo IPST (Anexo 16), devem ser considerados critérios de exclusão para a doação de órgãos a presença de positividade para os seguintes marcadores:

- Anti-VIH 1/2
- Anti-HTLV I/II
- Hepatite B (Ag HBs e Anti-HBc IgM)

Não se incluem nestes critérios de exclusão dadores com Anti-HBc IgG positivo/Ag HBs negativo, desde que salvaguardando a possibilidade de profilaxia da infeção pelo VHB do recetor, de acordo com o órgão transplantado. Esta norma não se aplica a idade pediátrica em situações não-emergentes;

- Hepatite C

A positividade do Anti VHC não exclui a possibilidade de doação, se salvaguardado o conhecimento em tempo útil da negatividade da carga viral, avaliado por TAN ou outro método equivalente. Deve ser conhecido o genótipo do vírus.(68)

Deve ser conhecido o perfil serológico referente a CMV, EBV e Treponema Pallidum, não constituindo critério de exclusão para a doação de órgãos.

O EBV é um dos vírus mais comuns em humanos, também denominado de herpes vírus humano 4(HHV-4). No adulto, com idade superior a 25 anos, a seroprevalência é superior a 95%. Relativamente a pesquisa deste vírus deve ser feita o estudo do EBV IgG que é utilizado como meio auxiliar no diagnóstico da mononucleose infecciosa e na determinação da fase da infecção por EBV. Caso o resultado do teste seja negativo deve ser realizado o teste EBV IgM para determinação do estado de infecção.(68)

### **3.6. Controlo de qualidade**

Os laboratórios do CST-Lisboa estão acreditados pela Federação Europeia de Imunogenética (EFI, que é uma organização científica e profissional que tem como objetivo promover a pesquisa e a educação em imunogenética, bem como garantir a qualidade dos laboratórios envolvidos nessa área) e certificados pela Associação Portuguesa de Certificação (APCER, que é uma entidade de referência em Portugal e no contexto Europeu para a certificação de sistemas de gestão, produtos, serviços e pessoas, segundo a norma ISO9001:2015 - Gestão da Qualidade, que garante que uma organização cumpre os requisitos de um sistema de gestão de qualidade, focado na satisfação do cliente e na melhoria contínua, também realiza auditorias de conformidade e oferece programas de formação para capacitar organizações e indivíduos nas áreas de gestão de qualidade), tendo implementados um sistema de controlo de qualidade que envolve o controlo de qualidade interno (CQI) e o controlo de qualidade externo (CQE).(101)

Controlo de Qualidade é um conjunto de práticas e procedimentos utilizados para garantir a precisão, confiabilidade e consistência dos resultados dos testes laboratoriais. Essa abordagem visa assegurar que os dados gerados pelos laboratórios sejam consistentes, reproduzíveis e atendam aos padrões de qualidade exigidos para a prática clínica. O controlo de qualidade em laboratório clínico desempenha um papel crucial na garantia dos resultados laboratoriais, contribuindo para a prestação de cuidados de saúde de qualidade.(102)

Baseia-se na implementação de procedimentos de controlo como: manutenção dos equipamentos, calibração dos equipamentos, validação de métodos, treino contínuo dos profissionais, documentação adequada (manutenção e arquivos de registos detalhados de todos os processos laboratoriais, desde a colheita até ao envio de resultados), manutenção da qualidade das amostras (processamentos e armazenamentos corretos das amostras), controlo de possíveis fontes de contaminação, garantindo a pureza das amostras e reagentes, gestão de não-conformidades (desenvolver protocolos para lidar com não-conformidades, incluindo investigação, correção e prevenção de ocorrências)

### 3.6.1. Controlo de qualidade interno

Controlo de qualidade interno, é um procedimento intralaboratorial que permite a avaliação da precisão dos resultados de testes laboratoriais. Para tal são utilizadas amostras que possuem valores analíticos conhecidos. De acordo com cada laboratório e técnica é aplicado um controlo interno de qualidade, positivo e negativo.(102)

### 3.6.2. Controlo de qualidade externo

Controlo de qualidade externo consiste na participação do laboratório em programas de controlo de qualidade externo, um programa Interlaboratorial, nos quais o laboratório recebe amostras cegas, por um organismo externo e independente da qualidade, para análises e faz comparação dos resultados obtidos com os valores de referências para avaliar a precisão e exatidão. De forma a garantir a fidedignidade dos resultados lançados.(102)

Este laboratório tem programa com o International Quality Expertise UK (NEQAS – National External Quality Assessment Service), que fornece controlos para as técnicas de todos os laboratórios com periodicidades diferentes. Para a sequenciação HLA o controlo externo pertence à Universidade da califórnia (UCLA) e são recebidas 24 amostras por ano, e GECLID para as técnicas de Alossensibilização e Serologia HLA.

### 4.1 Monitorização de quimerismo

#### 4.1.1 Caso 1

Este caso clínico trata-se da monitorização de quimerismo no seguimento de um TCEH. O transplante foi realizado em 02/2021. Trata-se de um alotransplante não relacionado, de um recetor do sexo feminino que foi transplantado com células estaminais hematopoiéticas de um dador também do sexo feminino. Nas Figuras 1 e 2 do Apêndice 1 estão apresentados os perfis de referência pré-transplante tanto do recetor como do dador.

##### 1ª Avaliação – 31 dias após o transplante

O 1º estudo de quimerismo foi feito 31 dias após o transplante. As linhagens celulares estudadas foram o CD3+ (linhagem linfóide), CD33+ (linhagem mielóide), CD34+ (CPHs) e células totais, pelo que se tratava de uma amostra de medula óssea.

Na análise do painel das células CD3+, observam-se tanto alelos do recetor como do dador, ou seja, há um Quimerismo Misto com presença das linhagens do recetor e do dador ao mesmo tempo (Figura 3 do Apêndice 1). O mesmo já não acontece no painel CD33+, CD34+ e células totais, uma vez que se observa que o recetor possui apenas alelos do dador (Figuras 4, 5 e 6 do Apêndice 1). Nestas três populações estamos perante um quimerismo total, o que significa que há presença apenas da linhagem do dador, que poderá indicar um bom prognóstico para o recetor. A presença de quimerismo misto evidenciado na linhagem linfóide não foi detetada nas células totais, provavelmente devido à pouca quantidade de células linfóides isoladas e porque a percentagem de células provenientes do recetor é de apenas 3%.

A partir desta análise feita é preenchido um relatório com o software GenoProff2, o resultado é enviado sob a forma de uma tabela e de um gráfico (Tabela 1 e gráfico 1 do Apêndice 1). A tabela corresponde à frequência do genótipo do dador e o gráfico diz respeito à evolução das populações no recetor ao longo do tempo. O NI (não informativo), refere-se na interpretação quando ambos os alelos estão presentes tanto no recetor como no dador. Assim, a partir destes marcadores não é possível retirar nenhuma conclusão, logo são designados pelo software como NI. O NT (não testado), é um pico que foi retirado do cálculo devido a artefactos que influenciam a interpretação do eletroferograma.

##### 2ª Avaliação – 262 dias após o transplante

A doente voltou a fazer a monitorização após 262 dias do transplante.

Verificou-se que no painel das células CD3+ há um quimerismo total, com presença apenas dos alelos do dador, o mesmo não acontece com as outras populações onde se verifica um quimerismo misto em todos os locis. (Figuras 7, 8, 9 e 10 do Apêndice 1). Ao observar o gráfico deste relatório (Tabela 2 e gráfico 2 do Apêndice 1) verifica-se que as linhagens sofreram alterações, verificando uma descida acentuada a partir de setembro de 2021, desde o transplante. Para se perceber a razão pela qual isto aconteceu seria necessário o acesso à informação clínica do recetor, que não é fornecido ao laboratório.

### 3ª Avaliação – 422 dias após o transplante

Passados 422 dias após o transplante, a doente voltou a fazer a monitorização, desta vez com amostra de sangue periférico, em que se verificou em todas as populações quimerismo total, apenas células do dador. Ao interpretar o gráfico verificou-se que houve um aumento acentuado de todas as populações, não tendo mais informações clínicas do doente, deduzimos que a terapia administrada teve bons resultados. (Figuras 11, 12, 13, tabela 3 e gráfico 3 do Apêndice 1).

## 4.1.2. Caso 2

### PARTE I – 1º Transplante, alotransplante relacionado

Neste caso clínico o transplante foi realizado em 08/2016. Trata-se de um recetor do sexo masculino que foi transplantado com células estaminais hematopoiéticas de um indivíduo também do sexo masculino, dador alogénico relacionado (Figura 1 e 2 do Apêndice 2).

### 1ª Avaliação – 29 dias após o transplante

O primeiro estudo do quimerismo foi realizado após 29 dias e as linhagens utilizadas foram o CD3+, CD33+, CD34+ e células totais, pelo que se tratava de uma amostra de medula óssea. Na análise do painel das células CD3+ observa-se um quimerismo misto (Figura 3 do Apêndice 2). O mesmo já não acontece no painel CD33+ e CD34+, uma vez que se observa que o recetor possui apenas alelos do dador, neste caso estamos perante um quimerismo total, o que sugere bons resultados para o recetor (Figuras 4 e 5 do Apêndice 2).

### 2ª Avaliação – 252 dias após o transplante

O doente voltou a fazer a monitorização após 252 dias do transplante.

Verificou-se que em todos os painéis das células (CD3+, CD33+ e CD34+) que há um quimerismo total, sugerindo boa implantação do enxerto (Figuras 6, 7 e 8 do Apêndice 2).

### 3ª Avaliação – 1801 dias após o transplante

Passados 1801 dias após o transplante, o doente voltou a fazer a monitorização, desta vez com amostra do aspirado de medula óssea, em que se verificou quimerismo total na linhagem linfóide e mista nas outras linhagens, sugestivo de mau prognóstico (Figuras 9, 10, 11 e 12 do Apêndice 2).

Perante esses resultados, não tendo mais informações clínicas do doente, verifica-se que provavelmente o doente poderá estar a ter uma rejeição. Posteriormente recebeu-se uma nova amostra para o estudo do mesmo recetor, com informação que tinha sido efetuado um segundo transplante com um dador não relacionado.

Perante os resultados anteriores, chegou-se à conclusão de que o doente rejeitou o enxerto e após avaliação médica, avançou para um segundo transplante.

Para se efetuar este novo estudo pós-transplante foi estabelecido a referência do 2º dador (Figura 13 do Apêndice 2). Quando se faz um estudo de quimerismo no 2º transplante deve-se sempre procurar identificar o genótipo referente ao primeiro dador, de modo a distinguir entre as células do doente e as células do primeiro dador, facilitando a interpretação do quimerismo após o segundo transplante.

## PARTE II – 2º Transplante, alotransplante não relacionado

O segundo TCEH foi realizado em 07/2021, com um dador não relacionado

### 1ª Avaliação – 28 dias após o segundo transplante

Passado 28 dias do segundo transplante, foi feito um estudo de Quimerismo.

A análise do quimerismo foi feito de uma amostra de sangue periférico em que tanto a linhagem mielóide CD33+, linhagem linfóide CD3+ e células totais, apresentaram quimerismo total. (Figuras 14, 15 e 16 do Apêndice 2)

### 2ª Avaliação – 136 dias após o segundo transplante

Após nova monitorização, passados 136 dias, verificou-se os mesmos resultados numa amostra de sangue periférico, as linhagens apresentaram um quimerismo total. (Figuras 17, 18 e 19 do Apêndice 2).

### 3ª Avaliação – 366 dias após o segundo transplante

Passados 366 dias do 2º transplante, com um novo estudo realizado, verifica-se bons resultados mantendo quimerismo total em todas as populações, nesta análise foi feita numa amostra medular (Figuras 20, 21, 22 e 23 do Apêndice 2).

Durante as avaliações de quimerismo, o genótipo das diferentes populações celulares da amostra foi comparado com o genótipo autólogo do doente e com o genótipo do dador do primeiro transplante.

#### **4.2. Estudo HLA para transplantação renal (recetor e dador vivo)**

Neste estudo realiza-se uma avaliação abrangente dos perfis HLA do recetor e do dador vivo, utilizando técnicas de genotipagem HLA da classe I e II, além disso é investigada a presença e a especificidade dos anticorpos Anti-HLA no soro do recetor contra os antígenos HLA do dador.

A interpretação dos resultados dessas análises é essencial para determinar a compatibilidade entre o recetor e o dador, identificar possíveis riscos de rejeição do enxerto e orientar as decisões clínicas relacionadas ao transplante.

O estudo foi feito entre o candidato do sexo masculino com uma potencial dadora relacionada (esposa) e obtiveram-se os seguintes resultados, conforme identificados no apêndice 3:

- Tipagem AB0: Os grupos AB0 deste par dador/recetor são compatíveis;
- Genotipagem HLA Classe I/II: Os estudos imunogenéticos HLA-ABC DRDQDP feito pela técnica NGS, revelou incompatibilidades HLA significativas em 8/11;
- Caracterização da Especificidade de Anticorpos Anti HLA Classe I/II: Foram detetados muitos DSA, tanto na classe I como na classe II, o que pode levar a uma resposta imunitário contra o enxerto;
- Fixadores da Fração C1q do Complemento: Os anticorpos detetados são fixadores do complemento, o que indica a ativação do sistema de complemento que pode contribuir para a rejeição do enxerto;
- Estudo de Microbiologia para Transplantação: Perante os resultados, tanto do paciente como do potencial dador são negativos exceto Ac CMV IgG e Ac HBs, o que pode ser sugestiva de exposição previa a esses vírus, como a vacinação, não contrapondo o transplante;
- Crossmatch anti-Linfocitário por Citometria de Fluxo e por Citotoxicidade mediada pelo Complemento: Os resultados obtidos no CDC foram positivos para os linfócitos B tanto para o soro do pico como no soro recente. No caso dos linfócitos T são positivos no soro do pico e negativos no soro recente. O resultado do FCM, foi positivo no soro de pico e no soro recente, para Linfócitos T-CD3+ e para Linfócito B – CD19+ com MFI superior a 1,5;
- Estudo de Sensibilização anti-HLA para Transplantação com dador vivo: Os resultados indicam a presença de anticorpos no soro do paciente que reagem com antígenos HLA do dador, o que pode aumentar o risco de rejeição do enxerto;

Com base nos resultados obtidos em todo o estudo, pode-se concluir que há evidências de incompatibilidades entre o dador vivo e o paciente em relação aos antígenos HLA avaliados. Isso indica um aumento do risco de rejeição do enxerto se o transplante renal for realizado com esse dador específico.

Essa sensibilização do paciente, manifestada pela presença de tantos anticorpos pode ter várias causas que pode estar relacionada com exposição prévia a antígenos HLA através de transplantes ou transfusões anteriores.

A interpretação dos resultados dessas técnicas, neste estudo, seria diferente se fossem negativos. Nesse caso, indicaria uma compatibilidade significativa entre o dador vivo e o paciente recetor, aumentando a viabilidade do transplante. Essa compatibilidade aumenta a probabilidade de sucesso do transplante renal e sugere que este dador vivo é uma opção viável para o recetor.

No entanto seria necessário considerar outros fatores clínicos como histórico médico e condição do paciente.

## 5 Reflexão crítica

---

Durante o período de seis meses em que o estágio Histocompatibilidade e Imunogenética Clínica decorreu, foi possível explorar de perto o papel crucial que esse laboratório desempenha no processo de transplante de órgãos, TCEH e na vida humana.

A importância deste estágio foi mais do que desenvolvimento de competências técnicas, foi o envolvimento numa missão importante, onde cada ação pode influenciar diretamente a vida de quem aguarda por um transplante, tendo um impacto significativo no meu desenvolvimento profissional e proporcionando uma compreensão mais profunda da prática clínica no laboratório.

Durante o estágio tive a oportunidade de participar ativamente na execução de atividades práticas, incluindo a realização de algumas técnicas laboratoriais específicas. Além disso, foi possível observar e aprender com profissionais experientes enquanto estes realizavam as suas tarefas rotineiras laboratoriais e discutiam casos clínicos e gestão do laboratório, dando-me a oportunidade de aprender a realizar interpretações de resultados de genotipagem HLA, estudo de quimerismo, identificar padrões de reatividade no Crossmatch e compreender a importância da compatibilidade HLA para o sucesso do transplante de órgãos. Além de contribuir para o meu desenvolvimento profissional, este estágio teve um impacto positivo no meu crescimento pessoal, uma vez que houve a possibilidade de trabalhar de forma mais eficaz em equipa, havendo contacto com outra realidade completamente diferente da minha atividade profissional atual, o que permitiu desenvolver mais competências e aprimorar formas de comunicação e capacidade de resolver problemas que possam surgir.

Um dos principais desafios que enfrentei durante este período, foi conseguir lidar com o cansaço, conciliar o horário laboral, o horário do estágio e vida pessoal, mas com um esforço acrescido e muita vontade de aprender e o ambiente acolhedor dos colegas, que me receberam muito bem e foram muito simpáticos e acessíveis, tornaram possível concluir este desafio de forma mais leve. Foi uma experiência enriquecedora que me proporcionou oportunidades únicas de aprendizagem e crescimento.

Encerro este estágio com a certeza de que esta experiência não aprimorou apenas as minhas habilidades técnicas, mas também ampliou a minha compreensão sobre a importância do cuidado e da dedicação nas atividades relacionadas à histocompatibilidade.

Expresso assim o meu profundo agradecimento a todos os profissionais e colegas envolvidos que partilharam o seu tempo, conhecimento e experiência comigo durante este estágio. O carinho com que fui acolhida e a dedicação demonstrada em passar conhecimentos e experiências foram de um valor incalculável.

## 6 Proposta de trabalho de investigação na área

---

Título: Impacto dos Anticorpos Não-HLA no Contexto de Transplantação Renal

Introdução: A transplantação renal é uma solução eficaz para pacientes com insuficiência renal crónica(103), melhorando significativamente a qualidade de vida e a sobrevida dos recetores. Tradicionalmente, o sistema HLA tem sido considerado o principal alvo da aloimunidade.(103) No entanto, têm surgido evidências que os anticorpos Não-HLA também desempenham um papel crucial na rejeição do enxerto e na sobrevida a longo prazo do transplante.(103–105)

Os anticorpos Não-HLA são anticorpos direcionados contra outros antígenos presentes no tecido do dador como o recetor de angiotensina II tipo 1, o recetor de endotelina tipo A, as proteínas de choque térmico, os fosfolípidos, a K- $\alpha$ -tubulina, a vimentina ou antígenos de células endoteliais.(104) Enquanto os anticorpos anti-HLA são bem conhecidos e frequentemente monitorizados em transplantes os anticorpos Não-HLA têm suscitado atenção crescente devido ao seu impacto potencial na rejeição do enxerto e na sobrevida a longo prazo do transplante.

Esta investigação pretende explorar o impacto dos anticorpos Não-HLA na transplantação renal, contribuindo para uma compreensão mais abrangente dos fatores imunológicos envolvidos.

Objetivos: Identificar e caracterizar os anticorpos Não-HLA presentes em recetores de transplantes renais; avaliar a associação entre a presença de anticorpos Não-HLA e os resultados clínicos pós-transplante incluindo rejeição do enxerto e sobrevida do transplante; investigar os mecanismos pelos quais os anticorpos Não-HLA influenciam a rejeição do enxerto renal; desenvolver estratégias para a deteção precoce e mitigação dos efeitos dos anticorpos Não-HLA em transplantes renais;

Tipo de Estudo: Analítico Retrospetivo

Metodologia: Avaliação do perfil de anticorpos em Recetores de transplantes renais com rejeição por anticorpos Não-HLA.

Avaliação das variáveis como sexo, idade, número de gestações, número de transfusões, número de transplantes prévios, grau de parentesco se for o dador vivo, parâmetros clínicos e imunológicos e amostra de sangue.

Procedimentos: Equipamentos para detecção de anticorpos usando técnica Luminex

Ética: Este estudo tem de ser submetido a comissão de ética para aprovação de recolha de dados clínicos das bases de dados e proteger a confidencialidade e dados pessoais de cada doente bem como dos respetivos dadores.

Análises de dados: Análises estatísticas para correlacionar a presença de anticorpos Não-HLA com episódios de rejeição e sobrevida do enxerto

Resultados Esperados: Espera-se identificar um perfil de anticorpos Não-HLA que correlacione fortemente com a rejeição do enxerto e a redução da sobrevida a longo prazo. A investigação deverá deixar claro os mecanismos imunológicos pelos quais esses anticorpos afetam os enxertos renais, além disso pretende-se desenvolver métodos mais eficazes para a deteção e gestão de anticorpos Não-HLA, melhorando assim os resultados dos transplantes renais. A longo prazo essa pesquisa poderá levar a protocolos clínicos atualizados e mais personalizados para a imunossupressão e monitorização dos recetores de transplante renal.

Os anticorpos Não-HLA representam um importante fator de risco no contexto do transplante renal. A sua identificação e monitorização são cruciais para melhorar os resultados dos pacientes transplantados. Compreender os mecanismos pelos quais esses anticorpos afetam o enxerto pode levar a novas estratégias terapêuticas e protocolos clínicos aumentando a longevidade e a funcionalidade dos transplantes renais.

Reconhecer a presença de anticorpos Não-HLA pode levar a ajustes na imunossupressão visando reduzir a resposta imunológica e melhorar os resultados do transplante.

## 7 Referências Bibliográficas

---

1. Zachary AA, Leffell MS. HLA Mismatching Strategies for Solid Organ Transplantation – A Balancing Act. *Front Immunol*. 7 de Dezembro de 2016;7.
2. Bradley BA. The role of HLA matching in transplantation. *Immunol Lett*. Julho de 1991;29(1–2):55–9.
3. Louis K, Lefaucheur C. DSA in solid organ transplantation: is it a matter of specificity, amount, or functional characteristics? *Curr Opin Organ Transplant*. Outubro de 2022;27(5):392–8.
4. Zachary AA, Kopchaliiska D, Jackson AM, Leffell MS. Immunogenetics and immunology in transplantation. *Immunol Res*. 26 de Julho de 2010;47(1–3):232–9.
5. Blouin AG, Ye F, Williams J, Askar M. A practical guide to chimerism analysis: Review of the literature and testing practices worldwide. *Hum Immunol*. Novembro de 2021;82(11):838–49.
6. IPST. IPST. Organização. Disponível em: <https://www.ipst.pt/index.php/pt/institucional/estrutura-e-organizacao>
7. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 10ª Edição. Gen; 2023.
8. Yang W, Gu Z, Zhang H, Hu H. To TRIM the Immunity: From Innate to Adaptive Immunity. *Front Immunol*. 8 de Outubro de 2020;11.
9. Becerra-Ruiz JS, Guerrero-Velázquez C, Martínez-Esquivias F, Martínez-Pérez LA, Guzmán-Flores JM. Innate and adaptive immunity of periodontal disease. From etiology to alveolar bone loss. *Oral Dis*. 28 de Setembro de 2022;28(6):1441–7.
10. Davies K, McLaren JE. Destabilisation of T cell-dependent humoral immunity in sepsis. *Clin Sci*. 10 de Janeiro de 2024;138(1):65–85.
11. Sherwood ER, Burelbach KR, McBride MA, Stothers CL, Owen AM, Hernandez A, et al. Innate Immune Memory and the Host Response to Infection. *J Immunol*. 15 de Fevereiro de 2022;208(4):785–92.
12. Côté I, Rogers N., Lechler R. Allorecognition. *Transfus Clin Biol*. Junho de 2001;8(3):318–23.
13. Game DS, Lechler RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol*. Agosto de 2002;10(2–3):101–8.
14. Hornick P. Direct and Indirect Allorecognition. Em: *Transplantation Immunology*. New Jersey: Humana Press; p. 145–56.
15. Boardman DA, Jacob J, Smyth LA, Lombardi G, Lechler RI. What Is Direct Allorecognition? *Curr Transplant Reports*. 7 de Dezembro de 2016;3(4):275–83.
16. Callemeyn J, Lamarthée B, Koenig A, Koshy P, Thauat O, Naesens M. Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. *Kidney Int*. Abril de 2022;101(4):692–710.
17. Ochando JC, Krieger NR, Bromberg JS. Direct versus Indirect Allorecognition: Visualization of Dendritic Cell Distribution and Interactions During Rejection and Tolerization. *Am J Transplant*. Outubro de 2006;6(10):2488–96.
18. Hwang B, Bryers J, Mulligan MS. Potential role of exosome-based allorecognition pathways involved in lung transplant rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Fevereiro de 2021;161(2):e129–34.

19. Kallon D. Histocompatibility & Immunogenetics - A collection of brief revision notes. 2022.
20. Alves C, Veiga S, Toralles MBP, Lopes ACV. O papel do complexo principal de histocompatibilidade na fisiologia da gravidez e na patogênese de complicações obstétricas. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. Dezembro de 2007;7(4):357–63.
21. Baranwal AK, Singh YP, Mehra NK. Should We Revisit HLA Matching to Improve Long-Term Graft Outcomes? *Curr Transplant Reports*. 13 de Setembro de 2018;5(3):235–43.
22. Sticht J, Álvaro-Benito M, Konigorski S. Type 1 Diabetes and the HLA Region: Genetic Association Besides Classical HLA Class II Genes. *Front Genet*. 17 de Junho de 2021;12.
23. Kochi Y. Genetics of autoimmune diseases: perspectives from genome-wide association studies. *Int Immunol*. 1 de Abril de 2016;28(4):155–61.
24. Parkkola A, Laine AP, Karhunen M, Härkönen T, Ryhänen SJ, Ilonen J, et al. HLA and non-HLA genes and familial predisposition to autoimmune diseases in families with a child affected by type 1 diabetes. Horwitz MS, editor. *PLoS One*. 28 de Novembro de 2017;12(11):e0188402.
25. Marino J, Paster J, Benichou G. Allorecognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection. *Front Immunol*. 14 de Dezembro de 2016;7.
26. Halloran PF, Einecke G, Sikosana MLN, Madill-Thomsen K. The Biology and Molecular Basis of Organ Transplant Rejection. Em 2021. p. 1–26.
27. Goldberg AC, Rizzo LV. MHC structure and function – antigen presentation. Part 1. Einstein (São Paulo). 24 de Março de 2015;13(1):153–6.
28. Raghavan M, Del Cid N, Rizvi SM, Peters LR. MHC class I assembly: out and about. *Trends Immunol*. Setembro de 2008;29(9):436–43.
29. Blees A, Janulienė D, Hofmann T, Koller N, Schmidt C, Trowitzsch S, et al. Structure of the human MHC-I peptide-loading complex. *Nature*. 1 de Novembro de 2017;551(7681):525–8.
30. Jones EY, Fugger L, Strominger JL, Siebold C. MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nat Rev Immunol*. Abril de 2006;6(4):271–82.
31. Duffy EB, Drake JR, Harton JA. Evolving Insights for MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. *Curr Pharmacol Reports*. 4 de Outubro de 2017;3(5):213–20.
32. Li Y, Yin Y, Mariuzza RA. Structural and Biophysical Insights into the Role of CD4 and CD8 in T Cell Activation. *Front Immunol*. 2013;4.
33. Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 1 de Fevereiro de 2008;3(1):189–220.
34. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*. 17 de Abril de 2010;75(4):291–455.
35. Torres MA, Moraes MEH. Nomenclature for factors of the HLA system. Einstein (São Paulo). Junho de 2011;9(2):249–51.
36. Hurley CK. Naming HLA diversity: A review of HLA nomenclature. *Hum Immunol*. Julho de 2021;82(7):457–65.
37. Barker DJ, Maccari G, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Robinson J, et al. The IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res*. 6 de Janeiro de 2023;51(D1):D1053–60.
38. Moeini S, Shahriari M, Shamali M. Ethical challenges of obtaining informed consent from surgical

- patients. *Nurs Ethics*. 11 de Março de 2020;27(2):527–36.
39. Jacoby L, Crosier V, Pohl H. Providing Support to Families considering the Option of Organ Donation: An Innovative Training Method. *Prog Transplant*. 1 de Setembro de 2006;16(3):247–52.
  40. European Committee (Partial Agreement) on Organ Transplantation (CD-P-TO). Guide to the quality and safety of organs for transplantation. 8ª Edição. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; 2022.
  41. IPST. IPST. Legislação - Transplantação. Disponível em: <https://www.ipst.pt/index.php/pt/legis-transplanacao>
  42. Greer DM, Shemie SD, Lewis A, Torrance S, Varelas P, Goldenberg FD, et al. Determination of Brain Death/Death by Neurologic Criteria. *JAMA*. 15 de Setembro de 2020;324(11):1078.
  43. Thuong M, Ruiz A, Evrard P, Kuiper M, Boffa C, Akhtar MZ, et al. New classification of donation after circulatory death donors definitions and terminology. *Transpl Int*. Julho de 2016;29(7):749–59.
  44. Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*. Maio de 2007;7(5):340–52.
  45. Baird K, Pavletic SZ. Chronic graft versus host disease. *Curr Opin Hematol*. Novembro de 2006;13(6):426–35.
  46. APCL. APCL. Transplante de Medula e Celulas Estaminais. Disponível em: <https://www.apcl.pt/pt/doencas-do-sangue/transplante-de-medula-e-celulas-estaminais>
  47. Norkin M, Wingard JR. Recent advances in hematopoietic stem cell transplantation. *F1000Research*. 12 de Junho de 2017;6:870.
  48. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*. 17 de Julho de 2014;124(3):344–53.
  49. Kekre N, Antin JH. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood*. 17 de Julho de 2014;124(3):334–43.
  50. Chen D, Zhou D, Guo D, Xu P, Chen B. Comparison of outcomes in hematological malignancies treated with haploidentical or HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation following myeloablative conditioning: A meta-analysis. Palaniyandi S, editor. *PLoS One*. 30 de Janeiro de 2018;13(1):e0191955.
  51. Zhang Y, Huo J, Liu L, Shen Y, Chen J, Zhang T, et al. Comparison of Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcomes Using Matched Sibling Donors, Haploidentical Donors, and Immunosuppressive Therapy for Patients With Acquired Aplastic Anemia. *Front Immunol*. 1 de Fevereiro de 2022;13.
  52. Fuchs EJ, McCurdy SR, Solomon SR, Wang T, Herr MR, Modi D, et al. HLA informs risk predictions after haploidentical stem cell transplantation with posttransplantation cyclophosphamide. *Blood*. 10 de Março de 2022;139(10):1452–68.
  53. Mehta RS, Marin D, Alousi A, Kanakry CG, Champlin RE, Rezvani K, et al. Haploidentical vs matched unrelated donors for patients with ALL: donor age matters more than donor type. *Blood Adv*. 25 de Abril de 2023;7(8):1594–603.
  54. Crocchiolo R, Rombolà G. Human Leucocyte Antigen System and Selection of Unrelated

- Hematopoietic Stem Cell Donors: Impact of Patient–Donor (Mis)matching and New Challenges with the Current Technologies. *J Clin Med*. 13 de Janeiro de 2023;12(2):646.
55. Sharma SK. Indications for Autologous Stem Cell Transplant. Em: *Basics of Hematopoietic Stem Cell Transplant*. Singapore: Springer Nature Singapore; 2023. p. 239–45.
  56. IPST. IPST. Registo Português de Dadores de Medula Óssea - “CEDACE”. Disponível em: <https://www.ipst.pt/index.php/pt/cidadao/CEDACE-inicio>
  57. Game DS, Warrens AN, Lechler RI. Rejection mechanisms in transplantation. *Wien Klin Wochenschr*. 30 de Outubro de 2001;113(20–21):832–8.
  58. Justiz Vaillant AA, Mohseni M. Chronic Transplantation Rejection. *StatPearls*. 2024.
  59. Valenzuela NM, Reed EF. Antibody-mediated rejection across solid organ transplants: manifestations, mechanisms, and therapies. *J Clin Invest*. 12 de Junho de 2017;127(7):2492–504.
  60. Horan J, Wang T, Haagenson M, Spellman SR, Dehn J, Eapen M, et al. Evaluation of HLA matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantation for nonmalignant disorders. *Blood*. 4 de Outubro de 2012;120(14):2918–24.
  61. Zhou Y, Chen YL, Huang XY, Chang YJ. Desensitization Strategies for Donor-Specific Antibodies in HLA-Mismatched Stem Cell Transplantation Recipients: What We Know and What We Do Not Know. *Oncol Ther*. 15 de Setembro de 2024;12(3):375–94.
  62. Nassereddine S, Rafei H, Elbahesh E, Tabbara I. Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. *Anticancer Res*. 1 de Abril de 2017;37(4):1547–55.
  63. Shlomchik WD, Lee SJ, Couriel D, Pavletic SZ. Transplantation’s Greatest Challenges: Advances in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. Janeiro de 2007;13:2–10.
  64. Amanam I, Otoukesh S, Al Malki MM, Salhotra A. Chronic GVHD: review advances in prevention, novel endpoints, and targeted strategies. *Hematology*. 8 de Dezembro de 2023;2023(1):164–70.
  65. Guenette A, Husain S. Infectious Complications Following Solid Organ Transplantation. *Crit Care Clin*. Janeiro de 2019;35(1):151–68.
  66. Singh N, Limaye AP. Infections in Solid-Organ Transplant Recipients. Em: *Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases*. Elsevier; 2015. p. 3440–52.
  67. Fishman JA. Infection in Organ Transplantation. *Am J Transplant*. Abril de 2017;17(4):856–79.
  68. IPST. IPST. 2018. Circular Normativa No001-A/CN-IPST,IP/2018. Disponível em: [https://www.ipst.pt/files/IPST/INFORMACAO\\_DOCUMENTACAO/Circular\\_Normativa\\_001A\\_CN\\_IPST\\_2018\\_Dadores\\_Orgaos.pdf](https://www.ipst.pt/files/IPST/INFORMACAO_DOCUMENTACAO/Circular_Normativa_001A_CN_IPST_2018_Dadores_Orgaos.pdf)
  69. IPST. IPST. Procedimento Operativo de Referência, Estudo do Dador Falecido e Alocação de Órgãos aos Receptores com prioridade para Transplante Renal via RPT.
  70. IPST. IPST. Transplantes. Disponível em: <https://www.ipst.pt/index.php/pt/transplantes>
  71. Qiagen. QIAamp DNA Kits for DNA Extraction [Internet]. Disponível em: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-kits?catno=51304>
  72. Qiagen. Qiagen. QIASymphony SP/AS instruments. Disponível em: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/instruments-equipment/qiasymphony-spas-instruments>

73. Talwar S, Khan F, Nityanand S, Agrawal S. Chimerism monitoring following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 5 de Maio de 2007;39(9):529–35.
74. Moscardó F, Sanz J, Senent L, Cantero S, de la Rubia J, Montesinos P, et al. Impact of hematopoietic chimerism at day +14 on engraftment after unrelated donor umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancies. *Haematologica.* Junho de 2009;94(6):827–32.
75. Scharf SJ, Smith AG, Hansen JA, McFarland C, Erlich HA. Quantitative determination of bone marrow transplant engraftment using fluorescent polymerase chain reaction primers for human identity markers. *Blood.* 1 de Abril de 1995;85(7):1954–63.
76. Navarro-Bailón A, Carbonell D, Escudero A, Chicano M, Muñoz P, Suárez-González J, et al. Short Tandem Repeats (STRs) as Biomarkers for the Quantitative Follow-Up of Chimerism after Stem Cell Transplantation: Methodological Considerations and Clinical Application. *Genes (Basel).* 25 de Agosto de 2020;11(9):993.
77. Sel FA, Oğuz FS. Can novel methods replace the gold standard chimerism method after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation? *Ann Hematol.* 6 de Abril de 2024;103(4):1035–47.
78. Goh RY, Kim SH, Han JY. Lineage-specific chimerism analysis in nucleated cells, T cells and natural killer cells after myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Korean J Hematol.* 2011;46(1):18.
79. Khan F, Agarwal A, Agrawal S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant.* 1 de Julho de 2004;34(1):1–12.
80. Clark JR, Scott SD, Jack AL, Lee H, Mason J, Carter GI, et al. Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: Technical recommendations for the use of Short Tandem Repeat based techniques, on behalf of the United Kingdom National External. *Br J Haematol.* 22 de Janeiro de 2015;168(1):26–37.
81. Thiede C. Diagnostic Chimerism Analysis After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Am J PharmacoGenomics.* 2004;4(3):177–87.
82. IPST. Procedimento Operativo para Genotipagem HLA-ABCDQDP com o Sistema One Lambda SureTyper.
83. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens.* 11 de Maio de 1992;39(5):225–35.
84. Thermofisher. Thermofisher. Ion GeneStudio S5 System. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/instruments/ion-genestudio-system.html>
85. Yin Y, Butler C, Zhang Q. Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Hum Immunol.* Novembro de 2021;82(11):812–9.
86. Amorim M, Mota S. Manual prático de imunohematologia. Escola Superior de Saúde - Politécnico do Porto; 2020.

87. Werfen. Werfen. Echo Lumena. Disponível em: <https://transfusionandtransplant.werfen.com/pt-pt/product/eco-lumena/>
88. Grifols. Grifols. Gel cards. Disponível em: <https://www.grifols.com/en/-/gel-cards>
89. IPST. IPST. Procedimento Operativo para Isolamento de Linfócitos T, B ou Totais de sangue periférico por Seleção Negativa Imunomagnética.
90. IPST. IPST. Procedimento Operativo para Detecção de Anticorpos Anti-HLA Classe I, II e MIC A. Kit Lab Screen Mixed LSM12.
91. IPST. IPST. Procedimento Operativo para Identificação de Anticorpos Anti - HLA Classe I ou II - Kit Single Antigen - SA.
92. IPST. Procedimento Operativo para Pesquisa e Identificação de Anticorpos Anti - HLA Classe I e II, Fixadores da Fracção C1q do Complemento. IPST.
93. Janeway CAJ, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The complement system and innate immunity. Em: Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5ª Edição. 2001.
94. IPST. IPST. Procedimento Operativo para Pesquisa de Aloanticorpos Anti-HLA usando um Painel de Células.
95. IPST. IPST. Procedimento Operativo para Crossmatch Anti - Linfocitário por Citotoxicidade mediada pelo Complemento (CDC).
96. IPST. IPST. Procedimento Operativo do FACSAria, para Separação Celular.
97. BD Biosciences. BD Biosciences. 2012. BD FACSAria™ III - User's Guide. Disponível em: [https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/BD\\_FACSAria\\_III\\_User\\_Guide.pdf](https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/BD_FACSAria_III_User_Guide.pdf)
98. IPST. IPST. Procedimento Operativo para Crossmatch Anti-Linfocitário por Citometria de Fluxo Rotina Protocolo HALIFASTER.
99. IPST. IPST. Procedimento Operativo para Serologia de Agentes de Doenças Transmissíveis.
100. Abbott. Abbott. Alinity. Disponível em: [www.corelaboratory.abbott/int/pt/offerings/brands/alinity.html](http://www.corelaboratory.abbott/int/pt/offerings/brands/alinity.html)
101. IPST. IPST. Introdução ao Sistema de Gestão da Qualidade. Disponível em: <https://www.ipst.pt/index.php/pt/areas-de-atuacao/sgq>
102. Rahman MT. Quality Assurance (QA) in Laboratory Testing. Anwer Khan Mod Med Coll J. 1 de Janeiro de 1970;2(2):3–5.
103. Sorohan BM, Baston C, Tacu D, Bucşa C, Ţincu C, Vizireanu P, et al. Non-HLA Antibodies in Kidney Transplantation: Immunity and Genetic Insights. Biomedicines. 25 de Junho de 2022;10(7):1506.
104. Zhang X, Reinsmoen NL. Impact of Non-Human Leukocyte Antigen-Specific Antibodies in Kidney and Heart Transplantation. Front Immunol. 13 de Abril de 2017;8.
105. Senev A, Ray B, Lerut E, Hariharan J, Heylen C, Kuypers D, et al. The Pre-Transplant Non-HLA Antibody Burden Associates With the Development of Histology of Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. Front Immunol. 16 de Fevereiro de 2022;13.

**8.1 Anexo 1 – Lei nº 12/93, de 22 de Abril, republicada segundo a Lei nº 22/2007, de 29 de Junho (versão atualizada pela Lei nº 12/2009, de 26 de Março)**

**Lei nº 22/2007, de 29 de Junho (versão atualizada pela Lei nº 12/2009, de 26 de Março)**

**SUMÁRIO**

Transpõe parcialmente para a ordem jurídica nacional a Directiva nº 2004/23/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 31 de Março, alterando a Lei nº 12/93, de 22 de Abril, relativa à colheita e transplante de órgãos e tecidos de origem humana

(...)

**Republicação da Lei nº 12/93, de 22 de Abril**

**Colheita e transplante de órgãos, tecidos e células de origem humana**

**CAPÍTULO I**

Disposições gerais

**Artigo 1.º**

**Âmbito material de aplicação**

1 - A presente lei aplica-se aos actos que tenham por objecto a dádiva ou colheita de órgãos, tecidos e células de origem humana, para fins terapêuticos ou de transplante, bem como às próprias intervenções de transplante.

2 - A transfusão de sangue, a dádiva de óvulos e de esperma e a transferência e manipulação de embriões são objecto de legislação especial.

3 - São igualmente objecto de legislação especial a dádiva e a colheita de órgãos para fins de investigação científica.

**Artigo 1.º-A**

**Definições**

Para efeitos da presente lei, entende-se por:

a) «Órgão» uma parte diferenciada e vital do corpo humano, constituída por vários tecidos, que mantém de modo largamente autónomo a sua estrutura, vascularização e capacidade de desenvolver funções fisiológicas;

b) «Tecido» todas as partes constitutivas do corpo humano formadas por células;

c) «Células» as células individuais ou um conjunto de células de origem humana, não ligadas entre si por qualquer tipo de tecido conjuntivo;

d) «Dador» qualquer fonte humana, viva ou morta, de órgãos, tecidos e células de origem humana;

e) «Dádiva» qualquer doação de órgãos, tecidos e células de origem humana, destinados a aplicações no corpo humano;

f) «Colheita» um processo em que são disponibilizados órgãos, tecidos e células de origem humana.

**Artigo 2.º**

**Âmbito pessoal de aplicação**

1 - A presente lei aplica-se a cidadãos nacionais e a apátridas e estrangeiros residentes em Portugal.

2 - Em relação aos estrangeiros sem residência permanente em Portugal, o regime jurídico dos actos previstos no n.º 1 do artigo 1.º rege-se pelo seu estatuto pessoal.

**Artigo 3.º**

**Estabelecimentos autorizados e pessoas qualificadas**

1 - Os actos referidos no artigo 1.º, n.º 1, só podem ser efectuados sob a responsabilidade e directa vigilância médica, de acordo com as respectivas *leges artis* e em estabelecimentos hospitalares públicos ou privados.

2 - Podem ainda ser feitas colheitas de tecidos para fins terapêuticos no decurso de autópsia nos institutos de medicina legal.

3 - Os centros de colheita e os centros de transplante são autorizados pelo Ministro da Saúde e estão sujeitos a avaliação periódica das suas actividades e resultados (Revogado pela Lei nº 12/2009, 26 de Março na parte respeitante aos tecidos e células)

4 - Os centros de colheita e os centros de transplante já em funcionamento não carecem da autorização prevista no número anterior, devendo, porém, submeter-se à referida avaliação periódica. (Revogado)

pela Lei n.º 12/2009, 26 de Março na parte respeitante aos tecidos e células)

#### **Artigo 4.º**

##### **Confidencialidade**

1 - Salvo o consentimento de quem de direito, é proibido revelar a identidade do dador ou do receptor de órgão ou tecido.

2 - Os centros de colheita e de transplante garantem a rastreabilidade dos órgãos e tecidos, em termos a regulamentar.

#### **Artigo 5.º**

##### **Gratuidade**

1 - A dádiva de órgãos, tecidos e células, para fins terapêuticos ou de transplante, não pode, em nenhuma circunstância, ser remunerada, sendo proibida a sua comercialização.

2 - (Revogado.)

3 - Os agentes dos actos referidos no n.º 1 do artigo 1.º e os estabelecimentos autorizados a realizar transplantes de órgãos, tecidos e células podem receber uma remuneração única e exclusivamente pelo serviço prestado, não podendo o cálculo desta remuneração atribuir qualquer valor aos órgãos, tecidos ou células colhidos ou transplantados.

## **CAPÍTULO II**

### **Da colheita em vida**

#### **Artigo 6.º**

##### **Admissibilidade**

1 - Sem prejuízo do disposto nos números seguintes, são admissíveis a dádiva e colheita em vida de órgãos, tecidos ou células para fins terapêuticos ou de transplante.

2 - A colheita de órgãos e tecidos de uma pessoa viva só pode ser feita no interesse terapêutico do receptor e desde que não esteja disponível qualquer órgão ou tecido adequado colhido de dador post mortem e não exista outro método terapêutico alternativo de eficácia comparável.

3 - No caso de dádiva e colheita de órgãos ou tecidos não regeneráveis, a respectiva admissibilidade fica dependente de parecer favorável, emitido pela Entidade de Verificação da Admissibilidade da Colheita para Transplante (EVA).

4 - São sempre proibidas a dádiva e a colheita de órgãos ou de tecidos não regeneráveis quando envolvam menores ou outros incapazes.

5 - A dádiva e a colheita de órgãos, de tecidos ou de células regeneráveis que envolvam menores ou outros incapazes só podem ser efectuadas quando se verifiquem os seguintes requisitos cumulativos:

- a) Inexistência de dador capaz compatível;
- b) O receptor ser irmão ou irmã do dador;

c) A dádiva ser necessária à preservação da vida do receptor.

6 - A dádiva e a colheita de órgãos ou tecidos não regeneráveis, que envolvam estrangeiros sem residência permanente em Portugal, só podem ser feitas mediante autorização judicial.

7 - São sempre proibidas a dádiva e a colheita de órgãos, de tecidos ou de células quando, com elevado grau de probabilidade, envolvam a diminuição grave e permanente da integridade física ou da saúde do dador.

#### **Artigo 6.º-A**

##### **Entidade de Verificação da Admissibilidade da Colheita para Transplante**

1 - A Entidade de Verificação da Admissibilidade da Colheita para Transplante (EVA) é o organismo a quem cabe a emissão de parecer vinculativo em caso de dádiva e colheita em vida de órgãos, tecidos ou células para fins terapêuticos ou de transplante.

2 - A EVA é criada, em cada estabelecimento hospitalar onde se realize a colheita, por despacho do Ministro da Saúde, sob proposta conjunta do respectivo conselho de administração e da Organização Portuguesa de Transplantação.

3 - A EVA funciona na dependência e como secção da Comissão de Ética para a Saúde do estabelecimento hospitalar onde se realize a colheita.

#### **Artigo 7.º**

##### **Informação**

O médico deve informar, de modo leal, adequado e inteligível, o dador e o receptor dos riscos possíveis, das consequências da dádiva e do tratamento e dos seus efeitos secundários, bem como dos cuidados a observar ulteriormente.

#### **Artigo 8.º**

##### **Consentimento**

1 - O consentimento do dador e do receptor deve ser livre, esclarecido, informado e inequívoco e o dador pode identificar o beneficiário.

2 - O consentimento do dador e do receptor é prestado perante:

a) Um médico designado pelo director clínico do estabelecimento onde a colheita se realize, quando se trate de transplante de órgãos, tecidos ou células regeneráveis;

b) Um médico designado pelo director clínico do estabelecimento onde a colheita se realize e que não pertença à equipa de transplante, quando se trate de transplante de órgãos, tecidos ou células não regeneráveis.

3 - Tratando-se de dadores menores, o consentimento deve ser prestado pelos pais, desde que não inibidos do exercício do poder paternal, ou, em caso de inibição ou falta de ambos, pelo tribunal.

4 - A dádiva e colheita de órgãos, tecidos ou células de menores com capacidade de entendimento e de manifestação de vontade carecem também da concordância destes.

5 - A colheita em maiores incapazes por razões de anomalia psíquica só pode ser feita mediante autorização judicial.

6 - O consentimento do dador ou de quem legalmente o represente é sempre prestado por escrito, sendo livremente revogável.

#### **Artigo 9.º**

##### **Direito a assistência e indemnização**

1 - O dador tem direito a assistência médica até ao completo restabelecimento.

2 - Sem prejuízo do disposto no n.º 1 do artigo 5.º, o dador tem direito a ser indemnizado pelos danos sofridos no decurso do processo de dádiva e colheita, independentemente de culpa, nomeadamente pelas despesas decorrentes da doação.

3 - Cabe aos estabelecimentos referidos no n.º 1 do artigo 3.º assegurar os direitos referidos nos n.os 1 e 2 do presente artigo.

4 - Os estabelecimentos mencionados no n.º 1 do artigo 3.º devem celebrar um contrato de seguro a favor do dador e suportar os respectivos encargos.

### **CAPÍTULO III**

#### **Da colheita em cadáveres**

##### **Artigo 10.º**

##### **Potenciais dadores**

1 - São considerados como potenciais dadores *post mortem* todos os cidadãos nacionais e os apátridas e estrangeiros residentes em Portugal que não tenham manifestado junto do Ministério da Saúde a sua qualidade de não dadores.

2 - Quando a indisponibilidade para a dádiva for limitada a certos órgãos ou tecidos ou a certos fins, devem as restrições ser expressamente indicadas nos respectivos registos e cartão.

3 - A indisponibilidade para a dádiva dos menores e dos incapazes é manifestada, para efeitos de registo, pelos respectivos representantes legais e pode também ser expressa pelos menores com capacidade de entendimento e manifestação de vontade.

##### **Artigo 11.º**

##### **Registo Nacional**

1 - É criado o Registo Nacional de não Dadores (RENNDA), informatizado, para registo de todos aqueles que hajam manifestado, junto do Ministério da Saúde, a sua qualidade de não dadores.

2 - O Governo fica autorizado, precedendo parecer da Comissão Nacional de Protecção de Dados, a regular a organização e o funcionamento do RENNDA e a emissão

de um cartão individual, no qual se fará menção da qualidade de não dador.

3 - O RENNDA deve ser regulamentado e iniciar a sua actividade até 1 de Outubro de 1993.

#### **Artigo 12.º**

##### **Certificação da morte**

1 - Cabe à Ordem dos Médicos, ouvido o Conselho Nacional da Ética para as Ciências da Vida, enunciar e manter actualizado, de acordo com os progressos científicos que venham a registar-se, o conjunto de critérios e regras de semiologia médico-legal idóneos para a verificação da morte cerebral.

2 - O bastonário deve comunicar ao Ministério da Saúde o texto aprovado pela Ordem dos Médicos fixando os critérios e regras referidos no número anterior, para publicação na 1.ª série do Diário da República.

3 - A primeira publicação deve ser feita até 1 de Outubro de 1993.

#### **Artigo 13.º**

##### **Formalidades de certificação**

1 - Os médicos que procederem à colheita devem lavrar, em duplicado, auto de que constem a identidade do falecido, o dia e a hora da verificação do óbito, a menção da consulta ao RENNDA e do cartão individual, havendo-o, e da falta de oposição à colheita, os órgãos ou tecidos recolhidos e o respectivo destino.

2 - Na verificação da morte não deve intervir médico que integre a equipa de transplante.

3 - A colheita deve ser realizada por uma equipa médica autorizada pelo director clínico do estabelecimento onde se realizar.

4 - O auto a que se refere o n.º 1 deverá ser assinado pelos médicos intervenientes e pelo director clínico do estabelecimento.

5 - Um dos exemplares do auto fica arquivado no estabelecimento em que se efectiva a colheita e o outro é remetido, para efeitos de estatística, ao serviço competente do Ministério da Saúde.

6 - Quando não tiver sido possível identificar o cadáver, presume-se a não oposição à dádiva se outra coisa não resultar dos elementos circunstanciais.

#### **Artigo 14.º**

##### **Cuidados a observar na execução da colheita**

1 - Na execução da colheita devem evitar-se mutilações ou dissecações não estritamente indispensáveis à recolha e utilização de tecidos ou órgãos e as que possam prejudicar a realização de autópsia, quando a ela houver lugar.

2 - O facto de a morte se ter verificado em condições que imponham a realização de autópsia médico-legal não obsta à efectivação da colheita, devendo, contudo, o médico relatar por escrito toda e qualquer

observação que possa ser útil a fim de completar o relatório daquela.

#### **CAPÍTULO IV**

##### **Disposições complementares**

##### **Artigo 15.º**

##### **Campanha de informação**

1 - O Governo deve promover campanhas de informação sobre o significado, em termos de solidariedade, política de saúde e meios terapêuticos, da colheita de órgãos, tecidos e células e da realização de transplantes.

2 - A campanha de informação deve elucidar igualmente sobre a possibilidade de se manifestar a indisponibilidade para a dádiva post mortem, sobre a existência do Registo Nacional dessas decisões e sobre a emissão e uso do cartão individual em que essa menção é feita.

##### **Artigo 16.º**

##### **Responsabilidade**

Os infractores das disposições desta lei incorrem em responsabilidade civil, penal e disciplinar, nos termos gerais de direito.

##### **Artigo 17.º**

##### **Norma revogatória**

É revogado o Decreto-Lei n.º 553/76, de 13 de Julho.

##### **Artigo 18.º**

##### **Entrada em vigor**

1 - Os artigos 11.º e 12.º da presente lei entram em vigor nos termos gerais.

2 - As restantes disposições desta lei entram em vigor no dia seguinte ao da publicação na 1.ª série do Diário da República dos critérios e regras a que se refere o artigo 12.º e da comunicação do Ministro da Saúde declarando a entrada em funcionamento do RENNDA.

## 8.2. Anexo 2 – Lei nº 36/2013, de 12 de Junho

### Lei n.º 36/2013, de 12 de Junho

#### SUMÁRIO

Aprova o regime de garantia de qualidade e segurança dos órgãos de origem humana destinados a transplantação no corpo humano, de forma a assegurar um elevado nível de proteção da saúde humana, transpondo a Diretiva n.º 2010/53/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 7 de julho, relativa a normas de qualidade e segurança dos órgãos humanos destinados a transplantação

#### Lei n.º 36/2013, de 12 de junho

Aprova o regime de garantia de qualidade e segurança dos órgãos de origem humana destinados a transplantação no corpo humano, de forma a assegurar um elevado nível de proteção da saúde humana, transpondo a Diretiva n.º 2010/53/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 7 de julho, relativa a normas de qualidade e segurança dos órgãos humanos destinados a transplantação.

A Assembleia da República decreta, nos termos da alínea c) do artigo 161.º da Constituição, o seguinte:

#### CAPÍTULO I

##### Disposições gerais

#### Artigo 1.º

##### Objeto

A presente lei estabelece normas que visam garantir a qualidade e segurança dos órgãos de origem humana destinados a transplantação no corpo humano, de forma a assegurar um elevado nível de proteção da saúde humana, transpondo para a ordem jurídica interna a Diretiva n.º 2010/53/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 7 de julho.

#### Artigo 2.º

##### Âmbito de aplicação

1 - O disposto na presente lei é aplicável à dádiva, colheita, caracterização, análise, preservação, transporte e implantação de órgãos de origem humana destinados a transplantação no corpo humano.

2 - O disposto na presente lei não se aplica à utilização de órgãos para fins de investigação, exceto se os mesmos se destinarem à transplantação no corpo humano.

#### Artigo 3.º

##### Definições

Para efeitos do disposto na presente lei, entende-se por:

a) «Caracterização do dador» a recolha de informações pertinentes sobre as características do dador, necessárias para avaliar a sua adequação à dádiva de

órgãos, efetuar uma avaliação de risco adequada e minimizar os riscos para o recetor, bem como para otimizar a atribuição de órgãos;

b) «Caracterização do órgão» a recolha de informações pertinentes sobre as características do órgão necessárias para avaliar a conformidade e adequação e minimizar os riscos para o recetor e otimizar a atribuição de órgãos;

c) «Centros de sangue e da transplantação» os serviços territorialmente desconcentrados do Instituto Português do Sangue e Transplantação, I. P. (IPST), aos quais compete, na área da transplantação, designadamente:

i) Garantir o estudo laboratorial de dadores e de doentes candidatos a transplantação de órgãos;

ii) Assegurar a manutenção das condições necessárias para a escolha do par dador/recetor em transplantação renal;

iii) Acompanhar a transplantação de órgãos;

d) «Colheita» o processo por meio do qual os órgãos doados são disponibilizados;

e) «Coordenador hospitalar de doação» o médico com formação específica para a deteção e avaliação de potenciais dadores de órgãos e tecidos para transplantação, que integra a Rede Nacional de Coordenação da Colheita e Transplantação;

f) «Dádiva» a doação de órgãos para transplantação;

g) «Dador» a pessoa que faz dádiva de um ou vários órgãos, quer a dádiva ocorra em vida, quer depois da morte;

h) «Eliminação» o destino final dado a um órgão quando este não é utilizado para transplantação;

i) «Gabinetes coordenadores de colheita e transplantação» as estruturas autónomas dotadas de recursos humanos especializados na área da coordenação de colheita e transplantação, e de equipas pluridisciplinares para a realização da colheita de órgãos, tecidos e células nos dadores identificados, que integram a Rede Nacional de Coordenação da Colheita e Transplantação;

j) «Incidente adverso grave» uma ocorrência indesejável e inesperada associada a qualquer etapa do processo, desde a dádiva até à transplantação, suscetível de levar à transmissão de uma doença infecciosa, à morte ou a situações de perigo de vida, deficiência ou incapacidade do dador ou do doente ou

de provocar ou prolongar a sua hospitalização ou morbidade;

k) «Organização europeia de intercâmbio de órgãos» uma organização sem fins lucrativos, pública ou privada, dedicada ao intercâmbio nacional ou transfronteiriço de órgãos, cujos países integrantes são maioritariamente Estados membros;

l) «Órgão» uma parte diferenciada do corpo humano, constituída por vários tecidos, que mantém, de modo significativamente autónomo, a sua estrutura, vascularização e capacidade de desenvolver funções fisiológicas, incluindo as partes de órgãos que tenham como função ser utilizadas para servir o mesmo objetivo que o órgão inteiro no corpo humano, mantendo as condições de estrutura e vascularização;

m) «Preservação» a utilização de agentes químicos, a alteração das condições ambientais ou outros meios destinados a evitar ou retardar a deterioração biológica ou física dos órgãos humanos, desde a colheita até à transplantação;

n) «Procedimentos operacionais» as instruções escritas que descrevem as etapas de um processo específico, incluindo os materiais e métodos a utilizar e o resultado final esperado;

o) «Rastreabilidade» a capacidade de localizar e identificar o órgão em cada etapa do processo, desde a dádiva até à transplantação ou eliminação, incluindo a capacidade de:

- i) Identificar o dador e o organismo de colheita;
- ii) Identificar o recetor e o centro de transplantação; e
- iii) Localizar e identificar todas as informações não pessoais relevantes, relacionadas com os produtos e materiais que entram em contacto com o órgão;

p) «Reação adversa grave» uma resposta indesejável e inesperada, incluindo uma doença infecciosa, do dador vivo ou do recetor, que possa estar associada a qualquer etapa do processo, desde a dádiva até à transplantação, que cause a morte ou ponha a vida em perigo, conduza a uma deficiência, incapacidade, internamento, prolongamento da hospitalização ou morbidade;

q) «Recetor» a pessoa que recebe a transplantação de um órgão;

r) «Transplantação» o processo destinado ao restabelecimento de certas funções do organismo humano, mediante a transferência de um órgão de um dador para um recetor;

s) «Unidade de colheita» as unidades em que é autorizada a atividade de colheita de órgãos de origem humana para fins de transplantação;

t) «Unidade de transplantação» um estabelecimento de cuidados de saúde, uma equipa ou uma unidade de um hospital ou outro organismo que proceda à transplantação de órgãos e que esteja autorizado a fazê-lo.

## CAPÍTULO II

### Princípios que regem a dádiva de órgãos

#### Artigo 4.º

##### Princípios aplicáveis

1 - A dádiva de órgãos é voluntária e não remunerada, sem prejuízo do disposto nos números seguintes e no n.º 3 do artigo 5.º da Lei n.º 12/93, de 22 de abril, alterada e republicada pela Lei n.º 22/2007, de 29 de junho.

2 - Os dadores vivos têm direito a receber uma compensação estritamente limitada a cobrir as despesas efetuadas e a perda de rendimentos relacionados com a dádiva, não podendo aquela constituir um incentivo ou benefício financeiro para a dádiva de órgãos.

3 - As condições em que pode ser concedida a compensação prevista no número anterior são definidas por despacho do membro do Governo responsável pela área da saúde.

4 - O dador vivo tem sempre direito a ser indemnizado pelos danos decorrentes do processo de dádiva e colheita, independentemente de culpa, nos termos do artigo 9.º da Lei n.º 12/93, de 22 de abril, alterada e republicada pela Lei n.º 22/2007, de 29 de junho.

5 - A atividade desenvolvida pelas unidades de colheita não pode ter caráter lucrativo.

6 - É proibida a publicidade sobre a necessidade de órgãos ou sobre a sua disponibilidade, quando tenha por intuito oferecer ou procurar obter lucros financeiros ou vantagens equivalentes.

## CAPÍTULO III

### Autoridade competente

#### Artigo 5.º

##### Designação e funções da autoridade competente

1 - A Direção-Geral da Saúde (DGS) é a autoridade competente, responsável pela verificação do cumprimento dos requisitos previstos na presente lei em todo o território nacional, sem prejuízo da articulação com a Inspeção-Geral das Atividades em Saúde (IGAS), em matérias de fiscalização e inspeção.

2 - Compete à DGS, nomeadamente:

a) Estabelecer e manter atualizado um sistema para a qualidade e segurança que abranja todas as etapas do processo, desde a dádiva até à transplantação ou eliminação do órgão;

b) Autorizar as unidades de colheita e as unidades de transplantação, de acordo com a presente lei, mediante parecer favorável do IPST, enquanto entidade responsável pelo planeamento estratégico de resposta às necessidades nacionais;

c) Assegurar que as unidades de colheita e as unidades de transplantação, os gabinetes coordenadores de colheita e transplantação (GCCT) e os centros de sangue e da transplantação (CST), sejam submetidos a medidas de controlo ou auditorias regulares a fim de verificar o cumprimento dos requisitos, diretrizes ou

orientações emitidas pela DGS e pelo IPST, nos termos da presente lei;

d) Suspender ou revogar as autorizações concedidas às unidades de colheita e às unidades de transplantação, caso as medidas de controlo demonstrem que não cumprem os requisitos previstos na presente lei;

e) Estabelecer um sistema de notificação e gestão de incidentes e reações adversas graves, nos termos do artigo 14.º, compatível com o sistema de informação do IPST, referido no artigo 6.º;

f) Emitir diretrizes destinadas às unidades de colheita e às unidades de transplantação, aos profissionais de saúde e a outras pessoas envolvidas em todas as etapas do processo de transplantação, desde a dádiva até à transplantação ou eliminação de órgãos, incluindo orientações para a recolha de informações pré e pós-transplante relevantes para avaliar a qualidade e a segurança dos órgãos transplantados;

g) Participar na rede de autoridades competentes da União Europeia, cuja criação se encontra prevista no n.º 1 do artigo 19.º da Diretiva n.º 2010/53/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 7 de julho;

h) Fiscalizar o intercâmbio de órgãos com outros Estados membros e com países terceiros, nos termos da presente lei.

#### **Artigo 6.º**

##### **Registos e relatórios das unidades de colheita e das unidades de transplantação**

1 - O IPST é a entidade responsável por assegurar o funcionamento de um sistema de informação único e integrado no domínio da colheita e transplantação, designado por Registo Português de Transplantação (RPT).

2 - O RPT inclui os dados referidos nos artigos 13.º, 14.º, 17.º e 18.º

3 - O RPT integra ainda dados relativos às atividades das unidades de colheita e das unidades de transplantação, designadamente dados agregados sobre o número de dadores, bem como o tipo e a quantidade de órgãos colhidos e transplantados ou eliminados, nos termos das disposições aplicáveis em matéria de proteção de dados pessoais e segredo estatístico.

4 - O RPT permite ao IPST a gestão da lista de espera de doentes candidatos a transplantação, a seleção do par dador/recetor em transplantação e a rastreabilidade, nos termos do disposto na alínea o) do n.º 2 do artigo 3.º do Decreto-Lei n.º 39/2012, de 16 de fevereiro.

5 - O IPST garante à DGS o acesso à informação contida no RPT.

6 - Os níveis de acesso ao RPT são definidos em articulação entre o IPST e a DGS e submetidos a autorização nos termos da Lei n.º 67/98, de 26 de outubro.

7 - A DGS e o IPST elaboram anualmente relatórios sobre a atividade de transplantação, que serão apresentados à Assembleia da República e ao Governo.

8 - Sempre que solicitados pela Comissão Europeia ou por outro Estado membro, o IPST e a DGS fornecem informações sobre o registo das unidades de colheita e das unidades de transplantação.

#### **Artigo 7.º**

##### **Autorização**

1 - As atividades de colheita e transplantação de órgãos só podem ser autorizadas nas unidades que reúnam os requisitos definidos por portaria do membro do Governo responsável pela área da saúde, a qual deve prever a tramitação e enunciar todos os elementos que devem instruir os pedidos de autorização para as referidas atividades.

2 - Todos os estabelecimentos que disponham de cuidados de suporte ventilatório estão obrigados a, no prazo de 60 dias contados da entrada em vigor da presente lei ou da criação da unidade, comunicar ao IPST, para efeitos de parecer prévio, a sua imediata disponibilidade para a realização de colheita de órgãos.

3 - O parecer do IPST, quando favorável, é remetido à DGS, a fim da atividade de colheita de órgãos ser autorizada.

4 - A DGS procede à emissão da autorização, indicando as atividades autorizadas.

5 - As unidades de colheita e as unidades de transplantação não podem proceder a qualquer alteração das suas atividades sem a aprovação prévia da DGS.

6 - O número mínimo de transplantes a realizar nas unidades de transplantação é definido pela DGS, tendo em conta os padrões europeus e internacionais de qualidade e segurança que a evidência recomenda.

7 - Uma autorização concedida para o exercício das atividades de colheita de órgãos para fins de transplantação pode ser revogada sempre que razões de saúde pública, de deontologia médica ou éticas o aconselhem, ou se durante três anos consecutivos não forem atingidas as metas definidas em quantidade para o respetivo tipo de transplante, nos termos previstos no n.º 6.

8 - As unidades de colheita e as unidades de transplantação apresentam à DGS, até ao último dia do mês seguinte ao ano a que respeitam, um relatório anual das suas atividades, o qual faz parte integrante da avaliação necessária à manutenção da autorização de exercício de atividade.

#### **Artigo 8.º**

##### **Medidas de controlo**

1 - A DGS garante, em articulação com a IGAS, a realização de auditorias, inspeções ou outras medidas de controlo adequadas às unidades de colheita e às unidades de transplantação, aos GCCT e CST:

a) De natureza periódica, a fim de assegurar o cumprimento do disposto na presente lei;

b) Em caso de reações adversas ou incidentes graves ou de suspeita dos mesmos;

c) A pedido das autoridades competentes de outro Estado membro, desde que justificado.

2 - A DGS notifica por escrito os responsáveis dos serviços referidos no número anterior do resultado das auditorias e inspeções efetuadas.

3 - A DGS, em articulação com a IGAS, estabelece as diretrizes referentes às condições de auditoria, inspeção ou outras medidas de controlo, bem como à formação e qualificação dos profissionais envolvidos, a fim de garantir uma elevada competência e desempenho.

4 - Sempre que solicitado por outro Estado membro ou pela Comissão Europeia, a DGS presta informações sobre os resultados das inspeções e medidas de controlo relacionadas com os requisitos previstos na presente lei.

#### CAPÍTULO IV

##### Qualidade e segurança dos órgãos

###### Artigo 9.º

###### Regime para a qualidade e a segurança

1 - As unidades de colheita e as unidades de transplantação, os GCCT e os CST devem, no âmbito da sua área de atuação, implementar e manter atualizado um sistema para a qualidade e segurança, de acordo com o sistema estabelecido a nível nacional pela DGS, referido na alínea a) do n.º 2 do artigo 5.º, incluindo a aplicação de procedimentos operacionais para:

- a) Verificar a identidade do dador;
- b) Confirmar as informações relativas ao consentimento, autorização ou inexistência de objeções do dador ou da sua família, de acordo com o estabelecido na lei, no local onde a dádiva e a colheita se realizaram;
- c) Verificar se a caracterização dos órgãos e dos dadores foi realizada, tal como previsto no artigo 11.º;
- d) A colheita, preservação, embalagem e rotulagem de órgãos, de acordo com os artigos 10.º e 12.º;
- e) O transporte de órgãos humanos, tal como previsto no artigo 12.º;
- f) A notificação exata, rápida e verificável de reações e incidentes adversos graves, tal como prevista no artigo 14.º e no n.º 5 do artigo 17.º;
- g) A gestão de reações e incidentes adversos graves, tal como prevista no n.º 2 do artigo 14.º;
- h) Garantir a rastreabilidade, desde o dador até ao recetor e vice-versa, nos termos do artigo 13.º;
- i) Assegurar a segurança e confidencialidade dos dados pessoais relativos aos dadores e recetores, nos termos do artigo 18.º

2 - Os procedimentos operacionais referidos nas alíneas f), g), h) e i) do número anterior especificam, nomeadamente, as responsabilidades das unidades de colheita, das unidades de transplantação e das organizações europeias de intercâmbio de órgãos.

3 - As unidades de colheita e as unidades de transplantação, os GCCT e os CST adotam as medidas necessárias para assegurar que a documentação relativa aos procedimentos operacionais referidos nos números anteriores se encontra disponível aquando das auditorias, inspeções ou outras medidas de controlo realizadas no âmbito da presente lei.

###### Artigo 10.º

###### Colheita de órgãos

1 - As unidades de colheita asseguram que, no caso de dador cadáver, a seleção e a avaliação de dadores sejam efetuadas sob o aconselhamento e orientação do coordenador hospitalar de doação.

2 - A colheita de órgãos é realizada em salas operatórias concebidas, construídas, mantidas e geridas de acordo com a legislação aplicável e com as normas de boa prática clínica, de modo a garantir a qualidade e a segurança dos órgãos colhidos.

3 - Os materiais e equipamentos utilizados na colheita são tratados de acordo com a legislação aplicável em matéria de esterilização de dispositivos médicos.

###### Artigo 11.º

###### Caracterização dos órgãos e dos dadores

1 - Os órgãos e os respetivos dadores são caracterizados antes da transplantação, mediante a recolha do conjunto de dados previstos na parte A do anexo i à presente lei, da qual faz parte integrante.

2 - Para além do conjunto mínimo de dados referidos no número anterior, a equipa médica, sempre que necessário e tendo em conta a disponibilidade das informações e as circunstâncias particulares de cada caso, procede à recolha das informações previstas na parte B do anexo i à presente lei.

3 - Nas situações de emergência, devidamente fundamentadas do ponto de vista clínico, em que os benefícios esperados para o recetor superem os riscos decorrentes de dados incompletos, podem ser considerados para transplante os órgãos em relação aos quais não se encontrem disponíveis todos os dados mínimos referidos na parte A do anexo i à presente lei.

4 - Para cumprir os requisitos de qualidade e segurança previstos na presente lei, a equipa médica:

- a) Obtém, dos dadores vivos, todos os dados necessários, fornecendo-lhes, para o efeito, as informações de que necessitem para compreender as consequências da dádiva;
- b) Procura obter informações junto dos familiares do dador ou de outras pessoas, no caso dos dadores post mortem, sempre que possível e apropriado;
- c) Sensibiliza todas as pessoas a quem são pedidas informações para a importância da rápida transmissão das mesmas.

5 - Os testes laboratoriais necessários à transplantação de órgãos são realizados por laboratórios do IPST ou ao seu serviço, que disponham de instalações e equipamentos e procedimentos operacionais adequados para assegurar que as informações relativas

à caracterização de órgãos e dadores sejam transmitidas às unidades de transplantação em tempo útil.

6 - As unidades de transplantação verificam, antes de procederem à mesma, se a caracterização do órgão e do dador foi realizada e registada, nos termos da presente lei.

#### **Artigo 12.º**

##### **Transporte de órgãos**

1 - Os organismos, entidades ou empresas envolvidos no transporte de órgãos estabelecem procedimentos operacionais para garantir a integridade dos órgãos durante o transporte e um tempo de transporte adequado, de acordo com o sistema referido no artigo 9.º, estando sujeitos a licenciamento e inspeção, em termos a definir por portaria do membro do Governo responsável pela área da saúde.

2 - Os recipientes utilizados para o transporte de órgãos são rotulados com as seguintes informações:

a) Identificação da unidade de colheita e da unidade de saúde onde foi realizada, incluindo data e hora, os respetivos endereços e números de telefone;

b) Identificação da unidade de transplantação de destino, incluindo unidade de saúde onde se encontra instalada, endereço e número de telefone;

c) Indicação de que a embalagem contém um órgão, especificando o tipo de órgão e, se for caso disso, a sua localização à esquerda ou à direita, e incluir a frase «Manusear com cuidado»;

d) As condições adequadas de transporte, de forma a manter a integridade do órgão.

3 - Os órgãos transportados são acompanhados do relatório de caracterização do órgão e do dador.

4 - O disposto na alínea b) do n.º 2 não é exigível em caso de transporte de órgãos dentro do mesmo estabelecimento.

5 - As unidades de transplantação verificam, antes de procederem à transplantação, se as condições de preservação e transporte dos órgãos recebidos foram cumpridas.

#### **Artigo 13.º**

##### **Rastreabilidade**

1 - Os órgãos colhidos e transplantados no território nacional devem poder ser rastreados, desde o dador até ao recetor e vice-versa, a fim de proteger a saúde dos dadores e dos recetores.

2 - Para efeitos do disposto no número anterior, as unidades de colheita e as unidades de transplantação, os GCCT e os CST dispõem, no âmbito da respetiva área de atuação, de um sistema de identificação dos dadores e recetores, integrado no RPT, que permita identificar cada dádiva e cada um dos órgãos a ela associados, de acordo com o previsto no artigo 18.º

3 - O sistema de informação referido no número anterior inclui os dados necessários para assegurar a rastreabilidade em todas as fases do processo e as

informações sobre a caracterização de órgãos e dadores constantes dos anexos i e ii à presente lei.

4 - Os dados necessários para assegurar a rastreabilidade são conservados durante pelo menos 30 anos após a dádiva, independentemente do tipo de suporte e desde que salvaguardada a respetiva confidencialidade e destruídos logo que não sejam necessários para o efeito.

5 - Em caso de intercâmbio de órgãos entre Estados membros, a transmissão dos dados necessários para assegurar a rastreabilidade e as informações sobre a caracterização dos mesmos e dos dadores, referidos no n.º 3, é feita de acordo com os procedimentos definidos nos termos do artigo 29.º da Diretiva n.º 2010/53/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 7 de julho.

#### **Artigo 14.º**

##### **Sistemas de notificação e gestão de reações e incidentes adversos graves**

1 - As unidades de colheita e as unidades de transplantação, os GCCT e os CST utilizam um sistema de notificação, de acordo com o estabelecido pela DGS, destinado à comunicação, investigação, registo e transmissão das informações relevantes e necessárias sobre:

a) Incidentes adversos graves suscetíveis de influenciar a qualidade e segurança dos órgãos e que possam ser atribuídos à dádiva, colheita, caracterização análise, preservação e transporte dos órgãos;

b) Qualquer reação adversa grave, observada durante ou após a transplantação, que possa estar relacionada com a colheita, análise, caracterização, preservação e transporte dos órgãos.

2 - As unidades de colheita e as unidades de transplantação, os GCCT e os CST preveem procedimentos operacionais para notificar a DGS, no prazo máximo de 24 horas, das reações e incidentes adversos graves, bem como para a sua gestão, incluindo para a investigação destinada a analisar as suas causas e consequências e as medidas adotadas.

3 - A DGS monitoriza e efetua a gestão das notificações referidas no número anterior e emite os alertas necessários, a fim de serem tomadas as medidas adequadas.

4 - O sistema de notificação referido no n.º 1 deve ser interligado com o sistema de notificação previsto no artigo 11.º da Lei n.º 12/2009, de 26 de março, podendo ambos ser integrados num sistema único.

5 - Em caso de intercâmbio de órgãos entre Estado membros, a notificação das reações e incidentes adversos graves é feita de acordo com os procedimentos definidos nos termos do artigo 25.º da Diretiva n.º 2010/53/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 7 de julho.

### **Artigo 15.º**

#### **Profissionais qualificados**

1 - Os profissionais das unidades de colheita e transplantação dispõem de descrições de tarefas atualizadas que estabelecem claramente as respetivas missões e responsabilidades, sendo objeto de formação inicial e contínua adequada às respetivas tarefas.

2 - As unidades de colheita e as unidades de transplantação atribuem a responsabilidade pela gestão das respetivas atividades e pela garantia da qualidade a pessoas diferentes e independentes entre si.

3 - É obrigatória a existência de registos da formação ministrada, a qual deve incluir módulos referentes a boas práticas.

4 - O teor dos programas de formação e a competência específica dos profissionais são periodicamente avaliados pelos responsáveis das respetivas unidades.

### **CAPÍTULO V**

#### **Proteção do dador e do recetor e seleção e avaliação do dador**

### **Artigo 16.º**

#### **Consentimento**

1 - A colheita de órgãos em dadores vivos só pode ser efetuada após terem sido cumpridos os requisitos relativos às informações e consentimento previstos nos artigos 7.º e 8.º da Lei n.º 12/93, de 22 de abril, alterada e republicada pela Lei n.º 22/2007, de 29 de junho.

2 - A colheita post mortem de órgãos só pode ser realizada após verificação da não oposição ou inexistência de restrições à dádiva, através de consulta do Registo Nacional de não Dadores (RENDA), nos termos do artigo 15.º do Decreto-Lei n.º 244/94, de 26 de setembro.

3 - O consentimento do recetor é prestado e obtido de acordo com o previsto no artigo 7.º e n.os 1 e 2 do artigo 8.º da Lei n.º 12/93, de 22 de abril, alterada e republicada pela Lei n.º 22/2007, de 29 de junho.

4 - Tratando-se de recetores menores, o consentimento é prestado pelos pais, desde que não inibidos do exercício do poder paternal, ou, em caso de inibição ou falta de ambos, mediante autorização judicial.

5 - A transplantação de órgãos em menores com capacidade de entendimento e de manifestação de vontade carece, também, da concordância destes.

6 - A transplantação de órgãos em recetores maiores, incapazes por razões de anomalia psíquica, só pode ser feita mediante autorização judicial.

7 - O consentimento do recetor ou de quem legalmente o representa é sempre prestado por escrito, sendo livremente revogável.

### **Artigo 17.º**

#### **Qualidade e aspetos relacionados com a segurança do dador vivo**

1 - A dádiva e a colheita de órgãos em vida para fins terapêuticos ou de transplante só podem realizar-se nos termos e condições do artigo 6.º da Lei n.º 12/93, de 22 de abril, alterada e republicada pela Lei n.º 22/2007, de 29 de junho.

2 - Os dadores vivos são selecionados com base no seu estado de saúde e história clínica, por uma equipa multidisciplinar da unidade de transplantação, sendo necessário o registo da decisão, em suporte a integrar o RPT.

3 - A avaliação a que se refere o número anterior implica a exclusão de pessoas cuja dádiva possa constituir um risco inaceitável para a saúde.

4 - As unidades de transplantação possuem e mantêm atualizado um registo de dadores vivos, integrado no RPT, de acordo com o previsto no artigo 18.º

5 - As unidades de transplantação garantem o seguimento do dador vivo após o processo de dádiva e colheita, e dispõem de um sistema de notificação, de acordo com o definido pela alínea e) do n.º 2 do artigo 5.º, incluindo o registo de qualquer evento potencialmente relacionado com a qualidade e segurança do órgão doado e, conseqüentemente, com a segurança do recetor e de qualquer reação adversa grave, observada no dador vivo, que possa resultar da dádiva.

6 - Aplica-se à notificação das reações e incidentes adversos graves referidos no número anterior, à sua investigação e aos respetivos resultados, o previsto no n.º 2 do artigo 14.º

### **Artigo 18.º**

#### **Proteção, confidencialidade e segurança de dados pessoais**

1 - Os dados pessoais relativos aos dadores e recetores, seu tratamento e interconexão, estão sujeitos a sigilo profissional e a medidas adequadas de segurança e confidencialidade de informação, no estrito respeito pelas condições estabelecidas na Lei de Proteção de Dados Pessoais, aprovada pela Lei n.º 67/98, de 26 de outubro.

2 - Ao dador e recetor é garantida a confidencialidade de toda a informação relacionada com a sua saúde, com os resultados das análises das suas dádivas e com a rastreabilidade da sua dádiva.

3 - Na dádiva post mortem e na doação renal cruzada, o dador ou os seus familiares não podem conhecer a identidade do recetor, nem o recetor ou os seus familiares a identidade do dador, devendo os respetivos dados serem objeto de encriptação ou outro meio adequado a garantir o não cruzamento de informação.

4 - São expressamente proibidos aditamentos, supressões ou alterações não autorizadas dos dados constantes das fichas dos dadores ou dos registos de exclusão, bem como a transferência não autorizada de

informações quando não cumpram o previsto na Lei n.º 67/98, de 26 de outubro.

5 - Os sistemas de informação previstos na presente lei garantem a segurança dos dados.

6 - Os direitos de acesso e oposição dos titulares dos dados à informação contida nos sistemas de registo de dívidas e dadores exercem-se nos termos e condições referidas nos artigos 11.º e alínea a) do artigo 12.º da Lei n.º 67/98, de 26 de outubro.

## CAPÍTULO VI

Intercâmbio de órgãos e organizações europeias de intercâmbio de órgãos

### Artigo 19.º

#### Intercâmbio de órgãos

1 - O intercâmbio de órgãos humanos com países terceiros está sujeito a autorização do IPST, mediante parecer favorável da DGS em matéria de qualidade e segurança, só podendo ser autorizado quando se verifiquem as seguintes circunstâncias:

a) Os órgãos possam ser rastreados desde o dador até ao recetor e vice-versa;

b) Os órgãos cumpram os requisitos de qualidade e segurança previstos na presente lei ou, no caso de países terceiros, normas equivalentes.

2 - A DGS garante a fiscalização do intercâmbio de órgãos com outros Estados membros e com países terceiros, em conformidade com os requisitos de qualidade e segurança previstos na presente lei.

3 - Para efeitos do disposto no número anterior, a DGS pode celebrar acordos com as autoridades competentes congéneres de outros Estados membros e de países terceiros, desde que as referidas autoridades assegurem o cumprimento dos requisitos equivalentes aos previstos na presente lei.

### Artigo 20.º

#### Organizações europeias de intercâmbio de órgãos

A DGS pode celebrar acordos com organizações reconhecidas oficialmente a nível europeu de intercâmbio de órgãos, desde que as referidas organizações assegurem o cumprimento dos requisitos previstos na presente lei, a fim de delegar nas referidas organizações, nomeadamente:

a) O exercício das atividades previstas no regime para a qualidade e segurança;

b) Funções específicas relacionadas com o intercâmbio de órgãos com outros Estados membros e com países terceiros;

c) A fiscalização do intercâmbio de órgãos com outros Estados membros e com países terceiros.

## CAPÍTULO VII

Infrações e sanções

### Artigo 21.º

#### Contraordenações

1 - Às infrações em matéria de proteção de dados pessoais, confidencialidade e segurança do tratamento de dados é aplicável o regime de contraordenações previsto na Lei n.º 67/98, de 26 de outubro.

2 - Constituem contraordenações leves:

a) A inobservância dos n.os 2 e 8 do artigo 7.º;

b) A inobservância do n.º 1 do artigo 10.º;

c) O incumprimento do n.º 2 do artigo 11.º;

d) A inobservância dos n.os 1, 3 e 4 do artigo 15.º

3 - Constituem contraordenações graves:

a) O incumprimento das alíneas f) a i) do n.º 1 e o n.º 3 do artigo 9.º;

b) A inobservância das alíneas a) e b) do n.º 4 do artigo 11.º;

c) O incumprimento do n.º 2 do artigo 14.º;

d) A inobservância do n.º 2 do artigo 15.º;

e) A inobservância do n.º 7 do artigo 16.º;

f) A inobservância dos n.os 2 e 6 do artigo 17.º;

g) As infrações que tenham servido para facilitar ou encobrir infrações leves;

h) A reincidência na prática de infrações leves nos últimos seis meses.

4 - Constituem contraordenações muito graves:

a) A inobservância dos n.os 1, 2, 4, 5 e 6 do artigo 4.º;

b) O funcionamento de unidades de colheita e unidades de transplantação sem a autorização da DGS, nos termos dos n.os 1 e 5 do artigo 7.º;

c) O incumprimento das alíneas a) a e) do n.º 1 do artigo 9.º;

d) O incumprimento dos n.os 2 e 3 do artigo 10.º;

e) O incumprimento do n.º 1 do artigo 11.º;

f) A ausência da fundamentação prevista no n.º 3 do artigo 11.º;

g) A inobservância dos n.os 5 e 6 do artigo 11.º;

h) O incumprimento dos artigos 12.º e 13.º;

i) O incumprimento do n.º 1 do artigo 14.º;

j) A inobservância do disposto nos n.os 1 a 6 do artigo 16.º;

k) A inobservância dos n.os 3, 4 e 5 do artigo 17.º;

l) O incumprimento do n.º 1 do artigo 19.º;

m) As infrações que tenham servido para facilitar ou encobrir infrações graves ou muito graves;

n) A reincidência na prática de infrações graves nos últimos cinco anos.

5 - Nas contraordenações previstas nos números anteriores são puníveis a negligência e a tentativa,

sendo os montantes das coimas referidos no artigo seguinte reduzidos a metade.

#### **Artigo 22.º**

##### **Coimas**

As contraordenações previstas no artigo anterior são puníveis com coimas de acordo com a seguinte graduação:

- a) As contraordenações leves são punidas com coimas até (euro) 750;
- b) As contraordenações graves são punidas com coimas desde (euro) 750 até (euro) 10 000, para pessoas singulares, e até (euro) 22 500, para pessoas coletivas;
- c) As contraordenações muito graves são punidas com coimas desde (euro) 22 500 até (euro) 35 000, para pessoas singulares, e até (euro) 66 000, para pessoas coletivas.

#### **Artigo 23.º**

##### **Fiscalização, instrução e aplicação de coimas**

1 - Compete à IGAS assegurar a fiscalização do cumprimento das disposições constantes da presente lei e a aplicação das sanções previstas no presente capítulo.

2 - A IGAS é a entidade competente para instruir os processos de contraordenação cuja instauração tenha sido determinada pela DGS ou pelo IPST.

#### **Artigo 24.º**

##### **Destino do produto das coimas**

O produto das coimas previstas na presente lei reverte:

- a) Em 60 % para o Estado;
- b) Em 30 % para a DGS;
- c) Em 10 % para a IGAS.

### **CAPÍTULO VIII**

#### **Disposições transitórias e finais**

#### **Artigo 25.º**

##### **Norma transitória**

1 - As unidades de colheita e as unidades de transplantação já em funcionamento dispõem de um período de 12 meses, contados a partir da data da publicação da presente lei, para se adaptarem aos requisitos nela previstos.

2 - Após o período referido no número anterior as unidades de saúde onde se encontram instaladas as unidades de colheita e as unidades de transplantação dispõem de um período máximo de 30 dias úteis para requerer à DGS, nos termos do artigo 7.º, a renovação do pedido de autorização das atividades em conformidade com o previsto na presente lei.

3 - O disposto nos números anteriores não obsta a que as unidades de colheita e os centros de transplantação já em funcionamento possam requerer a renovação da

autorização antes de decorrido o período de adaptação previsto no n.º 1, caso reúnam os requisitos previstos na presente lei.

#### **Artigo 26.º**

##### **Norma revogatória**

São revogados os n.os 3 e 4 do artigo 3.º da Lei n.º 12/93, de 22 de abril, alterada e republicada pela Lei n.º 22/2007, de 29 de junho, e a Portaria n.º 31/2002, de 8 de janeiro.

#### **Artigo 27.º**

##### **Regulamentação**

A regulamentação prevista na presente lei é aprovada no prazo de 120 dias a partir da sua entrada em vigor. Aprovada em 19 de abril de 2013.

A Presidente da Assembleia da República, Maria da Assunção A. Esteves.

Promulgada em 30 de maio de 2013.

Publique-se.

O Presidente da República, Aníbal Cavaco Silva.

Referendada em 3 de junho de 2013.

O Primeiro-Ministro, Pedro Passos Coelho.

### **ANEXO I**

#### **(a que se refere o artigo 11.º)**

Caracterização de órgãos e dadores

#### **PARTE A**

##### **Conjunto mínimo de dados a recolher obrigatoriamente**

Conjunto mínimo de dados - informações destinadas à caracterização de órgãos e dadores a recolher para cada dádiva, tal como exigido no n.º 1 do artigo 11.º e sem prejuízo do disposto no n.º 2 do artigo 11.º

Conjunto mínimo de dados:

Estabelecimento onde se realizou a colheita e outros dados de caráter geral;

Data e hora da colheita para cada órgão;

Tipo de dador;

Grupo sanguíneo;

Sexo;

Causa da morte;

Data do óbito;

Data de nascimento ou idade estimada;

Peso;

Altura;

Historial presente ou passado de consumo de drogas por via intravenosa (IV);

Historial presente ou passado de doença maligna;

Historial presente de outras doenças transmissíveis;  
Testes de VIH, VHC, VHB;  
Informações básicas para avaliar a função do órgão doado.

## **PARTE B**

### **Conjunto complementar de dados**

Conjunto complementar de dados - informações destinadas à caracterização de órgãos e dadores a recolher para além do conjunto mínimo de dados especificado na parte A, com base na decisão da equipa médica, tendo em conta a disponibilidade das informações e as circunstâncias particulares do caso, nos termos do n.º 2 do artigo 11.º

Conjunto complementar de dados:

Dados gerais - informações relativas ao contacto do organismo/estabelecimento onde se realizou a colheita necessária à coordenação, atribuição e rastreabilidade dos órgãos dos dadores aos recetores e vice-versa;

Dados relativos ao dador - dados demográficos e antropométricos necessários para garantir uma compatibilidade adequada entre órgão/dador e recetor;

História clínica do dador - história clínica do dador, em especial de patologias que possam afetar a adequação dos órgãos para transplantação e implicar o risco de transmissão de doenças;

Dados físicos e clínicos - dados do exame clínico necessários à avaliação da manutenção fisiológica do potencial dador, bem como qualquer descoberta que revele doenças não detetadas durante a análise da história clínica do dador e que possam afetar a adequação dos órgãos para transplantação ou implicar o risco de transmissão de doenças;

Parâmetros laboratoriais - dados necessários à avaliação da caracterização funcional dos órgãos e à deteção de doenças potencialmente transmissíveis e de eventuais contraindicações à dádiva de órgãos;

Exames imagiológicos - exames imagiológicos necessários à avaliação do estado anatómico dos órgãos para transplante;

Terapêutica - tratamentos administrados ao dador e relevantes para a avaliação do estado funcional dos órgãos e da adequação à dádiva de órgãos, em especial o uso de antibióticos, substâncias de apoio inotrópico ou transfusão terapêutica.

## **ANEXO II**

### **(a que se refere o artigo 13.º)**

Informação sobre os dados mínimos acerca do dador/recetor a serem conservados

A - Pelas unidades de colheita de órgãos

Identificação do dador.

Identificação da dádiva que incluirá, pelo menos:

Identificação do organismo de colheita;

Código de colheita;

Data da colheita;

Local da colheita;

Tipo de dádiva (por exemplo, um órgão ou vários órgãos; dadores vivos ou dadores cadáver);

Data de distribuição ou eliminação;

Identificação do centro de transplantação ao qual os órgãos foram distribuídos.

B - Pelos centros de transplantação de órgãos

Identificação do recetor.

Identificação da unidade de colheita de órgãos fornecedora.

Data da distribuição ou eliminação.

Identificação do clínico ou utilizador final/instalação.

Tipo de órgão.

Data da transplantação ou eliminação.

## 8.3. Anexo 3 – Despacho 22/95, de 4 de Agosto

10 776

DIÁRIO DA REPÚBLICA — II SÉRIE

N.º 208 — 8-9-1995

correspondência que for dirigida a chefes de divisão da Administração Pública ou cargos de nível hierárquico igual ou superior.

5 — É revogado o Desp. 2/95-DSM, de 6-2, publicado na DR, 2.ª, 59, de 10-3-95.

11-7-95. — O Director de Serviços de Transportes Rodoviários de Mercadorias, *José Alberto Franco*.

### Direcção-Geral dos Edifícios e Monumentos Nacionais

Por despacho do Secretário de Estado das Obras Públicas de 29-6-95:

Abel da Silva Martins, engenheiro técnico civil principal do extinto quadro da Direcção-Geral dos Edifícios e Monumentos Nacionais, aprovado pela Port. 668/88, de 6-10, que se encontrava na situação de licença sem vencimento de longa duração — autorizado o regresso à actividade de serviço, sendo integrado no quadro de pessoal da Direcção Regional de Monumentos de Lisboa, anexo v à Port. 1027/93, de 14-10, da mesma Direcção-Geral. (Isento de fiscalização prévia do TC. Não são devidos emolumentos.)

21-8-95. — O Subdirector-Geral, *António Bento Maia*.

### Junta Autónoma de Estradas

**Declaração.** — Para efeitos do disposto no Dec.-Lei 13/94, de 15-1, declara-se que:

- 1) Por despacho do vice-presidente da Junta Autónoma de Estradas, engenheiro Carlos Jorge Reis Leitão de 13-4-95, foi aprovado o estudo prévio do IC4, entre Sines e Lagos;
- 2) O referido estudo prévio estará patente, durante 30 dias, na Direcção dos Serviços de Construção e na Direcção de Estradas do Distrito de Faro.

**Declaração.** — Para efeitos do disposto no Dec.-Lei 13/94, de 15-1, declara-se que:

- 1) Por despacho do vice-presidente da Junta Autónoma de Estradas, engenheiro Carlos Jorge Reis Leitão de 10-3-95, foi aprovado o projecto de execução do IC 17, CRIL, nó de Sacavém;
- 2) O referido projecto estará patente, durante 30 dias, na Direcção dos Serviços de Construção e na Direcção Regional de Estradas do Distrito de Lisboa.

22-8-95. — O Director de Serviços, *J. J. Rocio Mendes*.

**Rectificação.** — Tendo sido publicado com inexactidão na DR, 2.ª, 180, de 5-8-95, o n.º 3 do despacho de delegação de competências no director de Empreendimentos Concessionados, engenheiro João Manuel de Sousa Marques, na área de actuação da Direcção dos Serviços de Conservação, novamente se publica:

3 — Este despacho produz efeitos desde o dia 1-6-95, ficando, deste modo, ratificados todos os actos praticados desde aquela data por este director de serviços, no âmbito destas competências.

21-8-95. — A Directora de Serviços de Recursos Humanos, *Maria José Capote Fernandes*.

### Conselho de Mercados de Obras Públicas e Particulares

Por despachos de 2 e 7-8-95, respectivamente, do secretário-geral do Conselho de Mercados de Obras Públicas e Particulares e do subdirector-geral de Portos, Navegação e Transportes Marítimos:

Claudimira da Conceição Monteiro, telefonista, e Isolinda da Conceição Ferreira Vicente e Eva Pinho da Conceição, auxiliares

administrativos do quadro de pessoal da Direcção-Geral de Portos, Navegação e Transportes Marítimos — transferidas, com a mesma categoria, para o quadro de pessoal do Conselho de Mercados de Obras Públicas e Particulares, indo ocupar lugares do quadro criados pela Port. 573/95, de 16-6, ficando exoneradas do anterior lugar a partir da data da assinatura do termo da aceitação.

Alice Santos Marques Pereira Alves, Maria da Conceição Chuva Labrinha Pires Dias e Maria da Conceição Cabaço, segundos-oficiais do quadro de pessoal da Direcção-Geral de Portos, Navegação e Transportes Marítimos — renovadas, por mais um ano, as respectivas requisições para prestar serviço no Conselho de Mercados de Obras Públicas e Particulares, com efeitos a partir de 19-9-95.

(Não carecem de fiscalização prévia do TC.)

14-8-95. — Pelo Secretário-Geral, por delegação de competências, *Vasco Fonseca Martins*.

### Secretaria-Geral

Por despachos do subdirector-geral de Portos, Navegação e Transportes Marítimos de 18-8-95 e meu de 24-8-95:

Zulmira da Conceição Belo Plácido, telefonista do quadro de pessoal da Direcção-Geral de Portos, Navegação e Transportes Marítimos, a exercer, em regime de requisição, idênticas funções nesta Secretaria-Geral — prorrogada, por mais um ano, a referida requisição. (Não carece de fiscalização prévia do TC.)

25-8-95. — O Secretário-Geral, *Nelza Maria Vargas Florêncio*.

### Inspecção-Geral de Obras Públicas, Transportes e Comunicações

**Despacho.** — Nos termos dos arts. 35.º e 36.º do Código do Procedimento Administrativo, aprovado pelo Dec.-Lei 442/91, de 15-11, e no uso da faculdade que me é conferida pelo Desp. SEAMOPTC 14/95, de 31-7, delego e subdelego, nas minhas ausências e impedimentos, na directora de serviços da Direcção de Serviços de Apoio Técnico da Inspecção-Geral de Obras Públicas, Transportes e Comunicações, licenciada Anabela de Oliveira Fino Ruivo Crespo:

1 — As competências próprias constantes do mapa II anexo ao Dec.-Lei 323/89, de 26-9, bem como as específicas previstas no Dec.-Lei 409/87, de 31-12.

3 — O presente despacho produz efeitos a partir de 1-9-95.

23-8-95. — O Subinspector-Geral, *Jorge Manuel Azevedo Nunes*.

**Aviso.** — Nos termos das disposições conjugadas do art. 33.º e das als. b) e c) do n.º 2 do art. 24.º do Dec.-Lei 498/88, de 30-12, faz-se público que a lista de classificação final, devidamente homologada, dos candidatos aprovados e excluídos no concurso interno geral de acesso para o preenchimento de uma vaga de oficial administrativo principal do quadro de pessoal da Inspecção-Geral de Obras Públicas, Transportes e Comunicações, aberto por aviso publicado na DR, 2.ª, 122, de 26-5, se encontra afixada, a partir da data da publicação deste aviso na DR, nas instalações da referida Inspecção-Geral, localizada na Rua da Alfândega, 170, 1.ª, em Lisboa, onde pode ser consultada nos dias úteis, dentro do horário normal de expediente.

24-8-95. — O Subinspector-Geral, *Jorge Manuel Azevedo Nunes*.

## MINISTÉRIO DA SAÚDE

### GABINETE DO MINISTRO

**Desp. 22/95.** — I — É criado o Centro Nacional de Dadores de Células de Medula Óssea, Estaminais ou de Sangue do Cordão, adiante abreviadamente designado por CEDACE.

2 — Compete ao CEDACE, como estrutura coordenadora nacional dos registos de dadores existentes nos centros de histocompatibilidade, designadamente:

- a) Organizar os pedidos de dadores de células de medula óssea, estaminais ou de sangue do cordão, nacionais ou internacionais;
- b) Coordenar as actividades de doação, conservação e transplante de células de medula óssea, estaminais ou de sangue do cordão;
- c) Coordenar e organizar, em colaboração com os centros de histocompatibilidade, o recrutamento e aconselhamento de dadores;
- d) Coordenar os dados de tipagem de dadores eventuais e manter actualizado o respectivo registo;
- e) Manter uma relação e informação permanentes sobre os dadores eventuais com os centros hospitalares de colheita e transplantação e com as unidades de imuno-hemoterapia.

3 — O CEDACE é dirigido por um médico por mim nomeado, de entre o pessoal médico dos centros de histocompatibilidade, e dotado de um médico ligado à área de coordenação de transplantação e de pessoal de apoio administrativo, designado pelo director do CEDACE de entre o pessoal dos centros de histocompatibilidade.

3.1 — Sempre que necessário, o CEDACE pode dispor da colaboração de um técnico de serviço social, a designar pelo seu director.

4 — O CEDACE deve estar integrado num laboratório de tipagem reconhecido internacionalmente pela European Foundation for Immunogenetics ou outra organização de acreditação.

5 — Os centros de histocompatibilidade devem realizar todos os estudos necessários de marcadores de doenças transmissíveis, nos termos do n.º 10 do Regulamento sobre a Transfusão de Sangue, aprovado pelo Desp. 19/91, do Ministro da Saúde, publicado no DR, 2.ª, de 12-9-91, a fim de assegurar o correcto funcionamento do CEDACE.

6 — O estudo HLA dos potenciais dadores de células é da competência dos centros de histocompatibilidade, sem prejuízo da sua futura atribuição aos serviços de imuno-hemoterapia, de acordo com as normas de controlo de qualidade em vigor nos primeiros.

7 — Os pedidos de pesquisa de dadores de células ao CEDACE devem ser preferencialmente feitos pelas unidades de transplantação ou pelos serviços hospitalares de hematologia.

8 — Os encargos decorrentes das pesquisas são da responsabilidade das entidades que as solicitarem.

9 — O CEDACE deve manter um intercâmbio permanente com os registos internacionais e transmitir anualmente à European Bone Marrow Transplant (EBMT) os dados referentes aos transplantes de células ou medula realizados em Portugal.

10 — O CEDACE funciona no Centro de Histocompatibilidade do Sul.

4-8-95. — O Ministro da Saúde, *Adalberto Paulo da Fonseca Mendo*.

**Despacho.** — João Rodrigues, natural de Castelo Branco, conhecido na História por Amato Lusitano, foi um dos mais insígnos médicos portugueses do século XVI. Tendo nascido em 1511, na cidade de Castelo Branco, estudou medicina em Salamanca, tendo regressado a Portugal em 1521 e permanecido no país até 1534, ano em que, perseguido por ser de raça hebraica e suspeito de marrano, saiu de Portugal, para não mais voltar. Viajou então pela Europa, onde conviveu com os grandes vultos da cultura da época, ensinou em universidades prestigiosas e chegou a ser médico do papa Júlio III. Sempre perseguido pelo fanatismo anti-semita, Amato Lusitano fixou-se finalmente em Salónica, então a maior colónia de marranos do Império Otomano, e talvez mesmo da Europa, onde veio a falecer em 1568.

Espírito observador, experimental e eminentemente científico, homem típico do melhor Quinhentos português, o do progresso e da ciência, Amato Lusitano, apesar de vítima da repressão inquisitorial no seu país de nascimento, é visto pela posteridade como um grande médico português, marcando inclusivamente o seu pseudónimo académico a respectiva origem nacional.

Assim, convindo assinalar o relacionamento dinâmico entre a sociedade civil e os hospitais que nela se devem integrar, determino, sob proposta do conselho de administração e respectiva aprovação do conselho geral, que o Hospital Distrital de Castelo Branco se passe a designar por Hospital Amato Lusitano — Castelo Branco.

11-8-95. — O Ministro da Saúde, *Adalberto Paulo da Fonseca Mendo*.

### Instituto Nacional de Emergência Médica

**Aviso.** — A lista dos candidatos ao concurso para provimento de quatro vagas de terceiro-oficial, a que se refere o aviso publicado no DR, 2.ª, 135, de 12-6-95, encontra-se afixada na Rua do Infante D. Pedro, 8, em Lisboa.

21-8-95. — A Directora dos Serviços Administrativos, *Margarida Bentes de Oliveira*.

### Inspecção-Geral da Saúde

**Aviso.** — Nos termos do art. 33.º do Dec.-Lei 498/88, de 30-12, e após ter sido cumprido o disposto no art. 100.º do Código do Procedimento Administrativo, aprovado pelo Dec.-Lei 442/92, de 15-11, faz-se público que a lista de classificação final, devidamente homologada, dos candidatos admitidos ao concurso interno geral de ingresso para telefonista do quadro de pessoal da Inspecção-Geral da Saúde, aberto por aviso publicado no DR, 2.ª, 107, de 9-5-95, se encontra afixada na repartição administrativa desta Inspecção-Geral, sita na Avenida de 24 de Julho, 2, L, em Lisboa, onde pode ser consultada após publicação deste aviso.

23-8-95. — O Inspector-Geral, *Armando Moreira Rodrigues*.

### Departamento de Recursos Humanos da Saúde

#### Escola Superior de Enfermagem de Bragança

**Aviso.** — Nos termos da al. b) do n.º 2 do art. 24.º do Dec.-Lei 498/88, de 30-12, avisam-se os candidatos ao concurso interno geral de acesso para a categoria de primeiro-oficial, a que se refere o aviso publicado no DR, 2.ª, 35, de 10-2-95, de que a respectiva lista de classificação final se encontra afixada no quadro de avisos existente junto à secretaria desta Escola.

**Aviso.** — Nos termos da al. b) do n.º 2 do art. 24.º do Dec.-Lei 498/88, de 30-12, avisam-se os candidatos ao concurso interno geral de ingresso para a categoria de terceiro-oficial, a que se referem os avisos publicados nos DR, 2.ª, 284 e 51, de 10-12-94 e 1-3-95, respectivamente, de que a respectiva lista de classificação final se encontra afixada no quadro de avisos existente junto à secretaria desta Escola.

21-8-95. — O Director, *Alípio Ferreira Martins*.

### Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento

**Aviso.** — Em cumprimento do disposto na al. b) do n.º 2 do art. 24.º do Dec.-Lei 498/88, de 30-12, faz-se público que a lista dos candidatos admitidos e excluídos no concurso interno geral de admissão a estágio para ingresso na carreira técnica superior (concurso n.º 3), a que se refere o aviso publicado no DR, 2.ª, 120, de 24-5-95, se encontra afixada nas instalações do Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, na Avenida do Brasil, 53, 1700 Lisboa.

21-8-95. — A Presidente do Júri, *Helena Lopes*.

**Aviso.** — Faz-se público que, por deliberação do conselho de administração do Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento de 31-3-95, o júri do concurso externo geral de ingresso para admissão de dois estagiários, com vista ao provimento de dois lugares de técnico superior de 2.ª classe, aberto por aviso publicado no DR,

## 8.4. Anexo 4 – Portaria nº165/2012, de 22 de Maio

### Portaria nº. 165/2012, de 22 de Maio

#### SUMÁRIO

Aprova os Estatutos do Instituto Português do Sangue e da Transplantação, I. P., e revoga a Portaria n.º 811/2007, de 27 de julho

#### Portaria n.º 165/2012, de 22 de maio

O Decreto-Lei n.º 39/2012, de 16 de fevereiro, definiu a missão e as atribuições do Instituto Português do Sangue e da Transplantação, I. P. (IPST, I. P.). Importa agora, no desenvolvimento daquele diploma, determinar a sua organização interna através da aprovação dos respetivos estatutos.

Assim:

Ao abrigo do disposto no artigo 12.º da Lei n.º 3/2004, de 15 de janeiro, manda o Governo, pelos Ministros de Estado e das Finanças e da Saúde, o seguinte:

#### Artigo 1.º

##### Objeto

São aprovados, em anexo à presente portaria, e da qual fazem parte integrante, os Estatutos do Instituto Português do Sangue e da Transplantação, I. P., abreviadamente designado por IPST, I. P.

#### Artigo 2.º

##### Norma revogatória

É revogada a Portaria n.º 811/2007, de 27 de julho.

#### Artigo 3.º

##### Entrada em vigor

A presente portaria entra em vigor no quinto dia útil seguinte ao da sua publicação.

Pelo Ministro de Estado e das Finanças, Luís Filipe Bruno da Costa de Moraes Sarmento, Secretário de Estado do Orçamento, em substituição, em 2 de maio de 2012. - O Ministro da Saúde, Paulo José de Ribeiro Moita de Macedo, em 20 de abril de 2012.

#### ANEXO

##### Estatutos do Instituto Português do Sangue e da Transplantação, I. P.

#### CAPÍTULO I

##### Estrutura organizacional

#### Artigo 1.º

##### Estrutura

1 - A organização interna do Instituto Português do Sangue e da Transplantação, I. P., abreviadamente designado por IPST, I. P., é constituída pelas seguintes unidades orgânicas de âmbito nacional:

a) Serviços centrais, designados por departamentos;

b) Coordenações nacionais;

c) Gabinetes.

2 - Integram ainda a organização interna do IPST, I. P., serviços territorialmente desconcentrados, com a seguinte área territorial de atuação:

a) Centro de sangue e da transplantação de Lisboa, cujo âmbito territorial corresponde ao nível ii da nomenclatura de Unidades Territoriais para fins estatísticos (NUTS) de Lisboa e Vale do Tejo, do Alentejo e do Sul;

b) Centro de sangue e da transplantação de Coimbra, cujo âmbito territorial corresponde ao nível ii da nomenclatura de Unidades Territoriais para fins estatísticos (NUTS) do Centro;

c) Centro de sangue e da transplantação do Porto, cujo âmbito territorial corresponde ao nível ii da nomenclatura de Unidades Territoriais para fins estatísticos (NUTS) do Norte.

#### Artigo 2.º

##### Cargos dirigentes intermédios

1 - Os departamentos são dirigidos por diretores, cargos de direção intermédia de 1.º grau.

2 - Os centros de sangue e da transplantação são dirigidos por diretores técnicos, cargos de direção intermédia de 1.º grau, recrutados, por procedimento concursal, nos termos do Estatuto do Pessoal Dirigente da Administração Pública, de entre trabalhadores licenciados em medicina com experiência e autoridade científica comprovada na área da medicina transfusional ou da transplantação.

#### Artigo 3.º

##### Coordenação

1 - As coordenações nacionais são chefiadas por coordenadores, designados por deliberação do conselho diretivo de entre trabalhadores licenciados em medicina, de reconhecido mérito técnico e científico, não implicando a criação de cargo dirigente ou a atribuição de remuneração adicional.

2 - Os gabinetes são chefiados por coordenadores, designados por deliberação do conselho diretivo de entre trabalhadores do mapa de pessoal do IPST, I. P., não implicando a criação de cargo dirigente ou a atribuição de remuneração adicional.

#### **Artigo 4.º**

##### **Departamento de Gestão de Recursos Humanos e Formação**

Ao Departamento de Gestão de Recursos Humanos e Formação, abreviadamente designado DGRH, compete:

- a) Colaborar na definição da política de recursos humanos a adotar na instituição e assegurar a sua execução;
- b) Promover e assegurar a gestão eficiente dos recursos humanos, tendo em conta as necessidades gerais e específicas do IPST, I. P., nomeadamente, propondo medidas conducentes à racionalização da gestão de pessoal, aumento da produtividade e da qualidade do trabalho;
- c) Gerir o sistema de carreiras, de avaliação do desempenho e de informação do pessoal;
- d) Promover e executar os procedimentos relativos à constituição, modificação e extinção da relação jurídica de emprego público;
- e) Assegurar o processamento de remunerações e outros abonos do pessoal do IPST, I. P.;
- f) Assegurar e controlar o registo de assiduidade do pessoal;
- g) Promover a qualificação e a valorização profissional dos recursos humanos;
- h) Gerir a formação profissional, tendo em conta as necessidades gerais e específicas no âmbito das atribuições do IPST, I. P.;
- i) Assegurar a elaboração de candidaturas a financiamentos para formação profissional e monitorizar a concretização dos respetivos projetos formativos;
- j) Assegurar a gestão da documentação, a acessibilidade e conservação do arquivo e cadastro de pessoal do IPST, I. P.

#### **Artigo 5.º**

##### **Departamento de Planeamento e Gestão Patrimonial e Financeira**

Ao Departamento de Planeamento e Gestão Patrimonial e Financeira, abreviadamente designado DPGPF, compete:

- a) Assegurar a gestão administrativa dos procedimentos inerentes à realização de despesas públicas e contratação com locação e aquisição de bens e serviços, bem como de empreitadas de obras públicas;
- b) Assegurar a gestão de stocks e o aprovisionamento de bens e serviços necessários e adequados ao funcionamento do IPST, I. P.;
- c) Organizar, elaborar e manter os registos patrimoniais e contabilísticos;
- d) Executar a política financeira e orçamental da instituição e preparar o orçamento anual, assegurando a sua gestão e controlo periódico;

e) Elaborar a conta de gerência e o relatório financeiro anual do IPST, I. P.;

f) Elaborar o orçamento anual de tesouraria e controlar periodicamente a sua execução;

g) Assegurar a liquidação de receitas e a cobrança e pagamento de despesas;

h) Promover a constituição de fundos de maneo e assegurar o controlo da sua gestão;

i) Garantir a gestão, conservação e inventário dos bens, equipamentos, edifícios e instalações pertencentes à instituição, ou que lhe estão afetos;

j) Elaborar os planos de atividade anuais e plurianuais, bem como o relatório de atividades, nos termos da legislação em vigor;

k) Criar instrumentos de apoio à gestão e desenvolver sistemas de indicadores para suporte à decisão e ao planeamento;

l) Proceder à recolha, tratamento e divulgação da informação de gestão e de atividade;

m) Analisar os dados estatísticos e propor as necessárias medidas corretivas, relativas à atividade dos serviços do IPST, I. P.;

n) Elaborar estudos, análises económico-financeiras e projetos de planeamento estratégico e operacional, bem como acompanhar a sua implementação;

o) Elaborar, propor e acompanhar as candidaturas, no âmbito dos programas cofinanciados incluindo os de investimento nacional;

p) Propor os ajustamentos considerados necessários nas redes de sangue, medicina transfusional e transplantação;

q) Garantir ferramentas de apoio à decisão no âmbito operacional, orçamental e financeiro;

r) Emitir pareceres e garantir a assessoria técnica especializada nas áreas de planeamento e informação para a gestão.

#### **Artigo 6.º**

##### **Coordenação Técnica Nacional do Sangue e da Transplantação**

À Coordenação Técnica Nacional do Sangue e da Transplantação compete assegurar a harmonização de processos, a convergência dos métodos utilizados e promover a agregação da atividade laboratorial do sangue, histocompatibilidade e transplantação.

#### **Artigo 7.º**

##### **Coordenação Nacional da Transplantação**

À Coordenação Nacional da Transplantação compete:

a) Dinamizar, regular, normalizar, controlar e fiscalizar a atividade desenvolvida pela Rede Nacional de Coordenação de Colheita e Transplantação;

b) Instituir e manter um registo de serviços manipuladores e aplicadores de órgãos, tecidos e células de origem humana;

- c) Proceder ao intercâmbio de informações com entidades internacionais no domínio da transplantação, no âmbito das suas competências;
- d) Garantir a implementação de um sistema adequado que assegure a rastreabilidade dos órgãos, tecidos e células de origem humana que tenham como fim a transplantação;
- e) Coordenar, a nível nacional, a atividade dos serviços aplicadores de órgãos, tecidos e células de origem humana, bem como dos Gabinetes Coordenadores de Colheita e Transplantação (GCCT), definir o seu número e as áreas de influência, e propor ao conselho diretivo do IPST, I. P., medidas que permitam garantir a melhor articulação entre eles;
- f) Assegurar a realização das atividades de biovigilância, bem como o seu desenvolvimento com vista à melhoria dos processos da transplantação;
- g) Garantir a articulação dos GCCT entre si e com as unidades de colheita e transplantação da forma considerada mais adequada à prossecução dos objetivos nacionais da transplantação;
- h) Garantir a formação inicial e contínua de profissionais para o desempenho da coordenação hospitalar.

#### **Artigo 8.º**

##### **Coordenação Nacional do Sangue e da Medicina Transfusional**

À Coordenação Nacional do Sangue e da Medicina Transfusional compete:

- a) Instituir e manter um registo dos serviços de sangue e de medicina transfusional;
- b) Garantir a harmonização nacional da rede da medicina transfusional, desde a colheita à administração do sangue;
- c) Promover a articulação com os serviços hospitalares no domínio das suas competências;
- d) Assegurar a realização das atividades de hemovigilância bem como o seu desenvolvimento com vista à melhoria dos processos da transfusão do sangue;
- e) Proceder ao intercâmbio de informações com entidades internacionais no domínio do sangue e da medicina transfusional, no âmbito das suas competências.

#### **Artigo 9.º**

##### **Gabinete de Comunicação, Promoção da Dádiva e Voluntariado**

Ao Gabinete de Comunicação, Promoção da Dádiva e Voluntariado, abreviadamente designado GCPDV, compete:

- a) Executar as ações de sensibilização dos cidadãos para a necessidade da dádiva regular de sangue, bem como de tecidos, células e órgãos e promover e apoiar as atividades organizadas de voluntariado nesta área;

b) Promover, organizar e propor formação adequada para a gestão da dádiva e da doação envolvendo, dessa forma, a comunidade nas melhores práticas de intervenção social;

c) Tomar as medidas necessárias para garantir o anonimato da dádiva, a ausência de coação e a gratuidade da mesma, bem como a ausência de lucro por parte dos serviços envolvidos;

d) Assegurar a comunicação regular de todos os dados reconhecidamente relevantes com vista a decisões mais esclarecidas dos cidadãos e da comunidade;

e) Elaborar planos de contingência bem como propor a definição de reservas estratégicas, a sua localização e articulação;

f) Avaliar os indicadores e as tendências de dádiva face aos da utilização clínica e elaborar propostas de atuação ao conselho diretivo.

#### **Artigo 10.º**

##### **Gabinete de Investigação, Inovação e Desenvolvimento**

Ao Gabinete de Investigação, Inovação e Desenvolvimento, abreviadamente designado GIID, compete:

a) Promover o desenvolvimento do estudo e da investigação em medicina transfusional e de transplantação;

b) Organizar e manter um sistema de documentação, informação e divulgação técnico-científica de referência nacional nas áreas da medicina transfusional e da transplantação, designadamente através da participação em redes de criação, divulgação de conhecimento e publicações periódicas;

c) Propor, organizar e assegurar a execução das atividades de investigação, desenvolvimento e inovação em que a instituição participe a nível nacional, europeu e internacional.

#### **Artigo 11.º**

##### **Gabinete de Tecnologias de Informação e Comunicações**

Ao Gabinete de Tecnologias de Informação e Comunicações, abreviadamente designado GTIC, compete:

a) Gerir a rede informática da instituição, nas vertentes do sangue e transplantação, as respetivas aplicações e equipamentos necessários ao seu funcionamento e à sua articulação com outras aplicações informáticas no âmbito da saúde;

b) Garantir a integração das bases de dados das diferentes áreas de forma a potencializar a informação disponível;

c) Garantir a segurança e fiabilidade dos sistemas e tecnologias de informação e comunicações da instituição;

d) Assegurar o apoio técnico aos utilizadores dos sistemas e tecnologias de informação e comunicação.

### **Artigo 12.º**

#### **Gabinete de Gestão da Qualidade**

Ao Gabinete de Gestão da Qualidade, abreviadamente designado GGQ, compete:

- a) Fomentar uma cultura da qualidade na instituição e assegurar o bom funcionamento dos sistemas de gestão da qualidade implementados;
- b) Harmonizar e normalizar o sistema de gestão da qualidade implementado em todos os serviços do IPST, I. P.;
- c) Propor e desenvolver medidas que promovam a eficiência dos processos do IPST, I. P.;
- d) Emitir pareceres e garantir a assessoria técnica especializada na área da gestão da qualidade;
- e) Propor, organizar e assegurar o desenvolvimento da instituição no âmbito das áreas da garantia e da gestão da qualidade.

### **Artigo 13.º**

#### **Gabinete Jurídico**

Ao Gabinete Jurídico, abreviadamente designado GJ, compete:

- a) Emitir pareceres, elaborar informações e proceder a estudos de natureza jurídica sobre quaisquer assuntos que lhe sejam submetidos pelo órgão máximo do serviço;
- b) Prestar apoio técnico aos diferentes órgãos e serviços do IPST, I. P., nomeadamente na área da contratação pública;
- c) Assegurar a atividade de contencioso do IPST, I. P.;
- d) Assegurar o apoio necessário à preparação dos processos e à ligação entre o IPST, I. P., e os seus mandatários judiciais e acompanhar a respetiva atividade;
- e) Participar na análise, preparação ou modificação de diplomas legais, regulamentos e outros documentos de natureza normativa relacionados com a atividade do IPST, I. P., procedendo aos necessários estudos jurídicos;
- f) Instruir processos, nomeadamente disciplinares;
- g) Assegurar a resposta a reclamações apresentadas por utentes dos serviços do IPST, I. P.;
- h) Emitir certidões sobre processos que lhe estão confiados;
- i) Proceder ao intercâmbio de informações jurídicas com entidades europeias e internacionais no domínio do sangue e da transplantação, no âmbito das suas atribuições.

### **Artigo 14.º**

#### **Centros de Sangue e da Transplantação**

1 - Aos Centros de Sangue e da Transplantação, no âmbito da sua área territorial de intervenção, compete:

- a) Promover e sensibilizar os cidadãos para a dádiva de sangue, tecidos e células;
- b) Participar a nível das comunidades locais na educação dos jovens sobre a dádiva de sangue tecidos e células;
- c) Promover e apoiar localmente a atividade de voluntariado, nomeadamente através das organizações de doadores de sangue;
- d) Definir, propor e implementar a estratégia mais eficaz para a colheita de sangue, tecidos e células;
- e) Proceder à colheita, separação em componentes, estudo laboratorial, conservação, distribuição do sangue e componentes sanguíneos;
- f) Proceder ao controlo de qualidade dos produtos utilizados e dos produtos finais;
- g) Assegurar a recolha e o tratamento da informação regional relativa ao processo transfusional e o funcionamento do sistema de hemovigilância;
- h) Garantir o estudo laboratorial de doadores e dos doentes candidatos a transplantação de órgãos, tecidos e células;
- i) Assegurar a manutenção das condições necessárias para a escolha do par dador recetor em transplantação renal;
- j) Acompanhar a transplantação de órgãos, tecidos e células.

2 - Ao Centro de Sangue e da Transplantação de Lisboa compete ainda:

- a) Gerir o Centro Nacional de Doadores de Células Estaminais de Medula Óssea de Sangue Periférico ou de Cordão Umbilical (CEDACE);
- b) Proceder às atividades de Banco de Tecidos, nomeadamente o processamento, estudo laboratorial, armazenamento e distribuição de tecidos de origem humana para utilização em transplantação.

3 - Ao centro de sangue e da transplantação do Porto compete ainda gerir o Banco Público de Sangue do Cordão Umbilical (LUSOCORD), nomeadamente o processamento, estudo laboratorial, armazenamento e distribuição.

## 8.5. Anexo 5 – Procedimento de Extração de ADN com Kit QIAGEN

(Adaptado do respetivo procedimento operativo interno do IPST)

### MATERIAL

- Pipetas de 10µL, 20µL, 200µL e 1000µL
- Tubos de centrífuga cónicos de propileno de 15ml com rolha
- Pipetas Pasteur
- Tubos Eppendorf de 1.5ml
- Micropipetas de volume variável e pontas apropriadas
- Parafilme
- Etiquetas autocolante
- Sistema de banho-maria
- Vórtex
- Centrífuga
- Microcentrifuga
- Espectrofotómetro Nanodrop

### REAGENTES

- KIT QIAGEN
  - Colunas spin QIAmp
  - Tubos colecta 2ml
  - Tampão AL
  - Tampão AW1 (concentrado)
  - Tampão AW2 (concentrado)
  - Tampão AE
  - Protease QIAGEN
  - Solvente da Protease
- Tampão de lise de eritrocitos (RCLB) (144mM NH<sub>4</sub>Cl; 1mM NaHCO<sub>3</sub>)
- PBS (tampão fosfato salino)
- Etanol (96-100%)

### AMOSTRA LABORATORIAL

- **Sangue periférico colhido com anticoagulante** (EDTA ou ACD). Se a amostra for processada em menos de 24h pode ser armazenada à temperatura ambiente, se for processada dentro de 5 dias deve ser refrigerada entre 4 a 8°C e se for processada dentro de 48 meses deve ser congelada entre -16 e -30°C.

o

## **PROCEDIMENTO LABORATORIAL**

### **A) Preparação de Reagentes**

Caso seja necessário preparar:

#### QIAGEN Protease

Adicionar o solvente à Protease QIAGEN liofilizada. Após total dissolução armazenar de acordo com as condições recomendadas.

#### Tampão AL

Agitar bem antes de usar. O Tampão AL é estável por 1 ano à temperatura ambiente (15 a 25°C).

#### Tampão AW1

O tampão AW1 é fornecido numa forma concentrada. Antes de usar pela primeira vez, adicionar a quantidade de Etanol (96-100%) indicada no frasco. Esta quantidade varia de acordo com o tamanho do kit (nº de extrações). O tampão AW1 é estável por 1 ano quando mantido fechado à temperatura ambiente (15 a 25°C).

#### Tampão AW2

O tampão AW2 fornecido concentrado. Antes de usar pela primeira vez, adicionar a quantidade de Etanol (96-100%) indicada no frasco. Esta quantidade varia de acordo com o tamanho do kit (nº de extrações). O tampão AW2 estável por 1 ano quando mantido fechado à temperatura ambiente (15 a 25°C).

### **B) Preparação da amostra**

#### Sangue periférico

1. Centrifugar 5ml de sangue total colhido em EDTA ou ACD.
2. Recolher com pipeta Pasteur para tubo cónico de 15ml identificado o buffy-coat formado, tentando levar o mínimo de eritrocitos possível.

NOTA: Caso não se processe de imediato à extração, as células recolhidas podem ser congeladas a -16 a -30°C. Em alternativa é possível usar o volume de sangue total

#### Amostras de zaragatoa bucal

Armazenada à temperatura ambiente.

### **C) Extração de ADN em sangue total ou buffy-coat**

1. Aquecer o bloco térmico até atingir 56°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )
2. Pipetar 20 $\mu\text{L}$  de Protease QIAGEN para um tubo de microcentrífuga de 2mL
3. Adicionar 200 $\mu\text{L}$  de buffy-coat ou sangue total ou aproximadamente  $5 \times 10^6$  linfócitos em 200 $\mu\text{L}$  de PBS
4. Adicionar 200 $\mu\text{L}$  de Tampão AL e misturar por vórtex durante 15 segundos
5. Incubar a 56°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 10 min
6. Centrifugar spin
7. Adicionar 200 $\mu\text{L}$  de Etanol (96-100%)
8. Misturar por vórtex durante 15 segundos
9. Aplicar a mistura anterior na coluna spin QIAmp, com tubo de coleta de 2mL.
10. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
11. Descartar o tubo de coleta e substituir por um novo
12. Adicionar 500 $\mu\text{L}$  de Tampão AW1 à coluna
13. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min
14. Descartar o tubo de coleta e substituir por um novo
15. Adicionar 500 $\mu\text{L}$  de Tampão AW2 à coluna
16. Centrifugar 3 min a full speed (14 000 rpm)
17. Descartar o tubo de coleta
18. Colocar a coluna spin QIAmp num tubo de 1.5ml limpo e identificado
19. Adicionar à coluna 200 $\mu\text{L}$  de tampão AE e incubar 1 min
20. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 min
21. Para suspensões celulares de amostras para análise de quimerismos celulares, deve-se adicionar um volume de 25-50 $\mu\text{L}$  de tampão AE conforme o número de células inicial. Incubar 1min e centrifugar a 8000rpm por 1 min.
22. Determinar a concentração e pureza da amostra. Guardar a solução entre 2° a 8°C.

### **D) Extração de ADN de Amostras de Sangue Leucopénicas**

1. Aquecer o bloco térmico até atingir 56°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )
2. Adicionar ao tubo de 50 mL contendo o sangue total tampão de lise de eritrócitos RCBL até cerca de 1cm do topo
3. Agitar suavemente por inversão e incubar 10min à temperatura ambiente
4. Centrifugar durante 10 minutos a 1400 rpm à temperatura ambiente.
5. Rejeitar o sobrenadante
6. Ressuspender o pellet de células obtido em 1mL de tampão de lise RCBL
7. Repetir os passos 2, 3, 4 e 5 até obter um pellet de células limpo

8. Pipetar 20µL de Protease QIAGEN para um tubo de microcentrífuga de 2mL e adicionar o pellet de células em 200µL de RCBL
9. Adicionar 200µl de Tampão AL e misturar por vórtex durante 15seg
10. Incubar a 56°C durante 10 min
11. Centrifugar spin
12. Adicionar 200µL de Etanol (96-100%) e misturar por vórtex durante 15 seg.
13. Aplicar a mistura anterior na coluna spin QIAmp, com tubo de coleta de 2mL.
14. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
15. Descartar o tubo de coleta e substituir por um novo
16. Adicionar 500µL de Tampão AW1 à coluna
17. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
18. Descartar o tubo de colecta e substituir por um novo
19. Adicionar 500µL de Tampão AW2 à coluna.
20. Centrifugar 3 min a full speed (14 000 rpm).
21. Descartar o tubo de coleta
22. Colocar a coluna spin QIAmp num tubo de 1.5mL limpo e identificado.
23. Adicionar à coluna 100µL de tampão AE e incubar 1 min
24. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 min
25. Determinar a concentração e pureza da amostra.

#### **E) Extração de ADN de amostras em zaragatoa**

1. Aquecer o bloco térmico até atingir 56°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )
2. Num tubo de 2mL, deitar 500µL de PBS
3. Cortar a zaragatoa, colocar no tubo com o PBS e passar no vórtex
4. Adicionar 30µL de Protease QIAGEN e passar no vortex
5. Adicionar 500µL de Tampão AL e misturar por vórtex durante 15seg
6. Incubar a 56°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 10 min
7. Inverter a zaragatoa e centrifugar na velocidade máx por 1 min
8. Retirar a zaragatoa
9. Adicionar 500µL de Etanol (96-100%) e misturar por vórtex durante 15 seg.
10. Aplicar 500µL mistura anterior na coluna spin QIAmp, com tubo de coleta de 2mL.
11. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Descartar o líquido do tubo de coleta.
12. Aplicar o resto da mistura na coluna spin QIAmp, com tubo de coleta de 2mL.
13. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Descartar o tubo de coleta.
14. Adicionar 500µL de Tampão AW1 à coluna
15. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
16. Descartar o tubo de coleta e substituir por um novo

17. Adicionar 500µL de Tampão AW2 à coluna.
18. Centrifugar 3 min a full speed (14 000 rpm).
19. Descartar o tubo de coleta
20. Colocar a coluna spin QIAmp num tubo de 1.5mL limpo e identificado.
21. Adicionar à coluna 50µL de tampão AE incubar 1 min.
22. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 min
23. Passar mais 2x o volume do tampão AE.
24. Determinar a concentração e pureza da amostra
25. Guardar a solução entre 2° a 8°C.

**ATENÇÃO:**

- A solução de ADN só é aceite se apresentar uma concentração superior a 20ng/µl e uma relação A260/A280 superior a 1,4.

## **8.6. Anexo 6 – Procedimento de Monitorização do Quimerismo Celular no Transplante de Medula Óssea Alogénico**

(Adaptado do respetivo procedimento operativo interno do IPST)

### **MATERIAL**

- Tubos de centrifuga cónicos de 15mL com rolha
- Pipetas de Pasteur
- Tubos Eppendorf de 1,5mL
- Pipetas graduadas de 1mL, 2mL, 5mL e 25mL
- Pipetas de 20µL, 100µL e 1000µL e pontas apropriadas
- Autocolantes selantes de placas de PCR
- Sistema para incubação de microtubos Eppendorf
- Agitador vórtex
- Microcentrifuga
- Espectrofotometro Nanodrop
- Termociclador GeneAmp 6700
- Sequenciador automático ADN ABI 3130XL

### **REAGENTES**

- Sistema de extração ADN QIAmp ADN Blood Mini Kit
- Montype Chimera PCR Amplification Kit
- Água destilada
- Polímero de sequenciação POP7
- Tampão de sequenciação
- Hi-Di Formamida

### **AMOSTRA LABORATORIAL**

A análise pós-transplante é feita nas seguintes populações celulares:

- Leucócitos totais de sangue periférico
- Células de aspirado da medula óssea
- Populações celulares de sangue periférico e/ou aspirado de medula óssea, isoladas com base nos fenótipos de linhagens mieloide e linfoide e/ou subpopulações linfoides

As amostras recebidas devem cumprir as seguintes condições:

- Pré-transplante:
    - Doente: 5mL de sangue periférico em EDTA colhido até 24h antes do processamento
    - Dador: 5mL de sangue periférico em EDTA colhido até 24h antes do processamento
  - Pós-transplante:
    - 3 a 5 mL de sangue periférico colhido até 24h antes do processamento
    - 1 a 3 mL de aspirado de medúla óssea em EDTA
    - Suspensões sorteadas de subpopulações celulares com contagem maior ou igual a 100 000 eventos por população.
- NOTA: Se não for possível obter este numero de células, deve fazer-se o ajuste de eluente de forma a obter uma concentração de ADN maior ou igual a 10ng/μL.

## PROCEDIMENTO LABORATORIAL

### A) Preparação da Solução de ADN para PCR Multiplex dos marcadores STR

1. Iniciar o sistema Nanodrop 2000, ligando o computador e respetivo software
2. Entrar no modo de quantificação ADNds
3. Limpar o pedestal com água destilada e fazer o branco ao sistema com 2μL de tampão utilizado como eluente do ADN a analisar
4. Colocar 2μL de amostra e iniciar leitura
5. Obtém-se a concentração de ADN em ng/μL. A solução de ADN é aceite se apresentar uma relação A260/A280 superior a 1,4.
6. Preparar uma diluição da amostra de ADN em água destilada com uma concentração final de 1ng/μL

### B) Preparação da PCR Multiplex dos marcadores STR

1. Preparar a master mix PCR de acordo com a estequiometria e mantendo todos os reagentes em gelo em que o n é o nº de amostras a testar + CN + CP

Reagente	Volume para 1 reação	Volume para n reações
Reaction mix A <sup>+</sup>	3,1 μL	X n
Primer mix	1,6 μL	X n
Água destilada	10,1 μL	X n
Multi Taq2 ADN Polymerase	0,2 μL	X n

2. Em cada poço de amostras da placa de reação, pipetar 15µL de master mix e 1,5µL da diluição de ADN, obtendo-se um volume final em cada poceto de 16,5µL.  
NOTA: Em diluições de ADN pouco concentradas é possível ajustar o volume pipetado até 2,5µL de forma a obter 1,5ng de ADN.
3. No poço correspondente ao CN, pipetar 15µL de master mix e 1,5µL de água destilada
4. No poço correspondente ao CP, pipetar 15µL de master mix e 1,5µL CP fornecido pelo kit.
5. Homogeneizar a placa recorrendo a um agitador do tipo vórtex
6. Centrifugar placa a 1000g durante 1 minuto.

### C) Amplificação PCR Multiplex

1. Colocar as reações em placas PCR e iniciar o programa Mentype Chimera num termociclador GeneAmp 9700 com emulação 9600 ou ABI Proflex Duo:

94°C	4 min	30 ciclos
94°C	30 seg	
60°C	120 seg	
72°C	75 seg	
68°C	60 min	
10°C	hold	

2. Após terminar a amplificação PCR, diluir 1µL do produto de reação com 1000µL de água destilada
3. Numa placa compatível com o sequenciador carregar por poço 1µL da diluição anterior, 1µL de Allelic Ladder, 12µL de formamida e 0,2µL de ADN Standard BTO.
4. Desnaturar a 95°C por 2 min
5. Deixar arrefecer a 4°C

### D) Eletroforese Capilar

1. Iniciar o sistema ABI 3130XL ligando o computador e colocando o polímero POP7 no sistema de abastecimento.
2. Ligar o sequenciador.
3. Iniciar o ABI Data Collection
4. Fazer a lista de trabalho passando a identificação de amostras para o esquema de setup da placa de trabalho
5. Selecionar a pasta de destino dos ficheiros \*.FSA e carregar o protocolo Chimera\_POP7\_50
6. Iniciar a eletroforese capilar

### E) Interpretação dos resultados e calculo da frequência de quimerismo celular

1. Iniciar o software Genproof2 e proceder à normalização das condições da eletroforese capilar com a importação do respetivo eletroferograma através do menu “RAW Data Import”
2. Se a eletroforese capilar decorreu em condições normais:
  - deve-se obter a informação de que todos os picos do *allelic ladder* foram detetados dentro dos repetitivos *bins*
  - a qualidade da regreção linear deve ser  $> 0.9998$
3. Para iniciar um estudo de quimerismo, começar por estabelecer os genótipos do dador e do recetor antes do transplante colocando obrigatoriamente as datas as amostras anteriores à data do transplante:
  - Adicionar os ficheiros do dador e recetor pré-transplante
  - Avaliar os fragmentos detetados e colocados como alelos de referência
  - Fazer compilação dos genótipos de referência para o dador e recetor
4. Adicionar ao estudo os eletroferogramas obtidos para as amostras pós-transplante
5. Importar o *trace FSA* da amostra e aplicar a calibração das condições da eletroforese capilar obtidas com o *allelic ladder*
6. Clicar sobre a amostra com o botão direito do rato e seleccionar o meni “Electropherogram Representation”.  
Irá abrir o painel de marcadores STR com os diferentes picos para alelo. Devem ser revistos os picos em função dos genótipos de referencia do dador e do recetor
7. Retirar a propriedade “alelo de referência” e “homozigota” aos alelos pós-transplante
8. A partir do grupo de análises, clicar com o botão direito e seleccionar “Analyse Chemerism Raw Data”. Serão então comparados os genótipos para cada marcador STR, identificados os marcadores informativos e com seleção da análise da área sob o pico e estabelecida a relação entre alelos do dador e recetor. A frequência do quimerismo hematopoiético do dador é a média de todos os marcadores alélicos informativos
9. A partir do grupo de análises, clicar com o botão direito e seleccionar “Analyse Chemerism Trend”. É elaborado uma análise longitudinal do doente.
10. Elaborar o relatório laboratorial através do menu direito clicando com o botão direito sobre o resultado da análise > New report > Chemerism Trend Report
11. Escolher o formato de relatório RTF e editar para o doente e amostra em estudo
12. Converter o relatório para formato PDF

**ATENÇÃO:**

- A contagem das células deverá ser de pelo menos 200 unidades. No entanto, de acordo com as recomendações do fabricante do kit, as quantificações absolutas de células mais elevadas (500 a 1 000) proporcionam melhores resultados.
- Caso não seja possível o isolamento deste valor mínimo de 200 células, deverá constar no relatório a impossibilidade do estudo na população em questão.
- Através da utilização de um sequenciador genético ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, obtêm-se sinais com alturas de 1 000 a 5 000 RFU. Em sistemas heterozigóticos, as flutuações nas alturas dos sinais não poderão ser superiores a 30% relativamente aos valores de referência.
- No intervalo de análise não podem ser observados sinais não específicos com valores  $\geq 50$  RFU (linha de base) associados aos valores em branco (NTC)
- Como critério de aceitação foi definido perfis completos com valores  $\geq 200$  RFU. Caso se obtenham valores inferiores, primeiramente deverá ser repetida a eletroforese e caso não seja possível resultado, deve-se voltar a avaliar as condições da PCR e repetir a mesma
- O limite de deteção foi definido como 200pg de ADN genómico, utilizando uma quantidade ótima de ADN de 0,2 a 1,0 ng por reação

## **8.7. Anexo 7 – Procedimento para aceitação de Amostras de Sangue (Adaptado do respetivo procedimento operativo interno do IPST)**

### **CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO:**

#### **1. Identificação das amostras**

- Para serem inscritas no sistema informático do laboratório, as amostras vindas do exterior devem estar identificadas com 1) a data de colheita e 2) o nome e/ou nº de identificação única do utente.
- Para as amostras serem aceites em cada secção laboratorial, devem estar identificadas com 1) a etiqueta primária.
- Amostras referenciadas para estudo de dador cadáver devem ser recebidas com 1) a data de colheita, 2) iniciais do nome, 3) nome do hospital de colheita e 4) impresso de estudo do dador falecido de órgãos para transplante devidamente preenchido.

#### **2. Condições das amostras**

Para serem aceites no laboratório, devem ser cumpridos os seguintes requisitos:

- As amostras de sangue colhidas com anticoagulante não devem ter coágulos;
- As amostras de sangue colhidas em tubo Seco (9mL) devem estar coaguladas;
- As amostras deverão ter volume suficiente para a realização dos testes (ver ponto 4);
- As amostras não devem apresentar sinais de congelação;
- As amostras não devem apresentar sinais de hemólise.

Caso estes requisitos não sejam cumpridos, deve-se consultar os laboratórios antes de fazer a inscrição da amostra.

#### **3. Conservação das amostras**

As amostras devem ser conservadas à temperatura ambiente.

O tempo máximo de aceitação de amostras entre a colheita e a chegada ao laboratório é de 48h. Em situações excecionais, o tempo de aceitação poderá ser estendido para lá das 48h, mas antes de fazer a inscrição no sistema informático, deve-se consultar o laboratório.

#### 4. Tubos e Volumes colhidos

##### a. Candidatos a transplante de medula

2 tubos EDTA (6mL)	Genética
1 tubo Seco (9mL)	Virologia
1 tubo EDTA (6mL)	Serologia

##### Tipagem confirmatória

2 tubos EDTA (6mL)	Genética
--------------------	----------

##### b. Familiar de candidatos a transplante de medula (aparentados)

2 tubos EDTA (6mL)	Genética
1 tubo EDTA (6mL)	Serologia
1 tubo Seco (9mL)	Virologia

##### Tipagem confirmatória

2 tubos EDTA (6mL)	Genética
--------------------	----------

##### c. Candidato transplante de órgão sólido – 1ª vez

1 tubo EDTA (6mL)	Genética
1 tubo EDTA (6mL)	Serologia
1 tubo Seco (9mL)	Virologia
1 tubo Heparina Sódio (9mL)	Serologia (se candidato a transplante renal)

##### Estudo confirmatório (48h)

2 tubos EDTA (6mL)	Genética
1 tubo Seco (9mL)	Virologia

##### d. Dador vivo de órgão sólido

2 tubos EDTA (6mL)	Genética
1 tubo EDTA (6mL)	Serologia
1 tubo Heparina Sódio (9mL)	Serologia
1 tubo Heparina Sódio (9mL)	Citometria
1 tubo Seco (9mL)	Virologia

**Estudo confirmatório (48h)**

2 tubos EDTA (6mL)	Genética	
1 tubo Heparina Sódio (9mL)	Serologia	
1 tubo Heparina Sódio (9mL)	Citometria	
1 tubo Seco (9mL)	Virologia	(Caso seja requisitado)

**e. Rotina candidato a transplante de órgão sólido**

1 tubo Seco (9mL)	Virologia
-------------------	-----------

\* trimestral – candidato a transplante renal

\* semestral – candidato a transplante de pulmão, coração ou pâncreas

**f. “CEDACE” – 1ª vez**

1 tubo EDTA (6mL)	Genética
-------------------	----------

**g. “CEDACE” Ativação**

2 tubos EDTA (6mL)	Genética
1 tubo EDTA (6mL)	Serologia
1 tubo Seco (9mL)	Virologia

**h. “CEDACE” Envio de amostra**

1 tubo EDTA (6mL)	Serologia
1 tubo Seco (9mL)	Virologia

+ Tubos para envio conforme pedido do Registo Internacional

**REJEIÇÃO DAS AMOSTRAS:**

As amostras rejeitadas devem ser registadas no Registo de Amostras sem Critérios de Aceitação e deve-se solicitar uma nova amostra. Deve ser ainda preenchido um registo de ocorrência.

## 8.8. Anexo 8 – Procedimento da Genotipagem HLA por NGS

(Adaptado do respetivo procedimento operativo interno do IPST)

### MATERIAL

- Micropipetas de 10 $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 300 $\mu$ L e 1000 $\mu$ L e pontas apropriadas com filtro
- Micropipetas multicanal de 10 $\mu$ L, 100 $\mu$ L e 300 $\mu$ L e pontas apropriadas com filtro
- Pipeta de repetição e pontas apropriadas para 16 $\mu$ L
- Pipetas de Pasteur de 3mL
- Placa PCR de 96 poços de 0,2mL e seladores autocolantes
- Tubos PCR de 0,2mL
- Strips PCR tube optical
- Placas de polipropeno de 96 poços Thermo Scientific Nunc MicroWell
- Reservatórios de reagentes compatíveis com pipeta multicanal
- Tubos ADN LoBlind de 2mL
- Suportes de tubos 2mL
- Ion S5 Ext Chef Supplies
- Ion 530 Chip Kit
- Centrifuga de Bancada com suportes para placas
- Fluorimetro Qubit Flex
- Termociclador GeneAmp 9700
- Magneto com Suporte de 96 poços
- 2mL Tube Magnet Stand
- Vortex

### REAGENTES

- AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit
  - Primer Mix
  - Exon 1 Primer Mix
  - dNTPs
  - Buffer
  - LR Polymerase
  - Sample Plate 2X48
  - Univ Barcode P1
  - Library Primer Mix
  - Library Amp Mix
  - Barcoding Buffer

- Stop Solution
- Paramagnetic Beads
- ADN Suspension Buffer
- Etanol absoluto
- Água destilada livre de nucleases
- Qubit dsADN HS Assay Kit
- Ion S5 Ext Chef Reagents
- Ion S5 Ext Chef Solutions
- Ion S5 Ext Sequencing Reagents
- Ion S5 Ext Sequencing Solutions

### **AMOSTRA LABORATORIAL**

48 amostras de ADN genómico humano com concentração entre 20 e 50 ng/μL e relação A260/A280 entre 1,6 e 1,9.

### **PROCEDIMENTO LABORATORIAL**

#### **A) Criação da Lista de Trabalho**

1. Na base de dados produzir uma lista de trabalho com as amostras com status para genotipagem HLA
2. A partir da lista anterior preencher a folha de trabalho e gravar na respetiva pasta com a identificação da corrida
3. Preencher a identificação das amostras e a posição mapeada no software “TypeStream Visual, NGS Calculator AllType FastPlex ION” ou na folha de cálculo devidamente preparada para o efeito. Fazer a rastreabilidade de todos os reagentes específicos e acessórios usados na respetiva corrida.
4. Se os dados forem preenchidos em folha de cálculo, fazer uma cópia da mesma em formato .CSV e guardar na pasta com a identificação da corrida

#### **B) Amplificação PCR-multiplex Long Range (área pré-PCR)**

##### Amostras ADN

Numa caixa micronic dispõem-se pela ordem das listas de trabalho 48 amostras de ADN genómico humano com concentração entre 20-40 ng/μL e relação A260/A280 entre 1,5 e 2,2.

## Reagentes

Descongelar os reagentes AllType Primer Mix, dNTP e Buffer (Kit FASTplex box 1/2) à temperatura ambiente. Se houver precipitado no AllTyper Buffer, aquecê-lo até à temperatura de 37°C. Agitar brevemente no vortex e centrifugar estes reagentes.

A Long Range Polímerase só é retirada do frio quando necessário. Nunca vortexar. Centrifugar brevemente antes de usar.

Retirar do frio o frasco a uso de H<sub>2</sub>O Ambion (Nuclease free water)

## Material e Equipamentos

- ✓ Termociclador GeneAmp 9700
- ✓ Fluorímetro Qubit
- ✓ ½ placa PCR identificada com: *NGS dia-mês-ano AMP*
- ✓ Pipeta multicanal 10 µL e pontas
- ✓ Pipetas monocanal 1000, 200 e 100 µL e respectivas pontas
- ✓ Vortex
- ✓ Microcentrifuga
- ✓ Centrifuga para placas (centrifugar brevemente = 1500g 1 min)

## Procedimento

1. Para a ½ placa PCR identificada pipetar 4µL de cada amostra de ADN.
2. Preparar a seguinte Master Mix num tubo ADN LoBind para cada reacção
  - H<sub>2</sub>O Ambion – 190µL
  - AllType™ Buffer – 200µL
  - AllType dNTPs - 80µL
  - AllType FASTplex™ 11 Loci Primer Mix – 250µL
  - AllType Fastplex 11 Loci Exon 1 Primer Mix – 48 µL
3. Agitar a Master Mix brevemente no vórtex antes de juntar a polimerase.
4. Retirar do frio, centrifugar brevemente e juntar á Master Mix anterior: AllType Polymerase - 40µL
5. Misturar com pipeta 15-20 vezes
6. Distribuir 16µL por poço, selar a placa e centrifugar brevemente
7. Cobrir a placa com uma borracha própria e levar ao termociclador previamente aquecido em modo de emulação 9600, no programa “alltype 11pcr/ngs” (duração ≈2h30min)

Procedimento PCR de amplificação			
Passos	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
1	94°C	2 min	1
2	98°C 69°C	10 seg 3 min	22
3	98°C 60°C	10 seg 3 min	8
5	4°C	Hold	1

8. No final do PCR deve proceder-se imediatamente à purificação dos amplicons

### C) Purificação dos amplicons, quantificação e normalização (área pós-PCR)

#### Amostras

- ADNs amplificados em placa PCR identificada *NGS dia-mês-ano AMP*

#### Reagentes

- FastPlex Paramagnetic Beads
- FastPlex ADN Suspension Buffer (Kit FASTplex box 2/2)
- Qubit dsADN HS Assay Kit

Os reagentes devem estabilizar à temperatura ambiente 30 min.

Preparar uma solução de 20mL de etanol grau de biologia molecular a 80% com H<sub>2</sub>O Ambion(Nuclease free water)

#### Material e Equipamentos

- 1 placa polipropileno Thermo Scientific Nunc MicroWell com 48 poços livres
- Magneto de suporte de placas
- Para a ½ placa PCR identificada *NGS dia-mês-ano AmplicPurif*
- Para a ½ placa PCR identificada *NGS dia-mês-ano AmplicNormal*
- Seladores autocolantes
- Tiras 8 tubos PCR
- Pipetas multicanal 300, 100 e 10µL e pontas
- Reservatórios de reagentes
- Fluorímetro Qubit Flex
- Vortex
- Centrífuga para placas (centrifugar brevemente = 1500g 1 min)

### 1) Procedimento de purificação de amplicons primários

1. Ressuspender 30 segundos no vortex o reagente FastPlex paramagnetic Beads. Verter um volume suficiente num reservatório de reagente.
2. Com pipeta multicanal, pipetar 12µL do reagente FasstPlex Paramagnetic Beads para cada um dos 48 poços da placa Nunc MicroWell.
3. Transferir todo o produto amplificado (≈20µL) para os poços correspondentes da placa. Misturar as amostras com o reagente pipetando lentamente para cima e para baixo 10 vezes com cuidado para evitar formação de bolhas.
4. Incubar à temperatura ambiente por 5min.
5. Colocar a placa no magneto de suporte de placas por cerca de 3 minutos ou até que a solução fique transparente.
6. Utilizando uma pipeta multicanal configurada para 28µL, eliminar o sobrenadante de cada poço sem perturbar o *pellet* de esferas que se formou junto ao magneto.  
NOTA: As esferas têm os amplicons por isso deve-se evitar a sua perda.
7. Com a placa no magneto, dispensar 100µL de uma solução etanol 80% em cada poço
8. Deslocar a placa entre os poços do magneto de suporte, posicionando-a sobre os poços em vez de dentro deles, num total de 5 vezes, para enxaguar as esferas. Ao terminar, deixar a placa na posição normal de retenção até que o anel de esferas se volte a formar e a solução fique transparente.
9. Incubar à temperatura ambiente por 30 segundos
10. Com pipeta multicanal configurada para 110µL, remover e eliminar o sobrenadante de cada poço sem perturbar o *pellet* de esferas que se formou junto ao magneto.
11. Repetir os passos 7 a 10 para uma segunda lavagem com 80% de etanol
12. Mantendo a placa sobre o magneto, retirar cuidadosamente todos os resíduos de etanol. Se necessário recorrer a pipeta multicanal de 20µL.
13. Deixar secar as esferas ao ar à temperatura ambiente cerca de 2 minutos (máx 3 min)  
NOTA: Não deixar secar demais pois dificulta a ressuspensão das esferas e reduz a recuperação da amostra
14. Mantendo a placa no magneto, acrescentar 30µL de FASTplex ADN Suspension Buffer a cada poço.
15. Remover a placa e misturar lentamente por pipetagem 10x, evitando a formação de bolhas.
16. Incubar à temperatura ambiente por 3 minutos
17. Pôr a placa sobre o magneto por pelo menos 3 minutos.
18. Com uma pipeta multicanal para 40µL e sem perturbar as esferas transferir todo o sobrenadante para a ½ placa PCR identificada *NGS dia-mês-ano AmplicPurif*
19. Selar a placa

## 2) Procedimento de Quantificação dos amplicons primários

1. Se necessário, preparar 2 strips PCR tube optical para os standartrs
  - 10 $\mu$ L de STD1 em cada tubo da strip 1 – 0 ng/ $\mu$ L
  - 10 $\mu$ L de STD2 em cada tubo da strip2 – 10 ng/ $\mu$ L
  - 190 $\mu$ L Qubit dsADN HS Buffer em cada tubo
2. Preparar 8 strips PCR tube optical para as amostras
  - 2 $\mu$ L de cada amplicon
  - 198 $\mu$ L Qubit dsADN HS Buffer em cada tubo
3. Agitar brevemente no vórtex ou por pipetagem
4. Incubar 2 minutos ao abrigo da luz.
5. No Fluorímetro Qubit Flex, preparar a leitura no módulo 1x dsADN HS
  - Ler primeiro o STD1, depois o STD2 e por fim as amostras
  - Exportar a leitura para um ficheiro excel
  - Requantificar as amostras que ultrapassem o limite superior de deteção de 100 ng/ $\mu$ L, utilizando uma diluição 2x. Ajustar as concentrações a esta diluição.
  - Para amostras abaixo do limite inferior de deteção de < 0,5ng/ $\mu$ L, re-amplificar a amostra, purificar e quantificar de acordo com as instruções anteriores.
6. Exportar as leituras via Network Drive, para a pasta previamente definida

## 3) Procedimento de Normalização dos amplicons

1. Na folha de cálculo AllType Ion FASTplex Ion NGS 11 Loci Kit – 48 Calculation Tool, abrir o separador "Amplicon Dilution" e na coluna "Amplicon Conc" preencher a respectiva concentração de cada amostra com valores obtido do Qubit Flex.
2. A tabela irá apresentar os factores de diluição. Por defeito: 2 $\mu$ L de amplicom + volume de FastPlex ADN suspension ( $\mu$ L)
3. As celulas sinalizam como Low ou High as concentrações fora do range e o ajustam automaticamente os volumes para que a concentração fique otimizada
4. Numa nova ½ placa PCR identificada com *NGS dia-mês-ano AmplicNormal* colocar nos respectivos poços os volumes de ADN amplificado e FASTplex ADN Suspension Buffer indicados.
5. Misturar bem por pipetagem
6. Selar a placa.

### **C) Indexação da Biblioteca com os Sample BarCodes e Universal Barcodes (manipulação em área Pós-PCR)**

#### Amostras

ADN's amplificados, purificados e normalizados, em placa PCR identificada – *NGS dia-mês-ano AmplicNormal*

#### Reagentes

- FASTplex Sample Plate 48 (Kit FASTplex box1/2) - descongelar, centrifgar levemente e manter em gelo
- FASTplex Univ Barcode P1 (Kit FASTplex box1/2) - descongelar, centrifgar levemente e manter em gelo
- FASTplex Barcoding Buffer (Kit FASTplex box 1/2) – Tirar do frio, deixar estabilizar à temperatura ambiente 30 minutos e ressuspender bem.
- FASTplex Stop Solution(Kit FASTplex box 1/2) – Tirar do frio, deixar estabilizar à temperatura ambiente 30 minutos e ressuspender bem.
- FASTplex Paramagnetic Beads (Kit FASTplex box 1/2) – Tirar do frio, deixar estabilizar à temperatura ambiente 30 minutos e ressuspender bem.
- FASTplex ADN Suspension Buffer (Kit FASTplex box 1/2) – Tirar do frio e deixar estabilizar à temperatura ambiente.
- Etanol grau de biologia molecular a 80% com H2O Ambion (previamente preparado)

#### Material e Equipamentos

- Termociclador GeneAmp 9700 – manter 2 tiras de suporte nos extremos do bloco para evitar deformações por pressão no tubo da amostra.
- Tiras 8 tubos PCR 200µL
- Pipetas multicanal 300, 100 e 10µL e pontas
- Pipetas monocanal 1000, 200 e 100µL e respectivas pontas
- ½ placa PCR identificada com *NGS dia-mês-ano SampleBarc*
- Seladores autocolantes
- Segmentos de placa PCR (3 poços/segmento)
- Tubos Eppendorf LoBind 2ml
- Suporte de tubos 2 ml
- Separador magnético para tubos 2 ml
- Centrifuga para placas (centrifugar brevemente = 1500g 1 min)
- Vortex

### 1) Procedimento na Indexação com os Sample BarCodes

1. Preparar 2 tiras de 8 tubos de PCR com os volumes das seguintes soluções:
  - 1 tira identificada B - 90µL FASTplex Barcoding Buffer por tubo
  - 1 tira identificada S - 150µL FASTplex Stop Solution por tubo
2. Para a ½ placa PCR identificada com *NGS dia-mês-ano SampleBarc*, pipetar com pipeta multicanal:
  - 16µL de cada Sample Barcode a partir da placa FASTplex Sample Plate 48
  - 8µL de cada amplicon a partir da placa *AmplicNormal*
  - 12µL FASTplex Barcoding Buffer a partir da tira de 8 tubos B
1. Misturar devagar por pipetagem, selar a placa com selador autocolante e centrifugar brevemente 1 minuto a 1500g
2. Cobrir a placa com uma borracha própria e levar ao termociclador previamente aquecido em modo emulação 9600, programa TAG – BarcodeFPlex (55°C - 15 min; 25°C Hold)
3. Para a mesma placa, pipetar com pipeta multicanal: 18µL FASTplex Stop Solution a partir da tira de 8 tubos.
4. Selar com novo selador autocolante
5. Cobrir a placa com uma borracha própria e levar ao termociclador previamente aquecido, no programa STOP BarcodeFPlex (68°C - 10 min; 25°C Hold)

### 2) Procedimento na Preparação do Pooling e Purificação

1. Para uma tira de 8 tubos PCR pipetar com pipeta multicanal 30µL de cada reacção de SB de cada coluna da placa num pool primário de 6 amostras com 180 µL (pool parcial)
2. Num tubo 2mL low bind juntar 150µL de cada um dos 8 tubos de PCR perfazendo um volume final de 1200µL (pool total)
3. Retirar 864µL do pool total de amostras para outro tubo de 2mL low bind e adicionar 864µL de FASTplex Paramagnetic Beads bem ressuspensas, misturar bem por pipetagem.
4. Incubar à temperatura ambiente por 5 minutos para a total recuperação do ADN
5. Transferir o tubo para o suporte magnético e incubar por 5 min deixando o sobrenadante límpido
6. Com uma pipeta retirar e descartar o sobrenadante sem perturbar o *pellet* de esferas
7. Mantendo o tubo no suporte magnético, adicionar 2ml de etanol 80%.
8. Após 30 seg, retirar o sobrenadante sem perturbar o *pellet*.
9. Repetir os passos 7 e 8 para um total de 2 lavagens com etanol.
10. Mantendo o tubo no separador magnético, retirar cuidadosamente todos os resíduos de etanol. Se necessário recorrer a pipeta

11. Deixar secar as esferas à temperatura ambiente por no máximo 2min
12. Retirar o tubo do suporte magnético, adicionar 50µL de FASTplex ADN Suspension Buffer, ressuspendendo muito bem o pellet
13. Incubar à temperatura ambiente por 5 min
14. Pôr a placa novamente no separador magnético aproximadamente 2 min
15. Colher para um poço do segmento de placa PCR 48µL do eluado que constitui o pool purificado de biblioteca de fragmentos

### 3) Procedimento na Indexação da Biblioteca pool com o Universal BarCode e Purificação

1. No poço do segmento de placa de PCR preparar:
  - 48µL do pool purificado da biblioteca de fragmentos
  - 10µL de FASTplex Univ Barcode P1
  - 29µL de FASTplex Barcoding Buffer
2. Misturar devagar por pipetagem, selar a placa com selador autocolante
3. Centrifugar brevemente 1 minuto a 1500g
4. Cobrir a placa com uma borracha própria e levar ao termociclador previamente aquecido em modo emulação 9600, no programa TAG-BarcodeFPlex (55°C - 15min; 25°C Hold)
5. No final pipetar 44µL FASTplex Stop Solution
6. Misturar devagar por pipetagem, selar a placa com novo selador autocolante
7. Correr o programa STOP BarcodeFPlex (68°C - 10 min; 25°C Hold)
8. No final da reação, transferir o volume total de reação, aproximadamente 120µL para um tubo 2mL low bind e 120µL de beads paramagnéticas bem ressuspendas. Misturar bem
9. Incubar 5 minutos à temperatura ambiente, para se dar a ligação ADN
10. Transferir o tubo para o suporte magnético e incubar por 3 minutos deixando o sobrenadante límpido
11. Com uma pipeta retirar e descartar o sobrenadante sem perturbar o *pellet* de esferas
12. Mantendo o tubo no suporte magnético, adicionar 1ml de etanol 80%.
13. Após 30 seg retirar o sobrenadante sem perturbar o *pellet*
14. Repetir os passos 12 e 13 para um total de 2 lavagens com etanol
15. Mantendo o tubo no separador magnético, retirar cuidadosamente todos os resíduos de etanol. Se necessário recorrer a pipeta
16. Deixar secar as esferas à temperatura ambiente por no máximo 2 minutos.
17. Retirar o tubo do suporte magnético, adicionar 13µL de FASTplex ADN Suspension Buffer e ressuspende bem o *pellet*
18. Incubar à temperatura ambiente por 5 min

19. Pôr a placa novamente no separador magnético aproximadamente 2min
20. Colher para um poço do segmento de placa PCR 10µL do eluado que constitui o pool purificado de biblioteca de fragmentos

#### **D) Amplificação secundária da biblioteca pool, purificação e quantificação (manipulação em área Pós-PCR)**

##### Amostras

Pool indexado e purificado da biblioteca de fragmentos no poço do segmento de placa PCR

##### Reagentes

- FASTplex Library Amp Mix (Kit FASTplex box1/2) - descongelar, centrifugar levemente e manter em gelo
- FASTplex Library Primer Mix (Kit FASTplex box1/2) - descongelar, centrifugar levemente e manter em gelo
- FASTplex Paramagnetic Beads (Kit FASTplex box 1/2) - Deixar estabilizar à temperatura ambiente 30 min e ressuspender bem.
- FASTplex ADN Suspension Buffer(Kit FASTplex box 1/2) - Deixar estabilizar à temperatura ambiente.
- Qubit dsADN HS Assay Kit – Deixar estabilizar à temperatura ambiente durante 30 minutos
- Etanol grau de biologia molecular a 80% com H2O Ambion(previamente preparado)

##### Material e Equipamentos

- GeneAmp 9700 – manter 2 tiras de suporte nos extremos do bloco para evitar deformações por pressão no tubo da amostra
- Tiras 8 tubos PCR 200µL
- Pipetas monocal 1000, 200 e 100µL e respectivas pontas
- Seladores autocolantes
- Segmentos de placa PCR(3 poços/segmento)
- Tubos Eppendorf LoBind de 2ml
- Suporte de tubos 2 ml
- Separador magnético para tubos 2 ml
- Qubit Fluorometer ou equivalente
- Centrifuga para placas
- Vortex

### 1) Procedimento na Amplificação Secundária da Biblioteca de Fragmentos

1. No poço do segmento de placa PCR juntar:
  - 10µL do Pool Indexado e purificado da biblioteca de fragmentos
  - 75µL FASTplex Library Amp Mix
  - 15µL FASTplex Library Primer Mix
2. Misturar devagar por pipetagem, selar a placa com selador autocolante
3. Cobrir a placa com uma borracha própria e levar ao termociclador previamente aquecido em modo emulação 9600, no programa second-pcr ngsfp, com duração aproximada de 45 min.

<b>Procedimento PCR de amplificação</b>			
<b>Passos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Nº de Ciclos</b>
1	72°C	10 min	1
2	98°C	3 min	1
3	98°C 66°C 72°C	15 seg 30 seg 1 min	9
4	72°C	5 min	1
5	4°C	Hold	1

4. Após o PCR secundário centrifugar brevemente por 1 minuto a 1500g
5. Transferir 95µL da biblioteca para um tubo low bind de 2mL e proceder à seleção e purificação dos fragmentos.

### 2) Procedimento na dupla selecção de fragmentos relativo à dimensão e purificação

1. No tubo com os 95µL da biblioteca, adicionar 305µL de FASTplex ADN Suspension Buffer. É importante que o volume final seja de 400µL
2. Adicionar 240µL de FASTplex Paramagnetic Beads bem ressuspendidas. Misturar bem
3. Incubar 5 minutos à temperatura ambiente, para se dar a ligação do ADN
4. Colocar o tubo no suporte magnético e incubar por cerca de 3 min
5. Transferir para um novo tubo low bind 2ml, 580µL do sobrenadante sem perturbar o pellet
6. Adicionar ao sobrenadante 65,5µL de FASTplex Paramagnetic Beads. Ressuspender bem
7. Incubar 5 min à temperatura ambiente para se dar a ligação do ADN

8. Transferir o tubo para o suporte magnético e incubar por cerca de 3 min deixando o sobrenadante límpido
9. Com uma pipeta ajustada a 600µL retirar e descartar o sobrenadante sem perturbar o *pellet* de esferas
10. Mantendo o tubo no suporte magnético, adicionar 1ml de etanol 80%.
11. Após 30 seg, retirar o sobrenadante sem perturbar o *pellet*
12. Repetir os passos 10 e 11 para um total de 2 lavagens com etanol
13. Mantendo o tubo no suporte magnético, retirar cuidadosamente todos os resíduos de etanol. Se necessário recorrer a pipeta
14. Deixar secar as esferas à temperatura ambiente durante 2 minutos no máximo
15. Retirar o tubo do suporte magnético, adicionar 35µL de FASTplex ADN Suspension Buffer. Ressuspender bem o *pellet*
16. Incubar à temperatura ambiente por 5min
17. Pôr a placa novamente no suporte magnético por aproximadamente 2 min
18. Colher para um poço do segmento de placa PCR 33µL do eluado que constitui o pool purificado de biblioteca de fragmento indexados e seleccionados

## **E) Procedimento na quantificação e normalização da biblioteca para amplificação isotérmica no Ion Chef**

### Amostra

ADN's da bibliotece pool amplificados, purificados e normalizados

### Reagentes

- Reagentes IonChef – Retirar do congelador
- Módulo de reagentes sequenciação Ion S5 – retirar do congelador e deixar a 4°C até utilização
- Qubit dsADN HS Buffer
- FASTplex ADN Suspension Buffer

### Material e Equipamentos

- IonChef
- Qubit Fex
- Strips PCR tube optical
- Vórtex
- Pipetas de 10µL, 200µL e respetivas pontas

## Procedimento

\* O processo seguinte descreve a quantificação e preparação final da biblioteca para uma concentração final de 0,045ng/μL. Como esta concentração está abaixo do intervalo de deteção do Qubit assay, é feita uma diluição intermédia 10x da biblioteca purificada e só depois a solução final.

1. Se necessário, preparar 2 strips PCR tube optical para os standartars
  - 10μL de STD1 em cada tubo da strip 1 – 0 ng/μL
  - 10μL de STD2 em cada tubo da strip2 – 10 ng/μL
  - 190μL Qubit dsADN HS Buffer em cada tubo
2. Preparar em triplicado a primeira quantificação da biblioteca purificada
  - 2μL de amostra
  - 198μL Qubit dsADN HS Buffer em cada tubo
3. Agitar brevemente no vórtex ou por pipetagem
4. Incubar 2 minutos ao abrigo da luz
5. Centrifugar brevemente por 1 minuto a 1500g
6. No Fluorímetro Qubit Flex, proceder à leitura das tiras no modo Sample 2μL e unidades em ng/μL e exportar os resultados para um ficheiro excel
7. Na ferramenta de cálculo “AllType Ion FASTplex Ion NGS 11 Loci Kit. 48 Calculation Tool” inserir a média da quantificação dos 3 duplicados, a partir da qual a ferramenta calculará os volumes para preparar a concentração intermédia da biblioteca (0,45ng/μL)
8. Juntar num tubo 0,2mL identificado como LibraryPool-10x, o volume da amostra e de FASTplex ADN Suspension Buffer para a concentração intermédia
9. Preparar em triplicado a primeira quantificação da biblioteca purificada
  - 195μL de Qubit dsADN HS Buffer
  - 5μL de amostra
10. A biblioteca deve ter agora uma concentração próxima de 0,45ng/μL. Na ferramenta de cálculo inserir a média dos triplicados no respetivo lugar.
11. Juntar num tubo 0,2mL identificado como LibraryPool-chef o volume de amostra e FASTplex ADN Suspension Buffer para a preparação final de 100μL da biblioteca à concentração final de 0,045ng/μL
12. Carregar 50μL da biblioteca de fragmentos na diluição final de 0,045ng/μL no tubo de amostra (tubo vazio com o QR code) presente na placa de reagentes do IonChef

13. Avançar para a configuração do Instrumento IonChef onde é realizada automaticamente a amplificação isotérmica em emulsão e o carregamento do Chip IonTorrent 530.

## **F) Programação do plano de trabalho no S5 Torrent Server e configuração do Sistema IonChef e Ion GeneStudio S5 Plus**

### Reagentes

- Ion S5 Chef Reagents
- Ion S5 Chef Solutions
- Ion S5 EXT Sequencing Reagents
- Ion S5 EXT Sequencing Solutions

### Material e equipamentos

- Micropipeta 10µL e pontas apropriadas com filtro
- Ion S5 Chef Supplies
- Ion 530 Chip Kit

### 1) Procedimento de programação do plano de trabalho no S5 Torrent Server VM

1. Criar plano de trabalho a partir do template de sequenciação já previamente criado e gravado com o nome da sessão, importando a lista de amostras em formato \*.csv dentro da pasta comum da sessão. No template de sequenciação está estabelecido o mapa de amostras e respetivo barcode.

### 2) Procedimento de configuração do sistema IonChef

1. Carregar o IonChef com os consumíveis, os reagentes previamente descongelados e soluções.
2. Colocar o chip 530 no copo da centrifuga 9
3. Retirar as tampas roscadas dos tubos de reagentes da placa 5, colocar o tubo do QR code com a biblioteca de fragmentos final na devida posição e iniciar o IonChef
4. Selecionar sequencialmente no ecrã do Ion Chef “Set up run” → “Quick start” → “Next” → “Start check”
5. Importar o plano previamente configurado no S5 Torrent Server VM e terminar a horas programadas para transferir o chip para o Ion Gene Studio S5 Plus
6. Quando o processo tiver terminado e o chip carregado, desmontar e descartar os componentes consumíveis do Ion Chef
7. Colocar a placa de pontas vazia na posição 4 para utilização na próxima corrida~

8. Retirar o chip
9. Com uma pipeta, retirar o excesso de líquido existente nas portas e proceder imediatamente para o sequenciador Ion GeneStudio S5 que deve ter o pre-run já feito

### 3) Procedimento de configuração do sistema Ion GeneStudio S5 Plus

1. Antes da finalização do IonChef e do carregamento do IonChip, inicializar o Ion S5 GeneStudio Plus através do comando Initialize no menu principal do ecrã. As portas do instrumento e o clip do chip são destrancadas.
2. O processo usa um IonChip usado devidamente colocado.
3. Colocar nas devidas posições:
  - o Ion S5 ExT Sequencing Reagents cartridge (previamente descongelado)
  - o Ion S5 ExT Wash Solution
  - o IonS5 ExT Cleaning Solution, se necessário (cada contentor dá para 4 runs)
4. Esvaziar e recolocar o contentor de waste
5. Quando a inicialização estiver completa, no menu principal carregar em Next para voltar ao menu principal
6. No menu principal carregar em Run. As portas destrancam, incluindo as do chip
7. Retirar o chip já usado e colocar o novo Ion Chip a analisar
8. Fechar a porta e carregar Next
9. Selecionar o plano previamente configurado no S5 Torrent Server VM
10. Proceder à corrida de sequenciação anteriormente programada através dos comandos no ecrã

### **G) Validação dos resultados**

Após cada corrida é gerado no software Torrent Suite um relatório onde são avaliados vários parâmetros de controlo de qualidade. O desvio de um deles não indica necessariamente por si só um erro na sequência e/ou impossibilidade de resultado na amostra.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores Ótimos</b>
Output / Total Bases	> 4G
Key Signal	> 50
ISP Loading	> 80
Total Reads	> 13M
Enrichment	> 95%
Clonal	> 60%
Low Quality Reads	< 40%
Read Length (Mean / Median / Mode)	> 270 / > 270 / ≈ 250-300

**Output / Total Bases** – Output total de bases da corrida utilizadas

**Key Signal** – Define a eficiência da amplificação isotérmica

**ISP Loading** – Define a percentagem de poços ocupados por ISP (Ion Sphere Particles) no chip

**Total Reads** – Número de leituras importadas para o software TypeStream Visual após filtragem de todas as leituras não utilizáveis. Este valor depende do número de amostras incluídas na corrida

**Enrichment** – Quantifica as ISP ligadas a ADN

**Clonal** – Quantifica as ISP ligadas a um único molde de ADN

**Low Quality Reads** – Leituras excluídas por baixa qualidade devido a múltiplos fatores

**Read Length** – Apresenta a distribuição e quantidade relativa do tamanho das leituras obtidas. Leituras mais longas levam a maior especificidade, melhor cobertura e capacidade de fase.

## **H) Resultado e análise**

1. A análise é feita no software TypeStream Visual em Regulatory Mode IVD
2. Abrindo TSV > Automation > Star Monitoring logo que a sequenciação esteja terminada, começa a análise da biblioteca de fragmentos
3. Cada resultado é revisto e confirmado por um utilizador
4. Casos de mismatch em regiões codificantes, que não estejam contempladas na lista de artefactos ou resultados que suscitem dúvidas devem ser analisados por outro utilizador
5. Depois da análise completa é produzido e exportado o relatório final

## **8.9. Anexo 9 – Procedimento da Tipagem Eritrocitária AB0/Rh em Card**

(Adaptado do respetivo procedimento operativo interno do IPST)

### **MATERIAL**

- Pipetas de 10 $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 200 $\mu$ L e 1000 $\mu$ L
- Pontas descartáveis para as pipetas
- Tubos de diluição de 3mL com fundo em “U”
- Centrifuga DG Spin Grifols para cartões de gel
- Centrifuga Immufuge Dade
- Luvas

### **REAGENTES**

- Diluente DG Gel Sol. Grifols
- Reagente para eritrócitos (A/B) para prova reversa de grupo (Serigrup A/B) Grifols
- Cartão DG Gel AB0/Rh (2D) Grifols

### **AMOSTRA LABORATORIAL**

Sangue periférico colhido com anticoagulante (EDTA, ACD ou heparina sódica) há menos de 48h e sem sinais de hemólise, lipémia ou contaminação bacteriana.

### **PROCEDIMENTO LABORATORIAL**

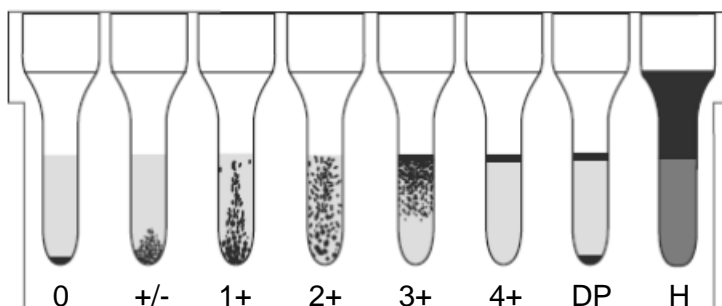
23. Colocar os reagentes à temperatura ambiente
24. Centrifugar a amostra a 3000 rpm por 10 minutos
25. Identificar cartão com nº amostra
26. Verificar se existem gotas dispersas na parte superior dos microtubos do cartão. É recomendado que os cartões sejam centrifugados antes de serem utilizados. Caso as gotas não desçam após centrifugação, o cartão não deve ser usado.
27. Homogeneizar vigorosamente os frascos dos reagentes de eritrócitos diluídos
28. Retirar cuidadosamente o selo de alumio que cobre os microtubos para evitar contaminações cruzadas
29. Colocar 50 $\mu$ L de reagente de eritrócitos A1 no microtubo N<sub>A1</sub> e 50 $\mu$ L de reagente de eritrócitos B no microtubo N<sub>B</sub>
30. Adicionar 50 $\mu$ L de plasma nos microtubos N<sub>A1</sub> e N<sub>B</sub> (dispensar com cuidado e evitar que a ponta da pipeta toque nas paredes no microtubo)

31. Preparar uma suspensão de glóbulos vermelhos a 5% (10µL de concentrado eritrocitário em 200µL de diluente DG Gel Sol). Homogeneizar antes de usar.
32. Adicionar 10µL de suspensão de glóbulos vermelhos nos microtubos A, B, AB, D<sup>VI-</sup>, D<sup>VI+</sup> e Ctl (dispensar com cuidado e evitar que a ponta da pipeta toque nas paredes no microtubo)
33. Aguardar 3 a 4 minutos
34. Centrifugar o cartão na centrífuga DG Spin Grifols a 990 rpm por 9 minutos
35. Ler os resultados. Recomenda-se a leitura imediata, mas pode ser feita até 24h após o processamento dos cartões.

## LEITURA DOS RESULTADOS

### Graus de reação:

Negativo	0	Sedimento bem definido de eritrocidos não aglutinados no fundo da coluna de gel e sem células aglutinadas no resto da coluna.
Positivo	+/-	Agregados de células aglutinadas de tamanho pequeno muito pouco visíveis na parte inferior da coluna e uma sedimentação de células não aglutinadas no fundo.
	1+	Alguns agregados de células aglutinadas de tamanho pequeno, localizados principalmente na metade inferior da coluna de gel. Pode ser observada uma pequena sedimentação no fundo da coluna.
	2+	Agregados pequenos ou médios de células aglutinadas ao longo da coluna de gel. Podem ser visíveis no fundo da coluna de gel.
	3+	Agregados de células aglutinadas de tamanho médio localizados na metade superior da coluna de gel.
	4+	Uma faixa bem definida de células aglutinadas na parte superior da coluna de gel. Podem ser visíveis algumas células aglutinadas abaixo da banda.
Dupla População	DP	Uma banda de eritrócitos na parte superior do gel ou dispersos ao longo da coluna gel e uma sedimentação na parte inferior da coluna como se fosse um resultado negativo.
Hemólise	H	Hemólise no microtubo com poucos ou nenhuns eritrócitos na coluna gel.



**Figura 1. Imagem exemplificativa dos graus de reação**

(FONTE: <https://www.fda.gov/media/131751/download>)

## INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

GRUPO ABO						
Prova Direta				Prova reversa		Interpretação
A	B	AB	Ctl	N <sub>A1</sub>	N <sub>B</sub>	
0	0	0	0	+	+	Grupo 0
+	0	+	0	0	+	Grupo A
0	+	+	0	+	0	Grupo B
+	+	+	0	0	0	Grupo AB

Legenda: 0 = Negativo; + = Positivo

Antigénio D			
D <sup>VI-</sup>	D <sup>VI+</sup>	Ctl	Interpretação
+	+	0	D positivo
0	0	0	D Negativo
0	+	0	D fraco ou parcial
+	0	0	

Legenda: 0 = Negativo; + = Positivo

### ATENÇÃO:

- Se for necessário repetir o teste manual, deve-se centrifugar o cartão antes de ser aberto, visto que podem existir gotas dispersas na parte superior do tubo.
- O microtubo Ctl deve ser negativo, caso contrário o teste é inválido.
- Caso se obtenha uma discrepância hemático-sérica, deve-se investigar antes de divulgar o resultado.
- Perante reações com graus +/- a 3+ é necessário investigar a presença de um antigénio fraco.
- É necessário verificar as reações negativas com reagente anti-D, utilizando outros reagentes e técnicas capazes de identificar diferentes variantes do antigénio D.
- No caso de se obter o resultado de D fraco ou parcial, é recomendado que a expressão deste antigénio seja caracterizada.
- Caso se observe hemólise (sobrenadante e/ou coluna rosadas) nos microtubos deve ser interpretada como um resultado positivo, depois de se comprovar que não se trata de uma hemólise causada por um problema de extração e/ou manipulação da amostra.
- De vez em quando poderá ocorrer a retenção de eritrócitos na câmara de incubação com amostras positivas de 4+ que não interferem com a leitura do resultado.
- Resultados discrepantes entre a prova direta e reversa na tipagem ABO devem ser confirmados com repetição da prova reversa.

### **Confirmação de resultados AB0 discrepantes**

Repetir prova reversa em tubo:

1. Colocar num tubo de hemólise 50µL de plasma e 50µL de reagente de eritrócitos A<sub>1</sub>
2. Colocar num tubo de hemólise 50µL de plasma e 50µL de reagente de eritrócitos B
3. Incubar durante 5 minutos
4. Centrifugar os tubos na centrífuga Immufuge Dade na rotação máxima (speed high) durante um minuto
5. Colocar o tubo horizontalmente e ler os resultados no aglutinoscópio

## **8.10. Anexo 10 – Procedimento de Isolamento de Linfócitos T, B ou Totais do Sangue Periférico por Seleção Negativa Imunomagnética**

**(Adaptado do respetivo procedimento operativo interno do IPST)**

### **MATERIAL**

- Magneto EasySep (EasyEights) STEMCELL Technologies
- Pipetas de Pasteur de plástico de 3mL
- Tubos de poliestireno de 5mL
- Pipetas automáticas de 10µL, 20µL, 200µL e 1000µL
- Pontas descartáveis apropriadas
- Etiquetas
- Microscópio Binocular Invertido
- Microscópio Binocular Invertido com Fluorescência
- Centrifuga
- Sysmex XT-1800i
- Vórtex

### **REAGENTES**

- EasySep direct HLA Crossmatch T cell Isolation Kit
- EasySep direct HLA Crossmatch B cell Isolation Kit
- EasySep Direct Human Total Lymphocyte Isolation Kit
- DPBS 1x
- RPMI 1640 Medium 1x
- Soluções corantes: Azul Trypan ou Laranja de Acridina + Brometo de Etideo

### **AMOSTRA LABORATORIAL**

10mL de sangue periférico com anticoagulante (heparina ou ACD) corretamente identificada, colhida há 48h e sem sinais de hemólise, lipémia ou contaminação bacteriana.

### **PROCEDIMENTO LABORATORIAL**

#### **A) Isolamento de Linfócitos**

1. Centrifugar o sangue periférico a 800g durante 10 minutos à temperatura ambiente
2. Recolher o buffy coat com uma pipeta de Pasteur, com uma pequena porção de plasma e glóbulos vermelhos, na menor quantidade possível (máximo até 1,5mL) para um tubo de 5mL
3. Agitar no vórtex o tubo das RapidSpheres durante 30 minutos

4. Adicionar ao tubo com buffy coat 50 $\mu$ L do cocktail de isolamento e 50 $\mu$ L de RapidSpheres. Ressuspender com uma pipeta de Pasteur.
  5. Incubar o tubo à temperatura ambiente durante 5 minutos
  6. Perfazer o volume até 2,5mL com DPBS 1x e ressuspender suavemente a mistura 2 a 3 vezes com uma pipeta de Pasteur
  7. Colocar o tubo no magneto durante 5 minutos à temperatura ambiente
  8. Recolher cuidadosamente a suspensão celular (toda a fração mais clara que não se ligou ao magneto) com uma pipeta de Pasteur para um novo tubo. Para um melhor rendimento recolher também uma pequena quantidade de glóbulos vermelhos
  9. Adicionar ao tubo que contem a suspensão celular, 50 $\mu$ L de Rapid Spheres (se necessário agitar novamente as esferas no vórtex antes de adicionar) e ressuspender suavemente a mistura 2 a 3 vezes com uma pipeta de Pasteur
  10. Incubar o tubo à temperatura ambiente por 5 minutos
  11. Colocar o tubo no magneto durante 5 minutos à temperatura ambiente
  12. Recolher cuidadosamente a suspensão celular com uma pipeta de Pasteur (apenas a fração mais clara e não recolher glóbulos vermelhos) para um novo tubo  
Se a suspensão ainda apresentar glóbulos vermelhos, repetir os passos 9 e 10
  13. Colocar o tubo no magneto durante 5 minutos à temperatura ambiente
  14. Recolher cuidadosamente a suspensão celular com uma pipeta de Pasteur para um novo tubo
  15. Centrifugar a 1200rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente, inverter o tubo, rejeitar o sobrenadante e secar a ponta do tubo com papel
  16. Adicionar:
    - a. À suspensão de linfócitos T 1mL de RPMI e ressuspender
    - b. À suspensão de linfócitos B 200 $\mu$ L de RPMI e ressuspender
    - c. À suspensão de linfócitos totais 1mL de DPBS e ressuspender
- NOTA: Se o pellet celular for reduzido, ressuspender as células em metade do volume descrito acima
17. Contar:
    - a. Os linfócitos totais no Symex XT-1800i e avaliar a viabilidade celular com o corante Laranja de Acridina + Brometo de Etideo em microscopia de fluorescência
    - b. Os linfócitos T e B no microscópio binocular

## B) Suspensão de Linfócitos

- A suspensão de linfócitos T ou B deve ter uma concentração final de  $2,5 \times 10^6$  células/mL

### Suspensão de células T

1. Fazer uma diluição de  $\frac{1}{2}$  em Azul Trypan (20 $\mu$ L de células + 20 $\mu$ L de corante)
2. Contar as células numa camara de Neubauer (contar 5 quadrados)
3. Multiplicar o número de células por 2 (diluição) e por 5 (total de quadrados) e adicionar 0000
4. Dividir o valor pela concentração final pretendida para obter o volume final pretendido
5. Ajustar o volume final:
  - a. Se for inferior a 1mL, centrifugar e retirar o volume em excesso
  - b. Se for superior a 1mL, acrescentar o volume em falta

#### *Exemplo:*

$$30 \text{ células} \times 2 \times 5 = 300$$

$$300 + \text{"0000"} = 3\ 000\ 000 = 3 \times 10^6$$

$$3 \times 10^6 / 2,5 \times 10^6 = 1,2 \text{ mL}$$

Acrescentar 200 $\mu$ L de RPMI

### Suspensão de células B

1. Fazer uma diluição de  $\frac{1}{2}$  em Azul Trypan (20 $\mu$ L de células + 20 $\mu$ L de corante)
2. Contar as células numa camara de Neubauer (contar 5 quadrados)
3. Multiplicar o número de células por 2 (diluição) e por 5 (total de quadrados) e adicionar 0000
4. Como as células estão ressuspendidas apenas em 200 $\mu$ L, dividir por 5 para saber o número por células por mL
5. Dividir o valor pela concentração final pretendida para obter o volume final pretendido
6. Ajustar o volume final:
  - a. Se for inferior a 120 $\mu$ L, centrifugar e retirar o volume em excesso
  - b. Se for superior a 120 $\mu$ L, acrescentar o volume em falta

#### *Exemplo:*

$$15 \text{ células} \times 2 \times 5 = 150$$

$$150 + \text{"0000"} = 1\ 500\ 000 = 1,5 \times 10^6$$

$$1,5 \times 10^6 / 5 = 3 \times 10^5$$

$$3 \times 10^5 / 2,5 \times 10^6 = 0,12 \text{ mL} = 120 \mu\text{L}$$

Centrifugar e retirar 80 $\mu$ L de RPMI para perfazer os 120 $\mu$ L finais

## **8.11. Anexo 11 – Procedimento de Detecção de Anticorpos Anti-HLA classe I, II e MICA**

**(Adaptado do respetivo procedimento operativo interno do IPST)**

### **MATERIAL**

- Micropipetas de 8 ou 12 canais e pontas descartáveis apropriadas
- Pipela Gilson de repetição e Pontas Gilson de 125µL e 1250µL
- Placa de 96 poços de fundo redondo com tampa
- Tubos eppendorf de 2mL
- Tubos eppendorf de 500mL
- Pelicula adesiva
- Analisador de Fluxo LABscan100 ou LABScan3D
- Plataforma Luminex XY
- Microcentrifuga
- Centrifuga
- Vórtex
- Agitador orbital

### **REAGENTES**

- Kit LabScreen MIXED
- XMAP Sheath Fluid PLUS
- Calibradores citómetro LABscan
- Controlos citómetro LABscan
- Conjugado: Anti-IgG humana marcada com ficoeritrina
- Água destilada
- Lixivia a 20%
- EDTA (preparado no laboratório)
- Etanos a 70%
- CN: amostra conhecida sem anticorpos anti-HLA
- CP: amostra conhecida com anticorpos anti-HLA
- Amostra padrão com reatividade conhecida

## **AMOSTRA LABORATORIAL**

Nesta técnica devem ser usadas preferencialmente amostras de soro colhidas em tubo seco, apesar de também ser possível utilizar amostras de plasma colhidas em EDTA. O volume mínimo necessário para a técnica é de 150µL.

Para ser aceita no laboratório, a amostra deve ter sido colhida há menos de 48h e não ter sinais de hemólise, lipémia excessiva ou contaminação bacteriana.

A amostra deve ser aliqüotada e mantida entre 2-8°C se for processada em 48h ou congelada a -20°C até ao processamento. Devem ser evitados ciclos de congelação/descongelação e as amostras inativadas por calor devem ser rejeitadas.

## **PROCEDIMENTO LABORATORIAL**

### **A) Preparação de Reagentes**

Solução EDTA 6%: Dissolver 3g de EDTA em 50mL de água destilada. (1 ano de estabilidade desde a data de preparação)

Tampão de Lavagem: Diluir 1/10 o tampão de lavagem Wash Buffer 10X em água destilada de forma a obter uma solução de lavagem 1X

Conjugado: Diluir 1/100 o conjugado 100X PE-anti-IgG humano em tampão de lavagem 1X. Reconstituir 2 horas antes e manter à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Para 5µL de beads preparar:

- Conjugado para 1 poço: 1µL de conjugado + 99µL de tampão de lavagem
- Conjugado para 96 poços: 96µL de conjugado + 9,6mL de tampão de lavagem

Por cada 8 poços a adicionar conjugado diluído, devem ser feitas as contas para 9, de forma a contabilizar as perdas.

### **B) Preparação das Amostras**

#### Amostra de soro

1. Centrifugar amostras a 3000rpm durante 15 minutos
2. Fazer alíquota de 500µL de soro para um tubo eppendorf de 2mL identificado com uma etiqueta secundária
3. Num tubo eppendorf de 500µL, colocar 47,5µL de soro e adicionar 2,5µL de solução EDTA a 6%

#### Amostra de plasma EDTA

1. Centrifugar amostras a 3000rpm durante 15 minutos
2. Fazer alíquota de 500µL de plasma para um tubo eppendorf de 2mL identificado com uma etiqueta secundária. Utilizar diretamente.

### **C) Preparação da Placa**

1. Colocar 20µL de soro diluído em EDTA em cada poço
2. Agitar o frasco de esferas suavemente no vórtex
3. Colocar 5µL de esferas em cada poço
4. Tapar a placa com película adesiva
5. Agitar no vórtex
6. Incubar a placa à temperatura ambiente, no escuro durante 30 minutos com agitação orbital de 320 rpm
7. Adicionar 150µL de tampão de lavagem 1X a cada poço
8. Tapar com película adesiva
9. Agitar no vórtex
10. Centrifugar a 1300g durante 5 minutos
11. Decantar com movimento súbito e secar a placa em papel absorvente
12. Adicionar 100µL de conjugado a cada poço
13. Tapar com película adesiva
14. Agitar no vórtex
15. Incubar a placa à temperatura ambiente, no escuro durante 30 minutos com agitação orbital de 320 rpm
16. Centrifugar a 1300g durante 5 minutos
17. Decantar com movimento súbito e secar a placa em papel absorvente
18. Adicionar 200µL de tampão de lavagem a cada poço
19. Centrifugar a 1300g durante 5 minutos
20. Decantar com movimento súbito e secar a placa em papel absorvente
21. Repetir os passos 18,19 e 20
22. Colocar 80µL de tampão em cada poço
23. Guardar ao abrigo da luz a 4°C até leitura no Luminex nas próximas 24h

### **D) Análise no analisador de fluxo LABScan**

1. Ligar o equipamento
2. Esperar cerca de 1 minuto e iniciar o software xPONENT
3. Identificar o utilizador no menu inicial
4. Aguardar 30 min até ao equipamento terminar de inicializar e realizar a manutenção diária
5. Criar a lista de trabalho de identificação de amostras para leitura no equipamento num ficheiro TXT

6. Programar os Batch no software xPONENT
  - a. Selecionar “Create a New Batch from na existing Protocol”
  - b. Identificar o batch
  - c. Selecionar o protocolo pretendido (LSM12024\_L530\_42)
  - d. Selecionar e associar as amostras a posições no equipamento
    - i. Selecionar os poços com amostra
    - ii. Classificar as amostras como desconhecidas
    - iii. Clicar em “Import List” e associar a identificação da amostras ao ficheiro TXT previamente elaborado
    - iv. Selecionar “Save”
  - e. Se for necessário fazer um multibatch, carregar em “Create a new Multi-Batch”
  - f. Selecionar o batch de interesse e clicar em OK
  - g. Desenhar a placa no equipamento
    - i. Amostras colocadas automaticamente
    - ii. Botão “Move” possibilita alterar o posicionamento das amostras
    - iii. Selecionar o local onde vão ficar as próximas amostras
    - iv. Botão “Add” para colocar as próximas amostras
7. Depois de desenhada a placa de 96 poços e inserida no equipamento, selecionar o botão “Run” e clicar em OK e o equipamento inicia a leitura
8. Após terminar a leitura, encerrar o equipamento, selecionando “System Shutdown” e “Run”.
9. Desligar o equipamento
10. Encerrar software xPONENT

#### **E) Importação de dados para o software HLA Fusion**

1. Abrir o software HLA Fusion
2. Inserir as credenciais de acesso e clicar em “Log In”
3. Selecionar o tipo de testes a utilizar carregando no ícone de anticorpo ou em “LABScreen”
4. Pesquisar o ficheiro de leitura do Luminex
5. Na importação para o HLA Fusion preencher
  - a. Identificação do ficheiro de leitura (Pré-preenchido)
  - b. Catálogo de interpretação (Pré-preenchido)
  - c. Anticorpo secundário (Selecionar IgG)
  - d. Selecionar “Apply to all”
  - e. Selecionar “OLINS”
  - f. Se necessário identificar o “Patient ID”

6. Selecionar o batch a interpretar
7. Selecionar a amostra a interpretar
8. Plot da amostra
  - a. Sempre que disponível a informação no HLA Fusion, comparar com a amostra anterior
  - b. Validar o CP interno
  - c. Validar o CN interno
  - d. Campo de anotações
  - e. Salvar e continuar

## F) Análise do perfil de reatividade anti-HLA

Para uma correta análise do perfil de reatividade anti-HLA deve-se:

- ter em conta a informação clínica
- ser sempre que possível comparada com uma amostra previa do mesmo doente
- analisar os valores de CP, CN e número mínimo de esferas por gate
- realizar a análise dos resultados em Raw data, exceto em casos em que o valor da esfera do CN seja > a 500 MFI. Nesta situação, a amostra deve ser adsorvida com reagente de eliminação de fundos, podendo ser aprovados valores de CN ligeiramente aumentados, desde que avaliados em baseline
- ter um valor do CP > 500 e pelo menos o dobro do CN

### Anticorpos anti-HLA Classe I e II

- O software HLA Fusion tem CN próprio
- A reatividade de cada amostra pode ser calculada através do sinal de fluorescência emitido por cada esfera recoberta, depois de ter sido corrigida da união não específica da esfera ao CN. Todos os resultados são normalizados de acordo com os resultados obtidos no CN.
- A força da reatividade dos anticorpos anti-HLA é determinada pelo background ratio (NBG ratio)

6. Para os LABScreen Mixed, calcular o NBG ratio segundo a seguinte fórmula:

$$NBG\ ratio = \frac{S\#N - Esfera\ SNC}{BG\#N - Esfera\ BGNC}$$

Em que:

- NBG ratio – Ratio do background normalizado usado para atribuir a força de cada reação anti-HLA
- S#N – Valor de fluorescência da amostra para a esfera N°

- Esfera SNC – Valor de fluorescência para a esfera do CN
- BG#N – Valor de fluorescência de fundo (soro) do CN para a esfera N<sup>o</sup>
- Esfera BGNC – Valor de fluorescência de fundo (soro) do CN para a esfera do CN

7. Classificar as amostras segundo o NBG ratio:

- Amostra negativa – NBG ratio < 2,1
- Amostra positiva – NBG ratio ≥ 2,5
- Resultado indeterminado – NBG ratio ≥ 2,1 e < 2,5

Os resultados indeterminados devem ser avaliados segundo o contexto clínico do doente, tendo em conta os resultados de testes de antigénio único, eventos sensibilizantes ocorridos no período entre amostras, devendo posteriormente ser reclassificados em Positivo ou Negativo.

#### Anticorpos anti- MICA

- A amostra é considerada positiva quando a MFI do anticorpo HLA é > 1000.

#### **ATENÇÃO:**

- Ao importar os dados para o sistema informático do laboratório, verificar a lista de erros antes de Processar (botão canto inferior direito)
- Verificar padrões de reatividade discrepantes ou com perfil de reatividade distinto. Imprimir os resultados (botão canto superior direito) e verificar se os candidatos obtiveram modificações de perfil entre amostras
- Solicitar nova amostra para confirmar resultados com o perfil modificado.
- Os resultados não devem ser valorizados quando o CN por > 500 MFI. Neste caso, deve-se adsorver a amostra com esferas de adsorção e repetir o procedimento.
- O CP deve ser > 500 MFI e pelo menos duas vezes o valor do CN
- Devem ser analisadas no mínimo 50 beads por gate

## **8.12. Anexo 12 – Procedimento de Pesquisa e Identificação de Anticorpos anti-HLA Classe I e II Fixadores da Fração C1q do Complemento**

**(Adaptado do respetivo procedimento operativo interno do IPST)**

### **MATERIAL**

- Tubos eppendorf de 0,5mL
- Pipetas de 10 $\mu$ L, 20 $\mu$ L e 200 $\mu$ L
- Pipeta Gilson de repetição
- Pontas de 125 $\mu$ L e 1250 $\mu$ L
- Pontas descartáveis apropriadas
- Pelicula adesiva
- Placas de 96 poços com tampa
- Microcentrifuga
- Centrifuga
- Analisador de Fluxo LABScan100 ou analisador de fluxo LABScan3D
- Plataforma Luminex XY
- Vórtex
- Agitador orbital
- Bloco térmico
- Banho-maria

### **REAGENTES**

- Kit LabScreen Single Antigen classe I
- Kit LabScreen Single Antigen classe II
- XMAP Sheath Fluid PLUS
- Calibradores Citómetro LABScan
- Controlos Citómetro LABScan
- Kit C1qScreen
- Água destilada
- Lixívia a 20%
- Etanol a 70%

### **AMOSTRA LABORATORIAL**

Amostra de soro colhida em tubo seco. A amostra deve ser aliqüotada e mantida entre 2-8°C se for processado em 48h, ou congelada a -20°C até ao processamento. Inativar complemento existente na amostra antes de iniciar este procedimento.

## **PROCEDIMENTO LABORATORIAL**

### **A) Preparação dos reagentes LabScreen Single Antigen**

Pré-misturar as esferas de CP C1qScreen com microesferas revestidas com antigénio HLA:  
125µL esferas Single Antigen + 12,5µL esferas CP (PEPC1QPCB)

### **B) Carregamento das placas**

1. Incubar 300µL de soro durante 30 minutos a 56°C em bloco térmico ou banho-maria
2. Centrifugar soro a 8000-12000g durante 10 minutos e transferir 30µL do sobrenadante para um novo microtubo de 0,5mL
3. Diluir o componente do Complemento C1q 1/5 em tampão HEPES (1µL de C1q + 4µL de tampão HEPES)
4. Agitar a mistura no vórtex e mantê-la no gelo
5. Adicionar 3µL de C1q humano diluído com 6µL de cada soro. Agitar em vórtex
6. Agitar no vórtex com microesferas (Single Antigen classe I e II) e dispensar 3µL em cada poço
7. Agitar a mistura gentilmente no vortez
8. Tapar a microplaca com a película adesiva
9. Incubar a placa durante 20 minutos no escuro à temperatura ambiente em agitação a 400rpm no agitador orbital
10. Adicionar 3µL de anti-C1q-PE a cada poço
11. Agitar no vórtex
12. Incubar a placa durante 20 min no escuro à temperatura ambiente em agitação a 400rpm no agitador orbital
13. Adicionar 80µL de tampão a cada poço
14. Centrifugar a 1300g durante 5 minutos para sedimentar as microesferas
15. Rejeitar o sobrenadante por flicking, agitar ligeiramente no vórtex
16. Repetir os passos 13,14 e 15
17. Adicionar 80µL de tampão a cada poço e efetuar a leitura até 24h, mantendo a placa a 2-8°C ao abrigo da luz

### **C) Análise no analisador de fluxo LABScan**

1. Ligar o equipamento
2. Esperar cerca de 1 minuto e iniciar o software xPONENT
3. Identificar o utilizador no menu inicial
4. Aguardar 30 min até ao equipamento terminar de inicializar e realizar a manutenção diária

5. Criar a lista de trabalho de identificação de amostras para leitura no equipamento num ficheiro TXT.
6. Programar os Bach no software xPONENT
  - a. Selecionar “Create a New Batch from na existing Protocol”
  - b. Identificar o batch, diferenciando o batch onde se efetuará a pesquisa de anticorpos de classe I e classe II
  - c. Selecionar o protocolo pretendido (LSM12024\_L530\_42)
  - d. Selecionar e associar as amostras a posições no equipamento
    - i. Selecionar os poços com amostra
    - ii. Classificar as amostras como desconhecidas
    - iii. Clicar em “Import List” e associar a identificação das amostras ao ficheiro TXT previamente elaborado
    - iv. Selecionar “Save”
    - v. Repetir o procedimento se necessário para outro protocolo
  - e. Se for necessário fazer um multibatch, carregar em “Create a new Multi-Batch”
  - f. Selecionar o batch de interesse e clicar em OK
  - g. Desenhar a placa no equipamento
    - i. Amostras colocadas automaticamente
    - ii. Botão “Move” possibilita alterar o posicionamento das amostras
    - iii. Selecionar o local onde vão ficar as próximas amostras
    - iv. Botão “Add” para colocar as próximas amostras
7. Depois de desenhada a placa de 96 poços e inserida no equipamento, selecionar o botão “Run” e clicar em OK e o equipamento inicia a leitura
8. Após terminar a leitura, encerrar o equipamento, selecionando “System Shutdown” e “Run”.
9. Desligar o equipamento
10. Encerrar software xPONENT

#### **E) Importação de dados para o software HLA Fusion**

1. Abrir o software HLA Fusion
2. Inserir as credenciais de acesso e clicar em “Log In”
3. Selecionar o tipo de testes a utilizar carregando no ícone de anticorpo ou em “LABScreen”
4. Pesquisar o ficheiro de leitura do Luminex
5. Selecionar os ficheiros pretendidos
6. Na importação para o HLA Fusion preencher
9. Abrir o software HLA Fusion

10. Inserir as credenciais de acesso e clicar em “Log In”
11. Selecionar o tipo de testes a utilizar carregando no ícone de anticorpo ou em “LABScreen”
12. Pesquisar o ficheiro de leitura do Luminex
13. Na importação para o HLA Fusion preencher
  - a. Identificação do ficheiro de leitura (Pré-preenchido)
  - b. Catálogo de interpretação (Pré-preenchido)
  - c. Anticorpo secundário (Selecionar IgG)
  - d. Selecionar “Apply to all”
  - e. Selecionar “OLINS”
  - f. Se necessário identificar o “Patient ID”
14. Selecionar o batch a interpretar
15. Selecionar a amostra a interpretar
16. Plot da amostra
  - a. Sempre que disponível a informação no HLA Fusion, comparar com a amostra anterior
  - b. Validar o CP interno
  - c. Validar o CN interno
  - d. Campo de anotações
  - e. Salvar e continuar

#### **F) Análise do perfil de aloreatividade anti-HLA**

Para uma correta análise do perfil de aloreatividade anti-HLA deve-se:

- ter em conta a informação clínica
- ser sempre que possível comparada com uma amostra previa do mesmo doente
- analisar os valores de CP, CN e numero mínimo de esferas por gate
- realizar a análise dos resultados em Raw data, exceto em casos em que o valor da esfera do CN seja > a 500 MFI. Nesta situação, a amostra deve ser adsorvida com reagente de eliminação de fundos, podendo ser aprovados valores de CN ligeiramente aumentados, desde que avaliados em baseline
- ter um valor do CP > 500 e pelo menos o dobro do CN

Positividade: Uma amostra é considerada positiva quando a MFI do anticorpo HLA é > 300. Caso haja anticorpos contra o dador, podem ser considerados valores ligeiramente < 300 MFI.

## **8.13. Anexo 13 – Procedimento de Pesquisa de Aloanticorpos anti-HLA usando um Painel de Células**

(Adaptado do respetivo procedimento operativo interno do IPST)

### **MATERIAL**

- Microplacas de Terasaki
- Bateria para soros compatível com microplacas Terasaki
- Distribuidores de células Hamilton: 1µL – 6 x 5 µL
- Pipetas de Pasteur de 3mL
- Tubos de Falcon de 15mL
- Pipetas de 10µL, 20µL, 200µL e 1000µL
- Pontas descartáveis apropriadas
- Etiquetas
- Câmara de Neubauer Improved
- Microscópio binocular
- Microscópio binocular com fluorescência
- Centrifuga
- Pipetador de soros
- Contador hematológico
- Parafinador de microplacas Terasaki

### **REAGENTES**

- Complemento de coelho
- Controlos Positivo e Negativo
- RPMI 1640 Medium (1x)
- Soluções corantes: Laranja de Acridina + Brometo de Etídeo
- Parafina ou óleo mineral
- Amostra com padrão de aloreatividade e especificidade conhecida

### **AMOSTRA LABORATORIAL**

A análise é feita em:

- Suspensões celulares de linfócitos totais ou T: A suspensão deve ter sido separada há menos de 48h e mantida a 4°C até ao processamento, sem sinais de contaminação bacteriana. Amostras criopreservadas provenientes do Banco de Células devem ser utilizadas no espaço de 4h após a descongelação. Em ambos os casos as populações devem ter uma viabilidade > 80%.

- Amostra de soro de candidatos a transplante: A amostra deve estar corretamente identificada, colhida há menos de 48h sem sinais de hemólise, lipémia excessiva ou contaminação bacteriana.

## **PROCEDIMENTO LABORATORIAL**

### **A) Preparação dos controlos e seleção do painel**

#### CN

Deve ser utilizado um soro AB comercial proveniente de indivíduos do sexo masculino (não transfundidos nem transplantados). Em cada microplaca deve ser colocado 1 CN.

#### CP

Deve ser utilizado um pool de soros de doentes com imunização anti-HLA >85% ou um anti-soro comercial HLA-anticlasse I. Em cada microplaca deve ser colocado 1 CP.

#### Soro de validação

Soro de sensibilização e especificidade conhecidas que funciona como indicador de homogeneidade entre painéis.

#### Seleção do painel de células

O painel tem de ser criteriosamente escolhido e obedecer a algumas regras:

- Os antígenos devem ter uma distribuição que seja representativa da população portuguesa
- Os antígenos que têm um forte desequilíbrio de ligação não devem estar associados em mais que uma suspensão de células

### **B) Pesquisa de anticorpos**

1. Colocar 150µL de soro a estudar em bateria compatível com microplacas Terasaki
2. Identificar as placas com o número da bateria em estudo
3. Parafinar as placas de terasaki
4. Utilizar um dispensador de soros para fazer 40 a 50 réplicas de microplacas com 1µL de soro por alvéolo dos soros presentes na bateria, devendo cada bateria conter um poli com 1 CP e um com 1 CN
5. Congelar as microplacas a -20°C até ao momento da sua utilização
6. Descongelar as microplacas de acordo com o número de células a utilizar
7. Centrifugar as placas a 900rpm durante 1 minuto
8. Preparar as suspensões de células mononucleares que devem ser acertadas à concentração de  $2,5 \times 10^6$  células/mL

9. Identificar cada célula no rebordo lateral da microplaca de Terasaki
10. Dispensar 1µL de cada suspensão, tendo o cuidado de verificar se as gotas se encontram unidas
11. Incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos
12. Prepara o complemento de coelho na diluição apropriada e adicionando 10% (v/v) de solução corante por mL de complemento: Laranja de Acridina + Brometo de Etídeo
13. Distribuir 5µL de solução de complemento por alvéolo, tendo o cuidado de verificar se as gotas se encontram unidas
14. Incubar ao abrigo da luz por 50 minutos à temperatura ambiente
15. Ler e classificar as reações de acordo com o score internacional de zero (0) a oito (8):

<b>% Células mortas</b>	<b>Score</b>	<b>Resultado interpretativo</b>
0 – 10	1	Negativo
11 – 20	2	Negativo duvidoso
21 – 50	4	Positivo Fraco
50 – 80	6	Positivo
80 – 100	8	Positivo Forte
	0	Resultado inválido

**ATENÇÃO:**

- O resultado obtido do estudo de cada antissoro utilizando um painel de células deve ser avaliado por meios informáticos relativamente à positividade contra o painel e as especificidades anti-HLA encontradas.
- Na ficha de cada doente relativamente a cada antissoro estudado devem constar a positividade e as especificidades anti-HLA desde que o coeficiente de correlação seja superior a 0,50.
- Se os antissoros estudados forem negativos ou tiverem positividade inferior a outros existentes podem ser eliminados desde que não seja o último soro do doente nem o soro antes do transplante.

## **8.14. Anexo 14 – Procedimento de Crossmatch Anti-Linfocitário por Citotoxicidade Mediada pelo Complemento**

(Adaptado do respetivo procedimento operativo interno do IPST)

### **MATERIAL**

- Microplacas Terasaki de 60 poços
- Microtubos eppendorf de 1,5mL
- Distribuidores de células Hamilton: 1µL – 6 x 5 µL
- Pipetas de Pasteur de plástico de 3ml
- Pipetas automáticas de 10µL, 20µL, 200µL e 1000µL
- Pontas descartáveis apropriadas
- Tubos de Falcon de 15ml
- Microscópio Binocular Invertido de Fluorescência
- Parafinador de placas
- Centrífuga

### **REAGENTES**

- RPMI 1640 Medium (1x)
- CP: Pool soros positivos
- CN: Soro Humano do tipo AB Masculino
- CP IgM: Anti-Linfocito (IgM)
- Solução Corante: Laranja de Acridina + Brometo de Etídeo
- Complemento de Coelho
- Parafina ou óleo mineral
- Solução de DTT a 50 mM

### **AMOSTRA LABORATORIAL**

#### **A) Dador**

Linfocitos T, B ou totais do dador obtidos de sangue periférico, isolados por seleção negativa com esferas imunomagnéticas com viabilidade celular superior a 90%. Linfócitos com viabilidade inferior a 90% não são aceites, solicitando-se nova colheita.

- Urgência com dador falecido: Linfócitos T e B
- Dador vivo: Linfócitos T e B
- Transplante hematopoiético: Linfócitos Totais

## **B) Receptor**

Amostra de soro recente, que não deve ultrapassar 3 a 4 meses para candidatos a transplante renal e reno-pancreático e 6 meses para candidatos a transplante cardíaco, pulmonar e pâncreas isolado. No caso de existirem eventos sensibilizantes recentes reportados, se a amostra biológica tiver menos de 115 dias após o evento, o crossmatch deve ser realizado com uma amostra o mais recente possível.

Podem ainda ser incluídos soros históricos (transplante de órgãos cardio-toraxicos), nomeadamente soro pós-transfusão e soro de pico. Os soros usados no crossmatch previamente ao transplante são criopreservados em seroteca.

Sempre que uma amostra de soro tenha uma reatividade por CDC superior a 25% deve ser colocado um CN a separar essa amostra da seguinte.

## **CASOS ESPECIAIS**

A amostra de soro do recetor deve ser tratada para inactivação das IgM, sempre que:

- Crossmatch de urgência com dador falecido:
  - i. Todos os recetores candidatos a transplante cardíaco;
  - ii. Todos os recetores candidatos a transplante pulmonar;
  - iii. Candidatos a transplante renal ou reno-pancreatico referenciados.
- Crossmatch com dador vivo para transplante ed órgãos sólidos ou progenitores hematopoiéticos
  - i. Sempre que o resultado for positivo.

Nestas situações, o soro inativado deve ser estudado em paralelo com o soro não inativado

## **PROCEDIMENTO LABORATORIAL**

### **A) Controlos**

#### CN

O soro AB utilizado nesta técnica é um soro comercial que foi previamente testado e inativado pelo calor (30 minutos a 56°C).

Utilizar soro humano AB como CN e sempre que for necessário diluir a amostra do recetor.

Colocar no mínimo dois poços de CN para cada célula utilizada para crossmatch anti-  
linfocitário.

#### CP

No conjunto das placas preparadas para um Crossmatch deve ser colocada uma fila com um soro anti-HLA classe I comercial ou um pool de soros de doentes hiperimunizados com imunização anti-HLA superior a 85%, previamente estudado por CDC.

### CP IgM

Sempre que for necessário proceder á inativação das IgM deve ser colocado um soro CP para IgM.

O CP IgM utilizado nesta técnica é um soro comercial.

### **B) Distribuição das Células**

Os linfócitos obtidos devem ser ressuspensos em RPMI e distribuídos à concentração de  $2,5 \times 10^6$  mL.

Numa placa parafinada, distribuir de acordo com os esquemas abaixo representados:

- 1µL de soro +1µL de células
- Incubar 35 minutos à temperatura ambiente
- 5µL de complemento de coelho diluído em RPMI na concentração recomendada com 10% do corante Laranja de Acridina + Brometo de Etídio
- Incubar 75 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz

### **C) Validação**

Todas as placas devem ter um CP e negativo. Se o CP não funcionar a interpretação do Crossmatch continua a ser válida se a viabilidade das células for superior a 90% e houver reacções positivas.

Se o CN tiver mortalidade a valorização das reacções deve ser deduzida da mortalidade base.

### **D) Leitura e Interpretação de Resultados**

A leitura e interpretação das placas são realizadas num Microscópio Binocular Invertido de Fluorescência e são executadas por dois profissionais de saúde qualificados.

### Valorização das reacções

- 0** ausência de reacção
- 1** negativo
- 2** negativo duvidoso
- 4** positivo fraco
- 6** positivo
- 8** positivo forte

As reacções devem ser consideradas positivas quando a mortalidade é superior ao CN.

## **8.15. Anexo 15 – Procedimento do Crossmatch Anti-Linfocitário por Citometria de Fluxo Rotina Protocolo Halifaster**

(Adaptado do respetivo procedimento operativo interno do IPST)

### **MATERIAL**

- Pipetas de Pasteur
- Pipetas e multicanais de volume variável e pontas apropriadas
- Tubos de Falcon para citómetro
- Tubos micronic 1,4mL
- Tubos de análise compatíveis com magneto EasySep
- Placas de Elisa de fundo redondo com 96 poços e tampas
- Pontas Distitips Micro Gilson 1250µL
- Citómetro de fluxo FACS Calibur
- Centrifuga com suportes para tubos e placas
- Microcentrifuga
- Agitador orbital
- Estufa ou banho-maria a 37°C
- Contador hematológico
- Vórtex

### **REAGENTES**

- Soro de vitela fetal
- Solução de lavagem 2% (98mL DPBS + 2mL FCS)
- Anti-IgG FITC F(ab')<sub>2</sub>
- Anticorpo monoclonal anti-CD3 PE
- Anticorpo monoclonal anti-CD19 PerCP
- Controlos positivos: 2 soros diferentes nas diluições 1/50 e 1/400
- Controlos negativos: 3 soros AB diferentes

### **AMOSTRA LABORATORIAL**

- Linfócitos separados a partir de sangue periférico, gânglio ou baço após tratamento com Pronase/ADNse e ajustados à concentração de  $10 \times 10^6$  células/mL em DPBS. Se forem usadas células congeladas separadas por ficoll, após a descongelação, deve-se fazer de imediato o tratamento com Pronase/ADNse e seguir a técnica.  
As células devem ter uma viabilidade >80%. A amostra deve ser mantida à temperatura ambiente até ser processada e a colheita deve ter menos de 48h.

- Soros a testar nas análises de rotina: Soro do Pico (maior % de PRA) e soro recente, com menos de 3 meses. Na urgência, só é estudado o soro recente.  
Os soros devem ser centrifugados 5 minutos a 10000rpm, separados e congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem processados.

## **PROCEDIMENTO LABORATORIAL**

### **A) Tratamento das células com Pronase e ADNse**

1. Após separar os linfócitos totais, ressuspender em 1mL de solução de lavagem e contar as células. Registrar o valor obtido.
2. Centrifugar 800g por 4 minutos
3. Aspirar o sobrenadante com cuidado para não retirar o pellet
4. Ressuspender as células em solução de pronase na proporção: 100 $\mu\text{L}$  para cada  $1.0 \times 10^6$  de células (ATENÇÃO: Arredondar a concentração de células às unidades.  
Ex:  $1,0 \times 10^6 = 100\mu\text{L}$  de pronase;  $1,7 \times 10^6 = 100\mu\text{L}$  pronase)
5. Incubar por 15 minutos na estufa a  $37^{\circ}\text{C}$
6. Retirar da arca a quantidade de ADNse necessária e deixar descongelar.
7. Adicionar a ADNse na proporção: 4 $\mu\text{L}$  de ADNse por cada 100 $\mu\text{L}$  de pronase usados
8. Incubar 2 minutos na estufa a  $37^{\circ}\text{C}$
9. Centrifugar a 800g por 4 minutos e retirar o sobrenadante
10. Ressuspender as células em 2mL de DPBS e contar
11. Centrifugar a 800g por 4 minutos e retirar o sobrenadante
12. Ajustar as células à concentração de  $10 \times 10^6$

NOTA: Se as células não forem usadas nos 30 minutos seguintes, podem ser guardadas no frigorífico por 3h no máximo. Se não forem usadas no espaço de 3h, devem ser guardadas em 2mL de DPBS 2% Soro vitela fetal no frigorífico e só proceder aos tratamentos enzimáticos na altura da utilização.

### **B) Técnica de Crossmatch**

1. Adicionar 15 $\mu\text{L}$  de células do dador (150 000 por poço)
2. De acordo com o esquema da placa feito inicialmente, distribuir pelos poço 30 $\mu\text{L}$  de cada um dos soros negativos, positivos, branco com solução de lavagem e soros a testar (estes em duplicado)
3. Tapar a placa e incubar por 20 minutos à temperatura ambiente no agitador orbital a 400rpm
4. Após a incubação adicionar 150 $\mu\text{L}$  de Solução de lavagem com uma pipeta multicanal
5. Centrifugar a placa a 800g durante 4 minutos

6. Rejeitar o sobrenadante por inversão e ressuspender as células no vórtex
  7. Adicionar 200µL de solução de lavagem
  8. Centrifugar 2 minutos a 800g
  9. Rejeitar o sobrenadante por inversão da placa e ressuspender as células no vórtex
  10. Repetir o procedimento anterior mais 3 vezes, perfazendo o total de 4 lavagens
  11. Após a última lavagem e as células terem sido ressuspensas, junta-se a cada poço 50µL do cocktail de anticorpos preparado na altura:
    - a. 1,5µL de anti CD3 PE
    - b. 1µL de anti CD19 PerCP cy5.5
    - c. 0,125µL de anti-IgG FITC (em diluição previamente estudada)
    - d. 47,4µL de DPBS
- Preparar o volume total de cocktail necessário multiplicando as quantidades de cada um dos reagentes necessários pelo nº de poços a marcar (contar sempre 1 poço a mais por coluna para o volume morto)
12. Incubar à temperatura ambiente e ao abrigo de luz no agitador orbital a 400rpm durante 5 a 10 minutos
  13. Após a incubação procede-se a uma lavagem com 150µL de solução de lavagem
  14. Centrifugar a placa a 800g por 4 minutos
  15. Rejeitar o sobrenadante por inversão da placa e ressuspender as células no vórtex
  16. Fazer outra lavagem com 200µL de solução de lavagem
  17. Centrifugar a placa a 800g por 2 minutos
  18. Rejeitar o sobrenadante por inversão da placa e ressuspender as células no vórtex
  19. Adicionar 200µL de solução de lavagem
  20. Transferir as amostras para os tubos micronic de 1,4mL previamente preparados com 220µL de solução de lavagem. Colocar estes tubos dentro dos tubos de Falcon para leitura no citómetro

### **C) Aquisição da amostra no citómetro**

1. Ligar primeiro o citómetro no botão verde do lado direito e só depois ligar o computador
2. Fazer a manutenção diária do citómetro
3. Passar as calibrites
4. No computador abrir a pasta onde está a aquisição do crossmatch

5. Fazer a ligação do citómetro ao computador
6. Identificação da amostra
  - A aquisição de dados deve ser feita através duma janela desenhada na região dos linfócitos, com base na sua distribuição habitual pelas características de tamanho e complexidade.
  - Devem ser adquiridas no mínimo 1000 células de linfócitos T e linfócitos B.
  - Adquirir os três controlos negativos, reajustar se necessário o gate dos linfócitos, o gate dos linfócitos T e B, respectivamente às populações CD3+ e C19+.
  - Após as populações estarem bem reajustadas. Desativar o set up e adquirir as amostras alterando a identificação dos tubos na Sample ID.

#### **D) A análise e interpretação dos resultados**

A interpretação dos dados pode ser efetuada de duas formas:

- Programa de análise FowJo
- No Citómetro
  - i. No computador abrir a pasta de análise
  - ii. Ativar os dois plots (SSC/FSC e CD3/CD19)
  - iii. Abrir a lista de dados a analisar
  - iv. Para cada amostra formatar o respetivo histograma para linfócitos T e B
  - v. Ativar o histograma
  - vi. Salvar a alterações

#### **E) Cálculo do resultado**

Para fazer o cálculo do resultado, é necessário fazer a avaliação da alteração da intensidade de fluorescência de FL1 (Anti IgG FITC) para cada uma das populações de células T e B. (Mediana)

O resultado de uma amostra é obtido através da fórmula:

$$Resultado = \frac{MCA}{MCN}$$

Em que:

- MCA é a média dos valores da mediana de intensidade de fluorescência de cada amostra em duplicado
- MCN é a média dos valores da mediana de intensidade de fluorescência de cada um dos três controlos negativos

Considera-se o resultado para células T ou células B:

- Positivo > 1,5
- Negativo ≤ 1,5

## D) Interpretação dos Resultados

- Soro sem reatividade anti-linfócito T e/ou B do dador:  
Ratio Shift MFI  $\leq 1,5$
- Soro com reatividade fracamente positiva anti-linfócito T e/ou B do dador:  
Ratio Shift MFI  $>1,51$  e  $<1,8$
- Soro com reatividade positiva anti-linfócito T e/ou B do dador:  
Ratio Shift MFI  $>1,8$

## ATENÇÃO

- Para considerarmos a técnica do crossmatch válida os resultados dos controlos devem estar de acordo com o controlo usado (Negativo e Positivo).
- Os valores da mediana da intensidade de fluorescência dos controlos Negativos obtidos, devem estar dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para os controlos a uso.

Considerações a ter em conta na validação:

- Deve ser usado o programa FACSCComp Software e as Calibrites, para verificar os parâmetros de FCS, SSC, avaliar sinais de background e noise, verificar as fluorescências, compensações e determinação da sensibilidade do aparelho
- Anti-Imunoglobulina(Anti IgG), deve ser utilizada uma imunoglobulina de coelho conjugada com FITC F(ab')<sub>2</sub>.(Anti-Human IgG FITC) é usada como anti-imunoglobulina específica
- CN: Soro humano proveniente de homens não imunizados, grupo sanguíneo AB. Para a sua validação deve ser testado, como uma amostra, contra um painel de 10 a 15 células diferentes obtendo-se sempre um resultado negativo. Por teste devem ser usados 3 soros AB diferentes.
- CP: Soros obtidos de pools constituídos por mais de 10 amostras, provenientes de doentes hiperimunizados, (PRA  $> 80\%$ ). O soro positivo deve ser usado em duas diferentes diluições, em que uma delas deve permitir obter um resultado positivo baixo, de forma a controlar a positividade do cut off.

## 8.16. Anexo 16 – Circular Normativa Nº001-A/CN-IPST, IP/2018 de 11 de abril



Nº. 001/CN-IPST, IP/2018

Data: 09.04.2018

**ASSUNTO: Prevenção das Doenças Transmissíveis – Dadores de Órgãos.**

**PARA:** Centros de Sangue e da Transplantação; Gabinetes Coordenadores de Colheita e Transplantação; Coordenadores Hospitalares de Doação de órgãos e tecidos; Unidades de Transplantação.

São atribuições do IPST, I.P., garantir e regular, a nível nacional, a atividade da medicina transfusional e da transplantação e garantir a dádiva, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento e distribuição de sangue humano, de componentes sanguíneos, de órgãos, tecidos e células de origem humana, constantes do Decreto-Lei n.º 39/2012, de 16 de fevereiro, e as da Direção-Geral da Saúde, constantes no Decreto Regulamentar n.º 14/2012, de 26 de janeiro. Foi criado um grupo de trabalho no âmbito do IPST, IP para revisão das normas relativas às doenças transmissíveis o qual integra especialistas da área da transplantação, bem como representantes da Direção-Geral da Saúde e do Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP.

Neste enquadramento normativo e considerando:

- Que há que evitar o desperdício de órgãos para transplantação que reúnam as condições exigíveis para a sua aplicação, face aos conhecimentos científicos atuais;
- O facto de surgirem dúvidas em relação à efetividade da Circular Normativa N.º 16/GDG/ASST, de 7 de setembro de 2009, que estabelece os critérios de exclusão de doação de órgãos para transplantação, alterada em parte pela Circular Normativa N.º 2/GDG/ASST, de 1 de abril de 2011 por força de extinção da Autoridade para os Serviços de Sangue e Transplantação (ASST);
- Ser necessário garantir uma melhor resposta às necessidades dos doentes que aguardam transplantação, o que impõe proceder à revisão das referidas circulares;

**CIRCULAR NORMATIVA**

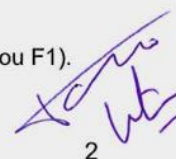
1

- Os avanços da medicina nesta área, bem como as recomendações constantes do *Guide to the quality and safety of organs for transplantation, European Committee (Partial Agreement) on Organ Transplantation (CD-P-TO) 6th Edition 2016, EDQM*;
- Os resultados alcançados no Grupo de Peritos, criado para o efeito e os consensos obtidos pelas três Unidades de Transplantação Hepática.

Determina-se o seguinte:

A) São critérios de exclusão de doação de órgãos, tendo em conta a prevenção de doenças transmissíveis, a presença no dador de:

1. Neoplasia ativa, exceto alguns tumores primitivos não metastáticos do SNC, carcinoma de células basais da pele, carcinoma *in situ* e tumores renais com baixo grau de malignidade
2. Sepsis não controlada ou de origem desconhecida
3. Encefalite a vírus
4. Anticorpos VIH 1 e 2 positivos
5. Anticorpos HTLV 1 e 2 positivos, avaliados em contexto epidemiológico do dador
6. Hepatite B:
  - a. Ag HBs positivo
  - b. IgM Anti HBc positivo
  - c. Não se incluem nestes critérios de exclusão os dadores com Anti HBc positivo/Ag HBs negativo, desde que esteja salvaguardada a possibilidade de profilaxia da infecção pelo VHB do receptor, de acordo com o órgão transplantado; esta norma não será considerada para idade pediátrica em situações não-emergentes.
7. Hepatite C:
  - a. A positividade do Anti VHC não exclui a possibilidade de doação, se salvaguardado o conhecimento em tempo útil da negatividade da carga viral, avaliado por TAN ou outro método equivalente.
  - b. Se a viremia for positiva, o enxerto pode ser utilizado em recetor com Anti VHC positivo e viremia também positiva, independentemente dos genótipos do dador e do receptor.
  - c. Na impossibilidade de conhecimento da viremia em tempo útil, deve ser assumido como positiva.
  - d. Em caso de utilização de um órgão proveniente de um dador Anti-VHC positivo, se houver indicação de tratamento antiviral com antivirais de ação direta para a hepatite C, esse tratamento tem de ser assegurado.
  - e. Quando da utilização de um enxerto hepático a fibrose deve ser escassa (F0 ou F1).



8. Não constituindo critérios de exclusão, devem ainda ser conhecidos os dados serológicos referentes a CMV, EBV e Treponema Pallidum, carecendo de terapêutica dirigida.
9. Em relação as doenças transmitidas por vectores emergentes, nomeadamente Dengue, vírus Zica e West Nile, remetem-se os procedimentos para normativas específicas a publicar de acordo com alertas da *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC).
- B) A utilização de órgão de dador com perfil serológico Anti HBc positivo/Ag HBs negativo ou Anti VHC positivo implicam um consentimento informado explícito, assinado pelo doente ou seu representante legal, em caso de impossibilidade do primeiro.
- C) Revogam-se as Circulares Normativas N.º 16/GDG/ASST, de 7 de setembro de 2009 e N.º 2/GDG/ASST, de 1 de abril de 2011.



Dr. João Paulo de Almeida e Sousa  
Presidente



Dr. Victor Marques  
Vogal

**BIBLIOGRAFIA:**

1. *Guide to the quality and safety of organs for transplantation. 6th Edition - EDQM*
2. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, Angus DC, Rubenfeld GD, Singer M; Sepsis Definitions Task Force. *Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA 2016;315:775-87.
3. Huprikar S, Danziger-Isakov L, Ahn J, Naugler S, Blumberg E, Avery RK, Koval C, Lease ED, Pillai A, Doucette KE, Levitsky J, Morris MI, Lu K, McDermott JK, Mone T, Orlowski JP, Dadhania DM, Abbott K, Horslen S, Laskin BL, Moudgil A, Venkat VL, Korenblat K, Kumar V, Grossi P, Bloom RD, Brown K, Kotton CN, Kumar D. *Solid organ transplantation from hepatitis B virus-positive donors: consensus guidelines for recipient management*. Am J Transplant. 2015;15:1162-72.
4. Terrault NA, McCaughan GW, Curry MP, et al. *International Liver Transplantation Society Consensus Statement on hepatitis C management in liver transplant candidates*. Transplantation. 2017;101:945-955.

9.1. Apêndice 1 – Dados do Caso 1 do Estudo de Quimerismo

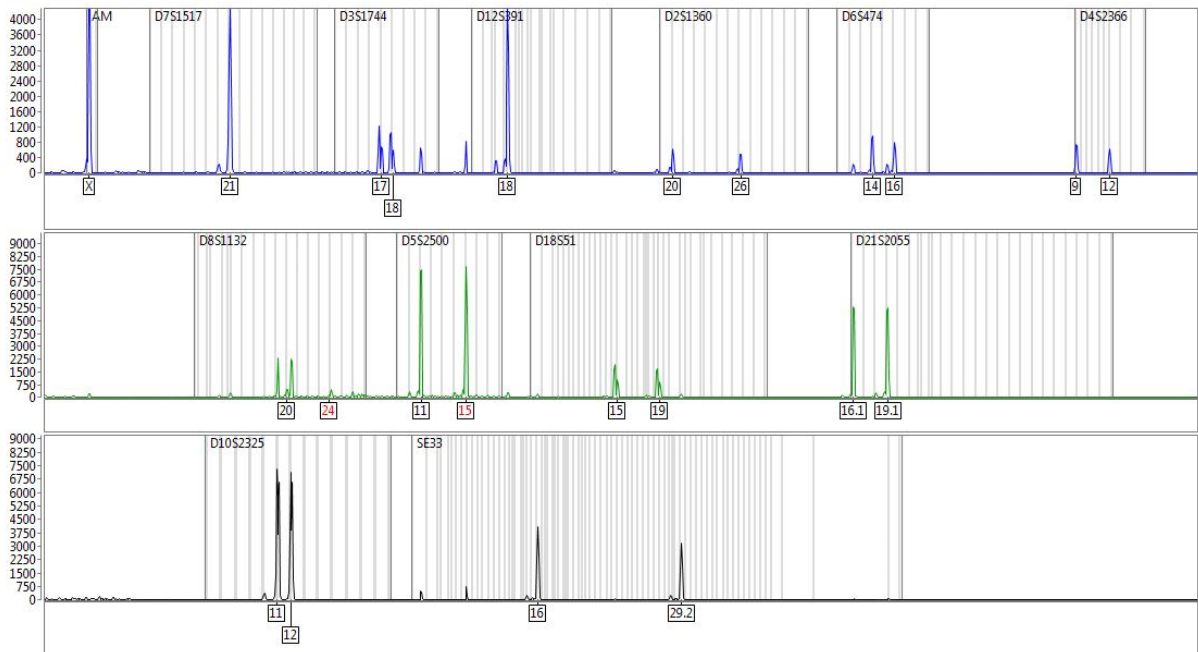


FIG 1 - Eletroferograma de referência do dador

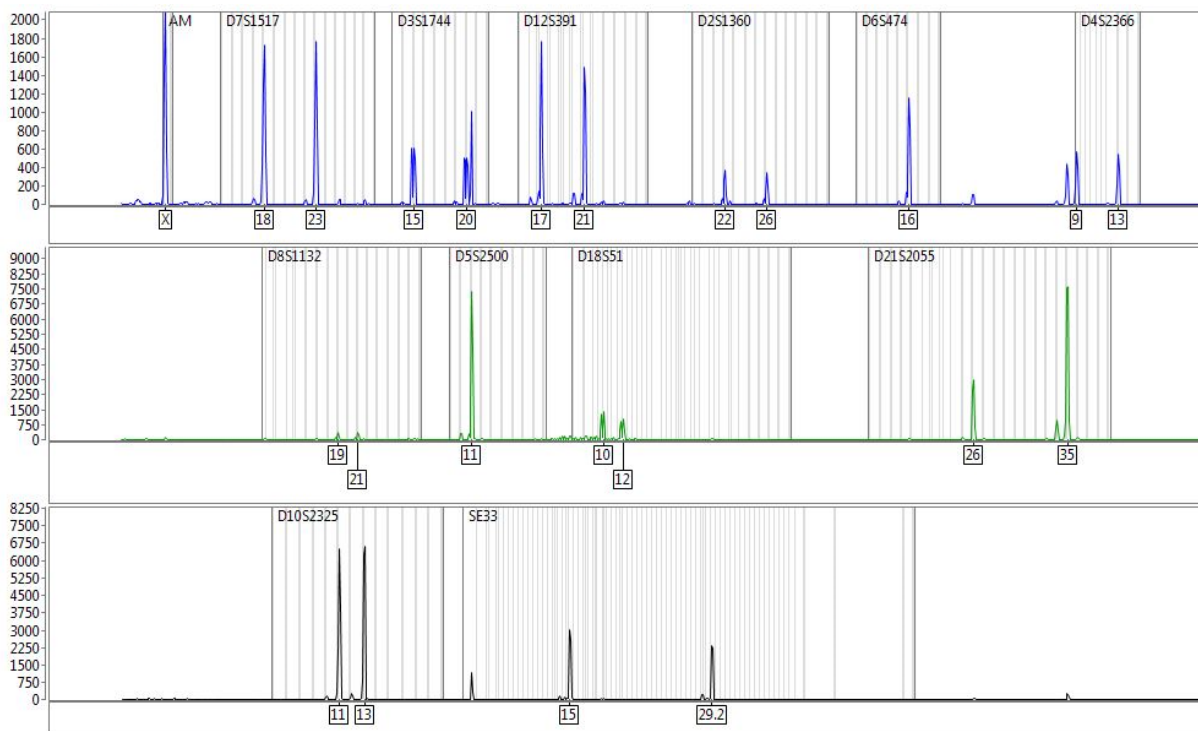
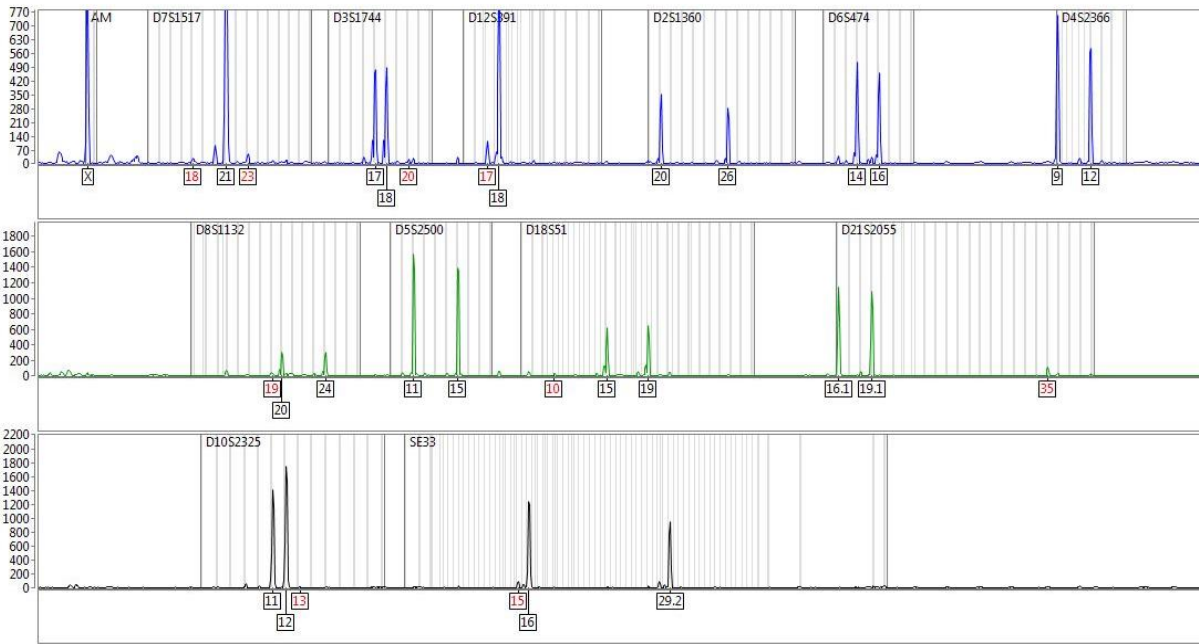
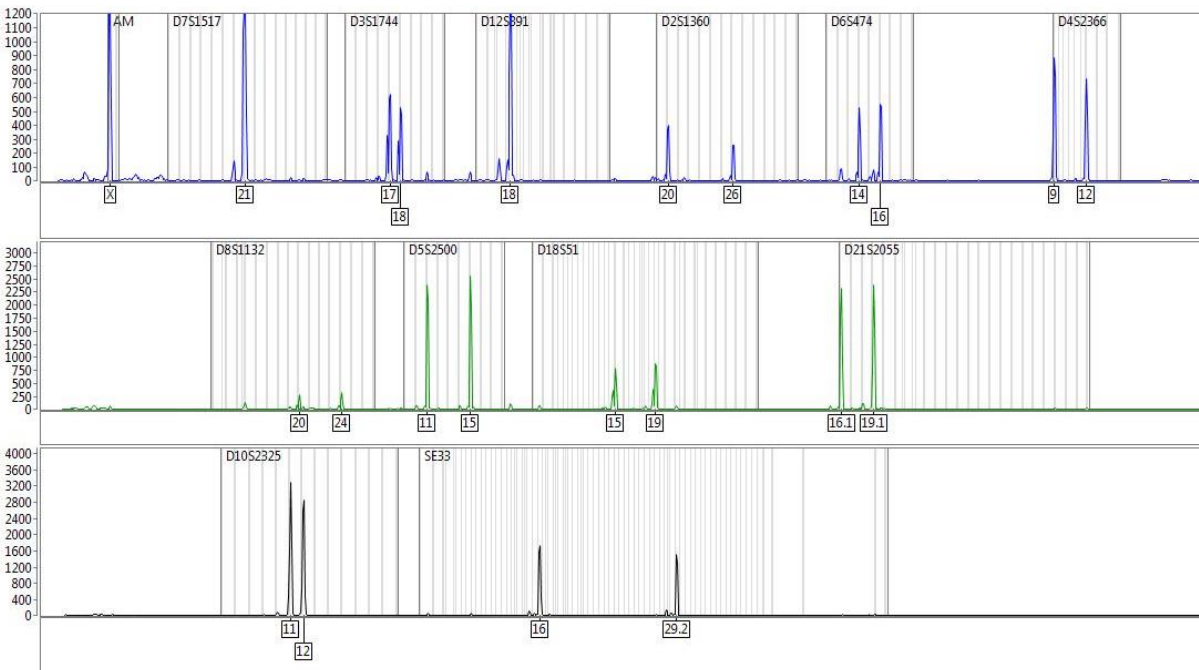


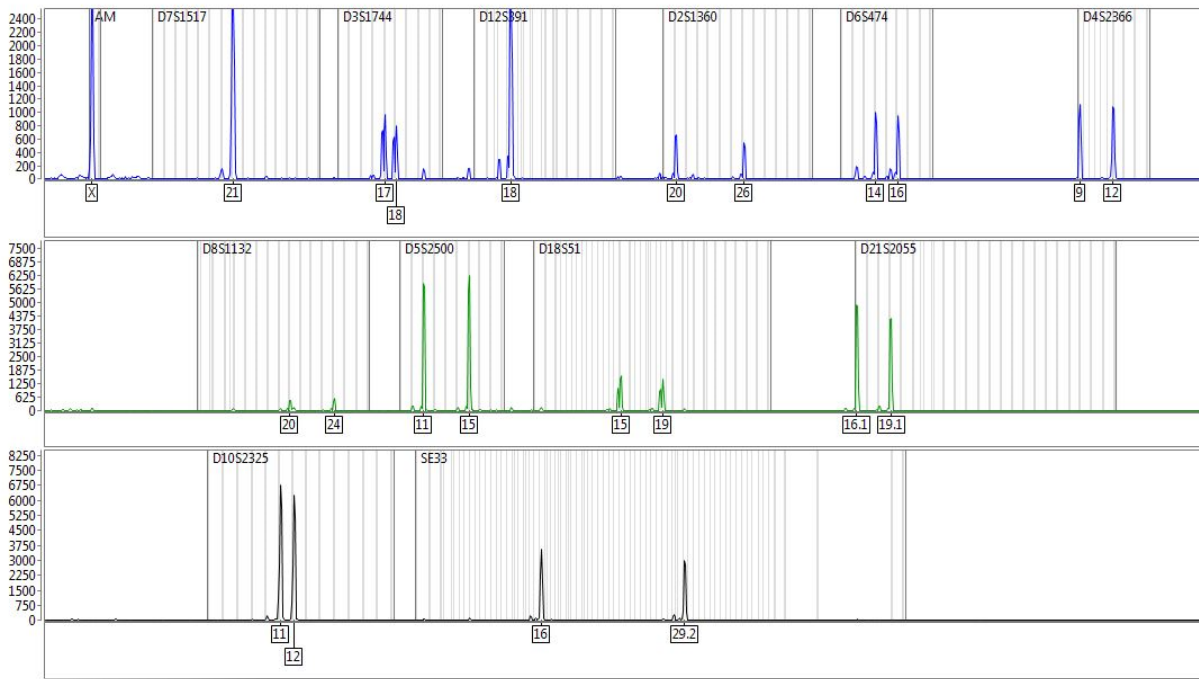
FIG 2- Eletroferograma de referência do recetor



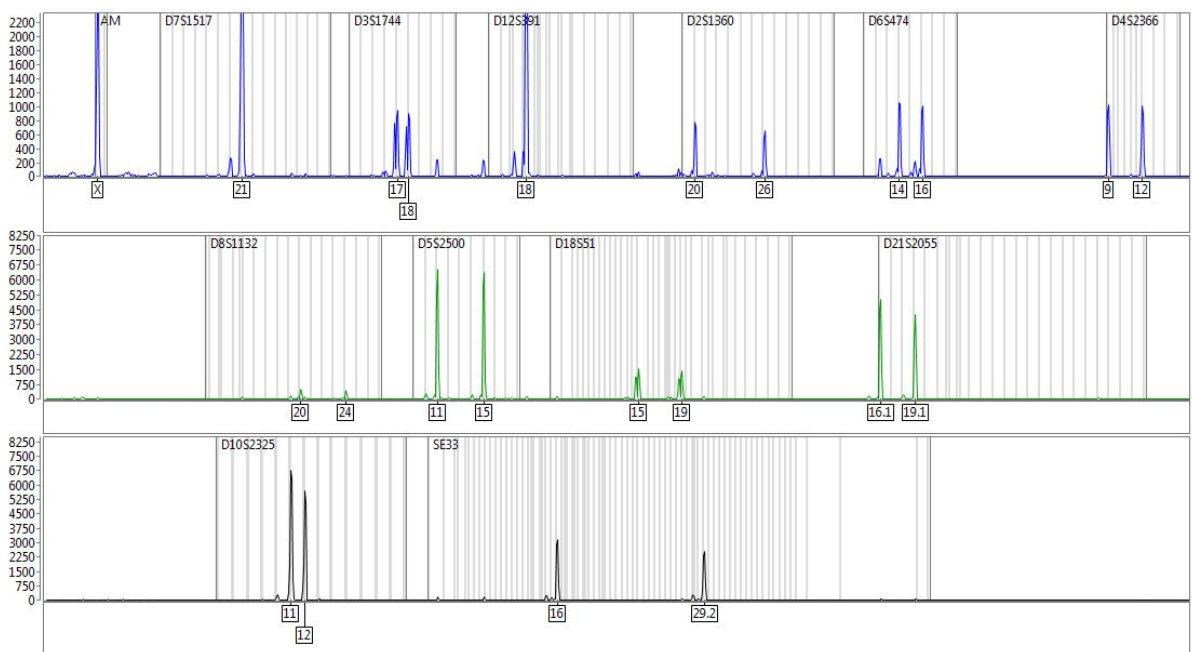
**FIG 3 -** Eletroferograma CD3+, 31 dias após transplante



**FIG 4 -** Eletroferograma CD33+, 31 dias após transplante



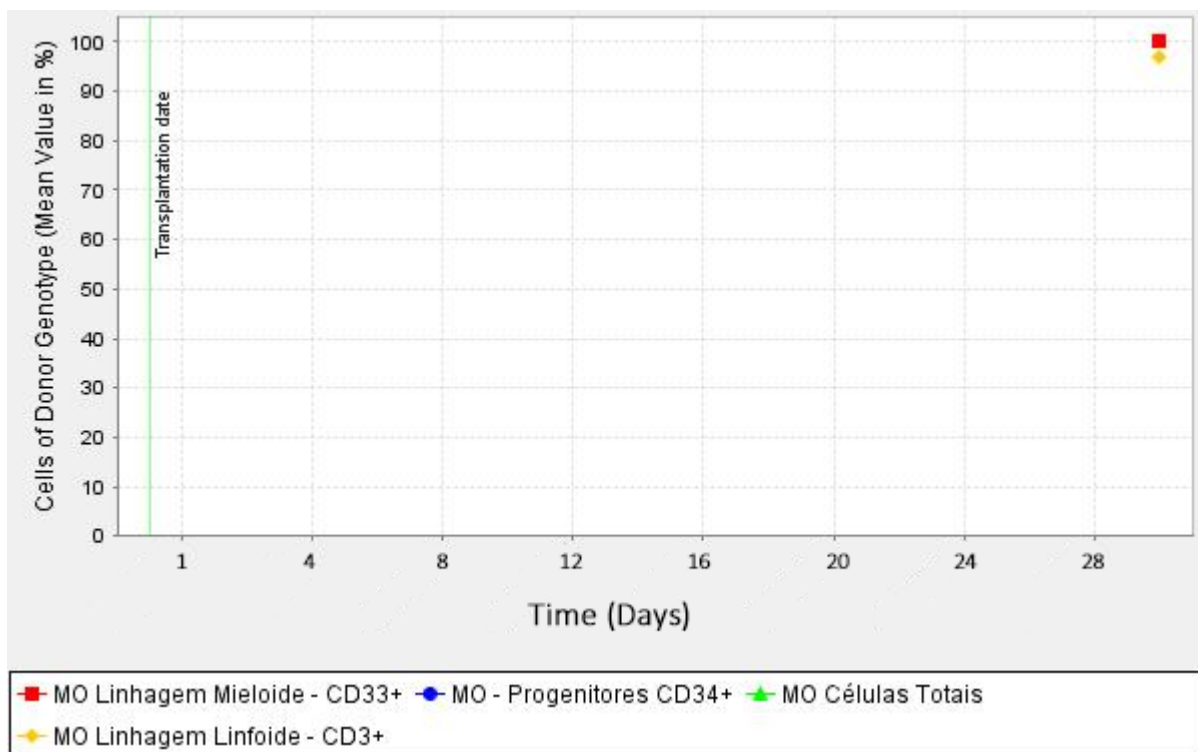
**FIG 5** – Eletroferograma CD34+, 31 dias após transplante



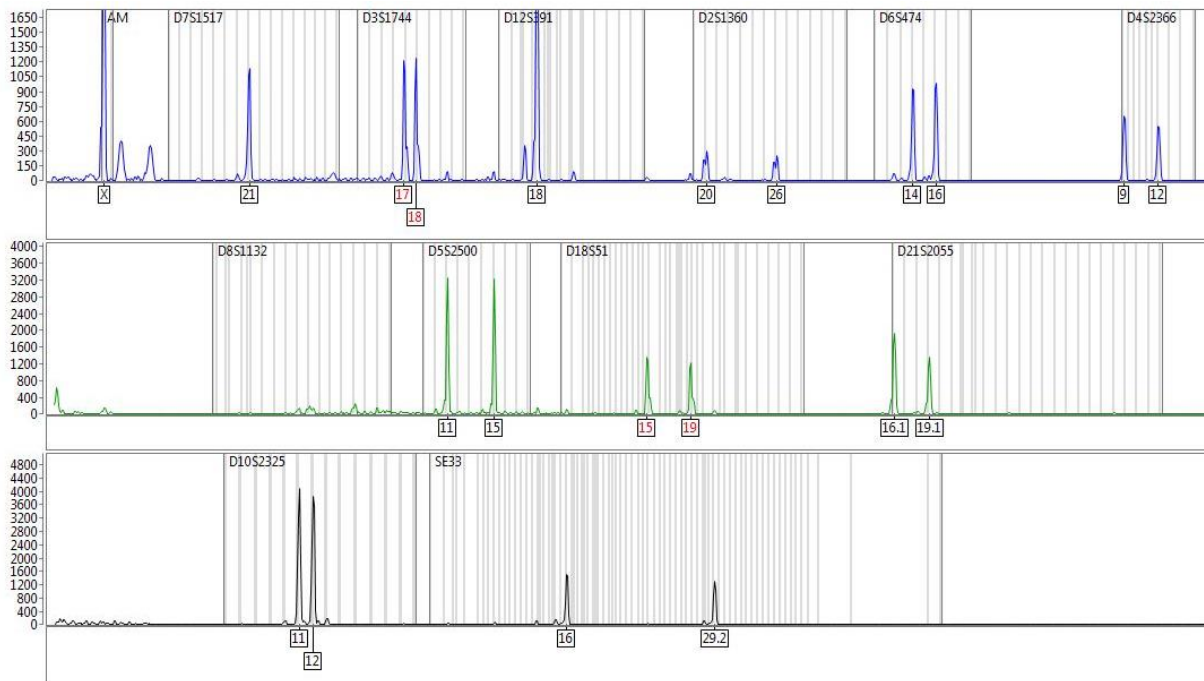
**FIG 6** - Eletroferograma pós-transplante Células Totais, 31 dias após transplante

**TAB 1** - Frequência do genótipo do dador após 31 dias de transplante

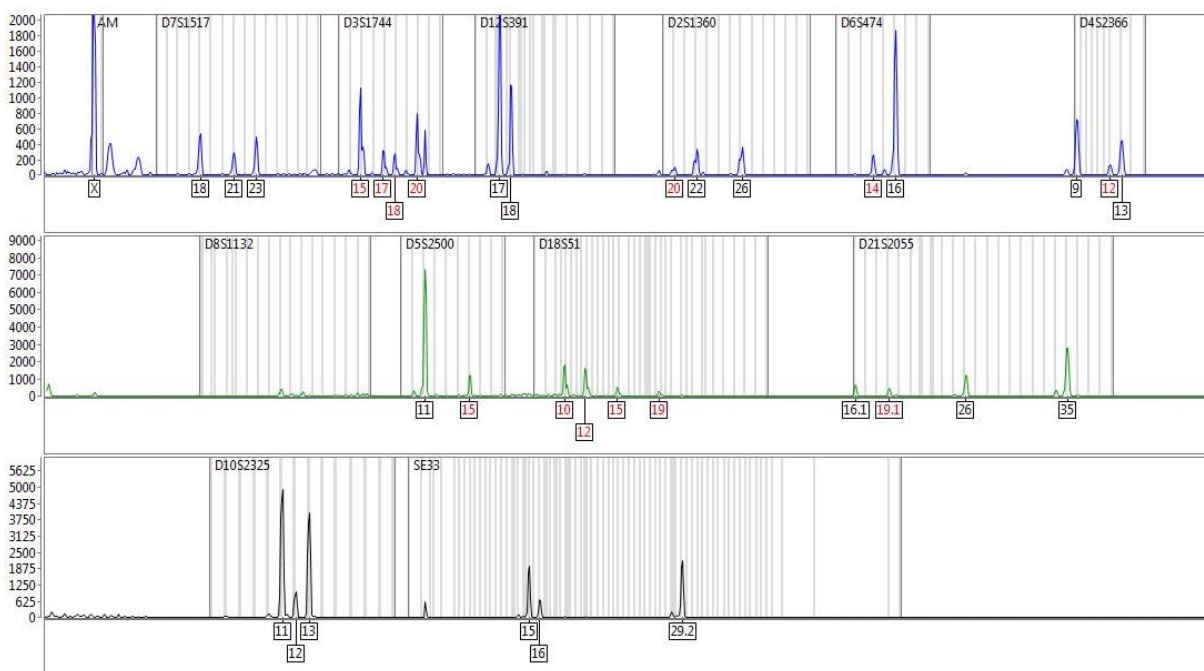
Day after transplantation	31	31	31	31
D7S1517	0.95	1.00	1.00	1.00
D3S1744	0.98	1.00	1.00	1.00
D12S391	0.93	1.00	1.00	1.00
D2S1360	1.00	1.00	1.00	1.00
D6S474	1.00	NI	NI	1.00
D4S2366	1.00	1.00	1.00	1.00
D8S1132	1.00	1.00	1.00	1.00
D5S2500	0.94	1.00	NI	NI
D18S51	0.98	1.00	1.00	1.00
D21S2055	0.95	1.00	1.00	1.00
D10S2325	0.98	1.00	1.00	1.00
SE33	0.93	1.00	1.00	1.00
Mean	0.97	1.00	1.00	1.00
Standard deviation	0.03	0.00	0.00	0.00



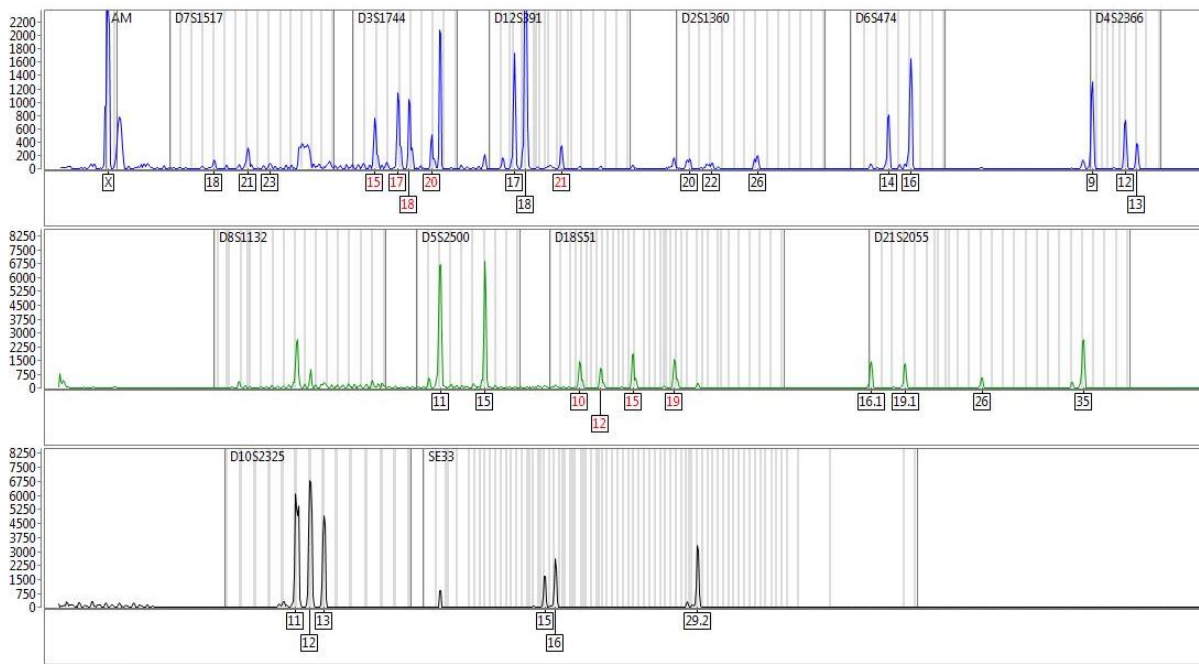
**Gráfico 1**- Gráfico da evolução das populações no recetor ao longo do tempo.



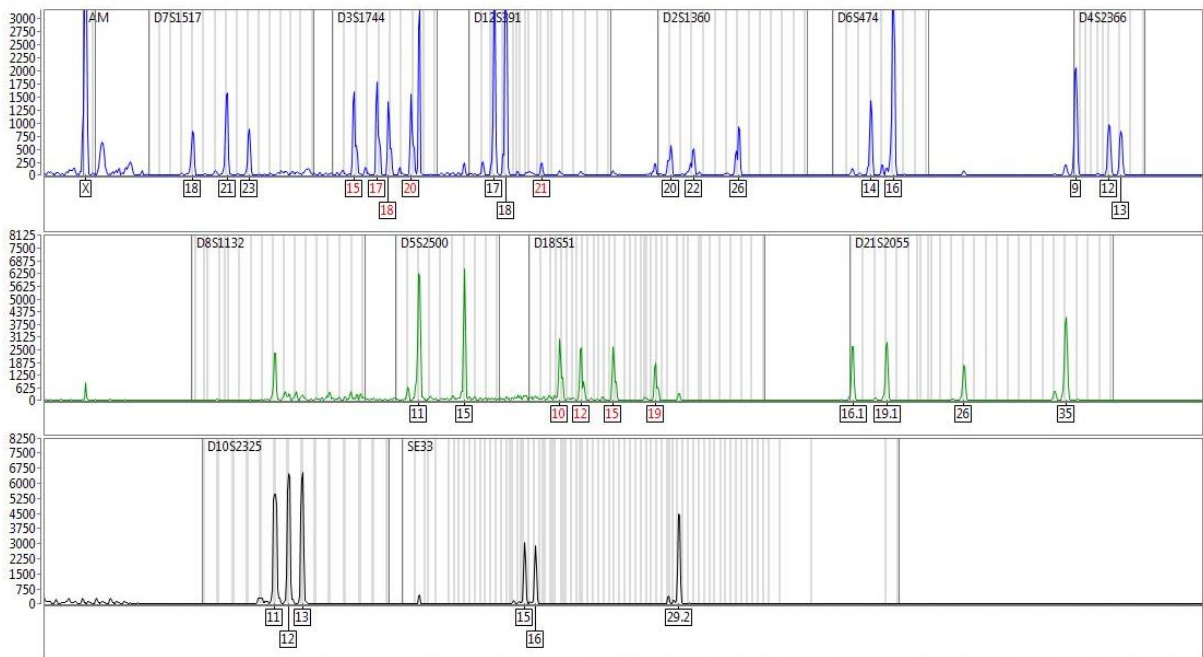
**FIG 7 - Eletroferograma pós-transplante CD3+, 262 dias após transplante**



**FIG 8 - Eletroferograma pós-transplante CD33+, 262 dias após transplante**



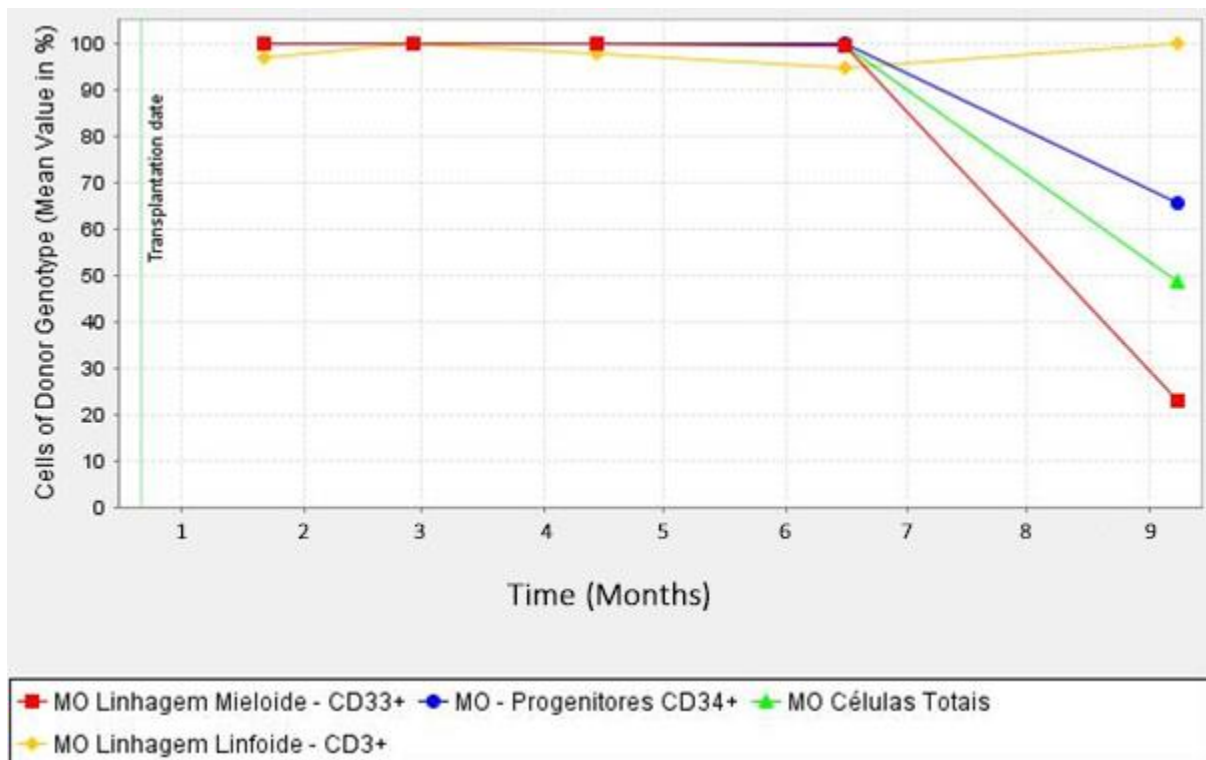
**FIG 9** - Eletroferograma pós-transplante CD34+, 262 dias após transplante



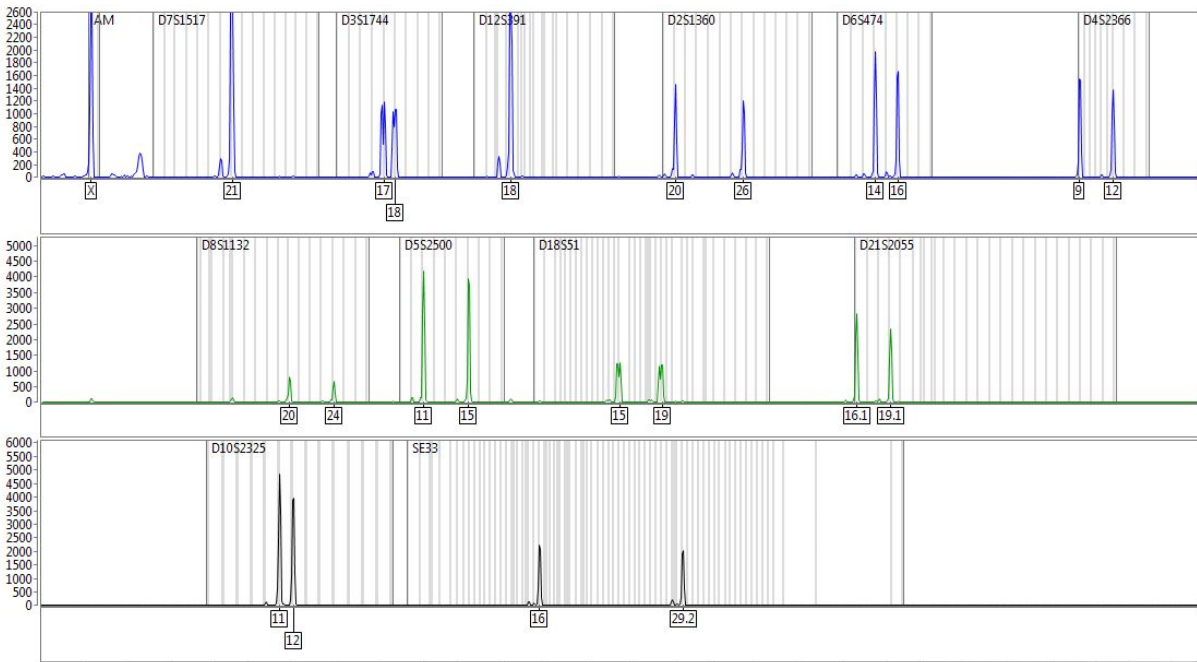
**FIG 10** - Eletroferograma pós-transplante Células Totais, 262 dias após transplante

**TAB 2-Freqüência do genótipo do dador após 262 dias do transplante**

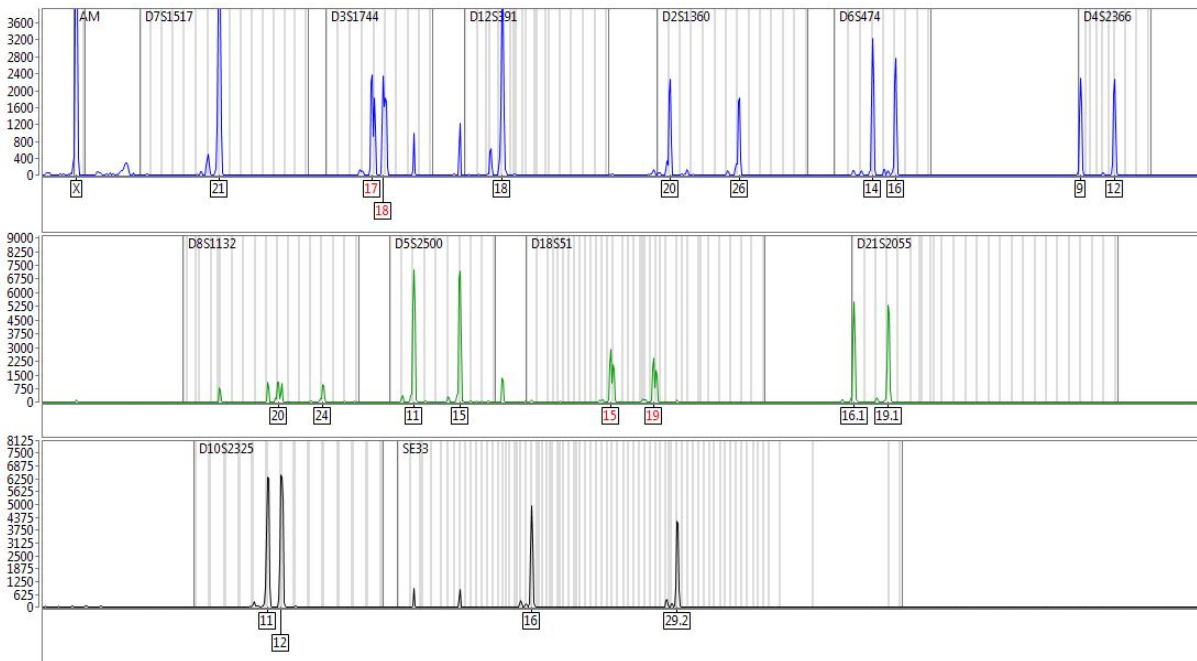
Day after transplantation	262	262	262	262
D7S1517	1.00	0.23	0.47	0.62
D3S1744	1.00	0.24	0.50	NI
D12S391	1.00	NI	NI	0.73
D2S1360	1.00	0.24	0.51	0.69
D6S474	NI	0.24	0.47	0.65
D4S2366	1.00	0.23	0.53	0.65
D8S1132	NI	NI	NI	NI
D5S2500	NI	0.30	NI	NI
D18S51	1.00	0.19	0.44	NI
D21S2055	1.00	0.19	0.45	NI
D10S2325	1.00	0.20	0.52	0.62
SE33	1.00	0.25	0.49	0.62
Mean	1.00	0.23	0.49	0.65
Standard deviation	0.00	0.03	0.03	0.04



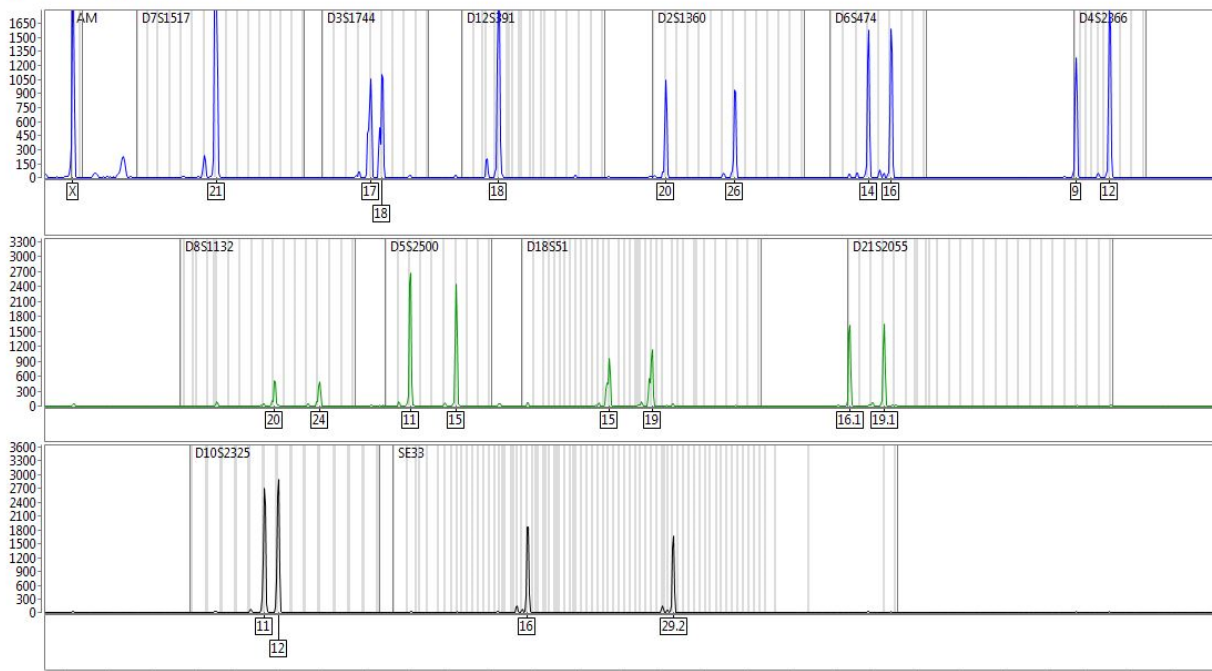
**Gráfico 2** - Gráfico da evolução das populações no recetor ao longo do tempo, 262 dias após transplante



**FIG 11 - Eletroferograma CD3+, 422 dias após transplante**



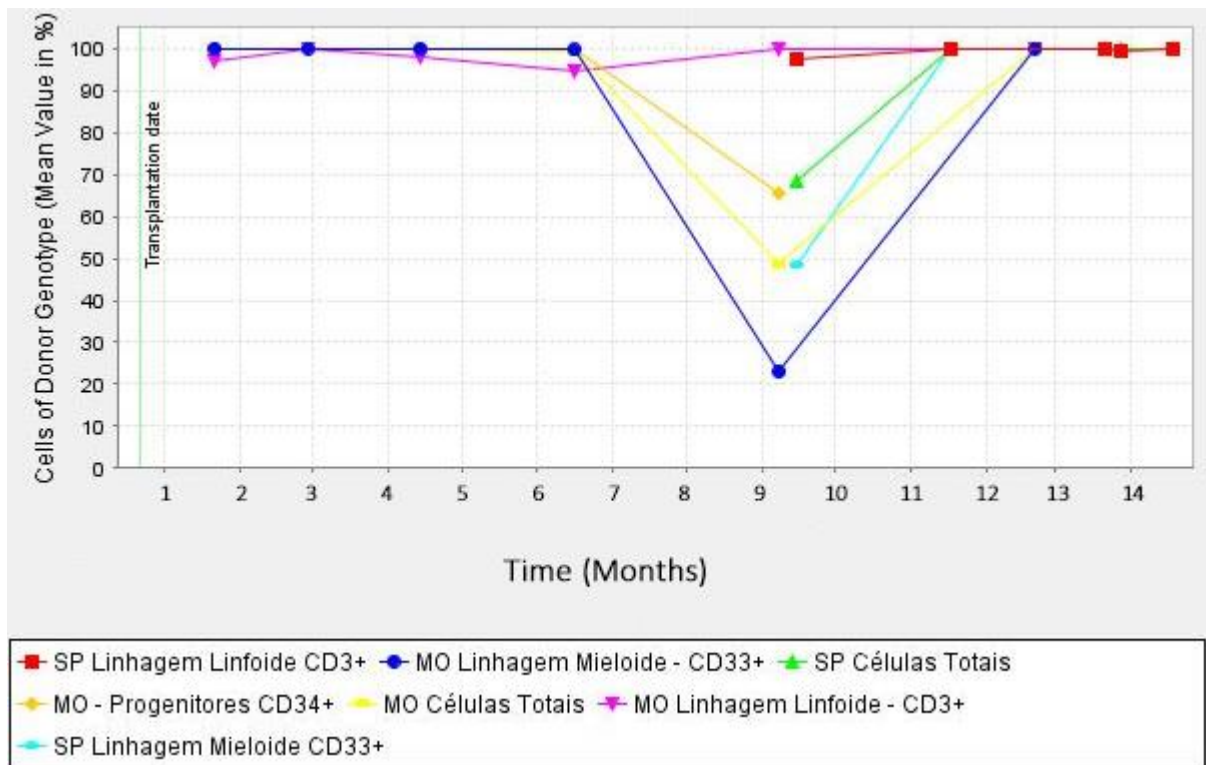
**FIG 12 - Eletroferograma CD33+, 422 dias após transplante**



**FIG 13-** Eletroferograma Células Totais, 422 dias após transplante

**TAB 3-** Frequência do genótipo do dador, após 422 dias do transplante

Day after transplantation	422	422	422
<b>D7S1517</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D3S1744</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D12S391</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D2S1360</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D6S474</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D4S2366</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D8S1132</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D5S2500</b>	NI	1.00	NI
<b>D18S51</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D21S2055</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D10S2325</b>	1.00	1.00	1.00
<b>SE33</b>	1.00	1.00	1.00
<b>Mean</b>	1.00	1.00	1.00
<b>Standard deviation</b>	0.00	0.00	0.00



**Gráfico 3** - Gráfico da evolução das populações no recetor ao longo do tempo, 262 dias após transplante

## 9.2. Apêndice 2 – Dados do Caso 2 do Estudo de Quimerismo

### PARTE I – 1º Transplante Alogênico Relacionado

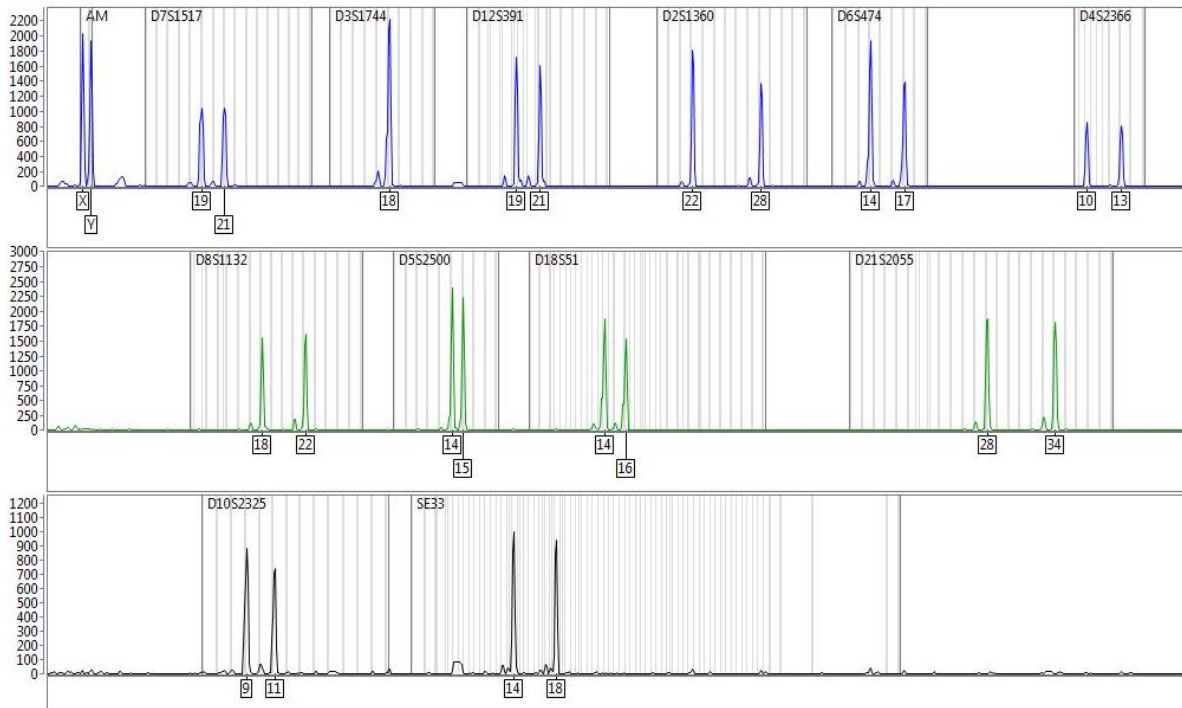


FIG 1- Eletoferograma de referência do dador

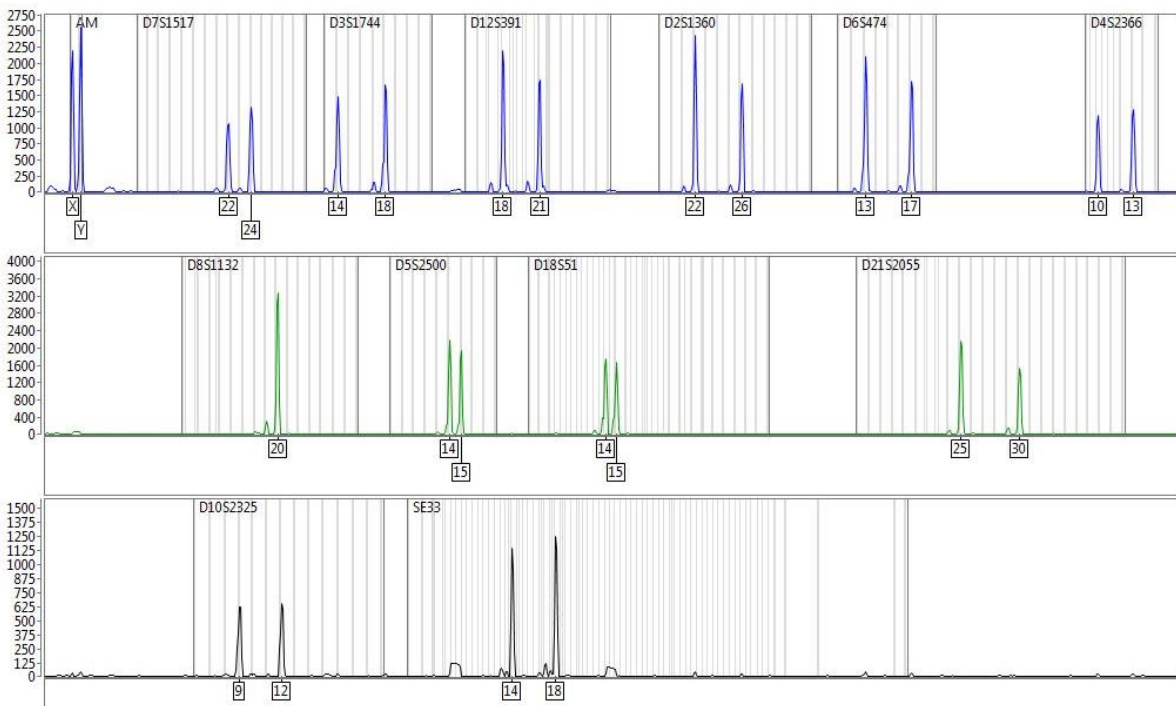
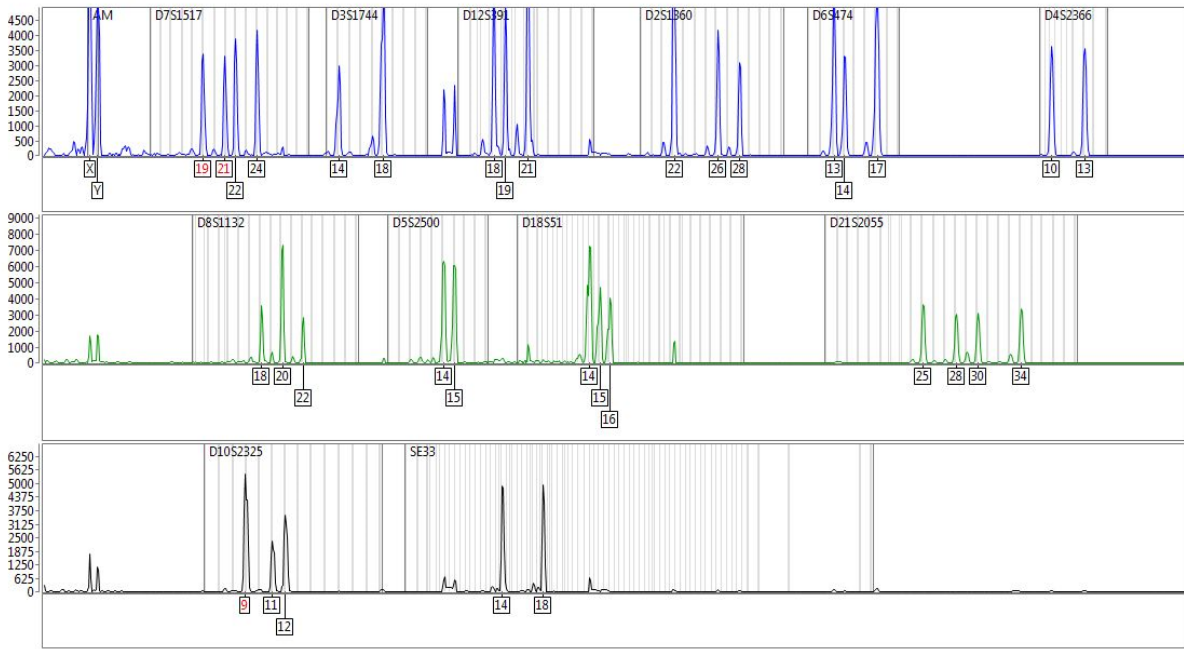
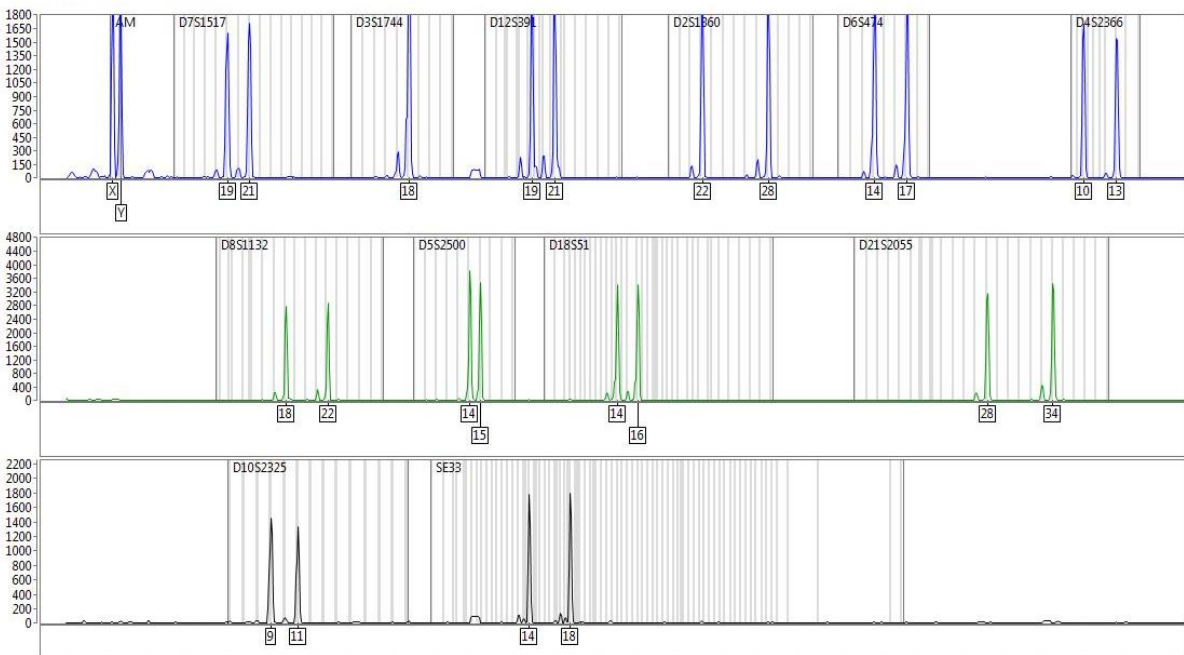


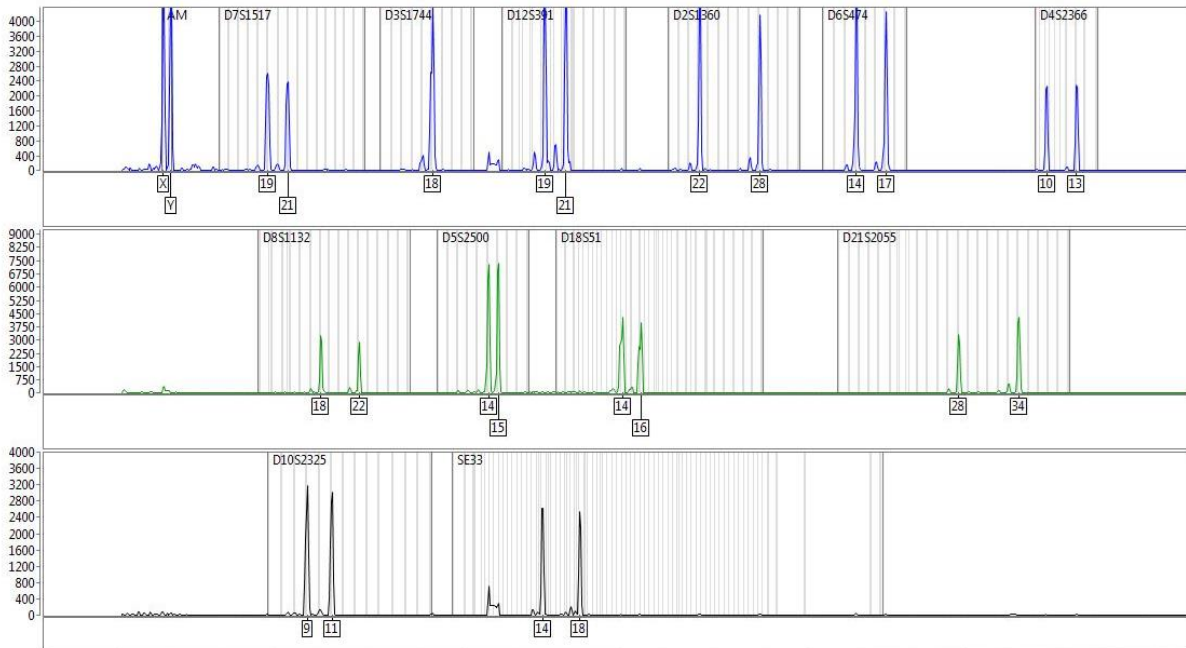
FIG 2- Eletoferograma de referência do recetor



**FIG 3-** Eletroferograma pós-transplante CD3+, 29 dias após transplante



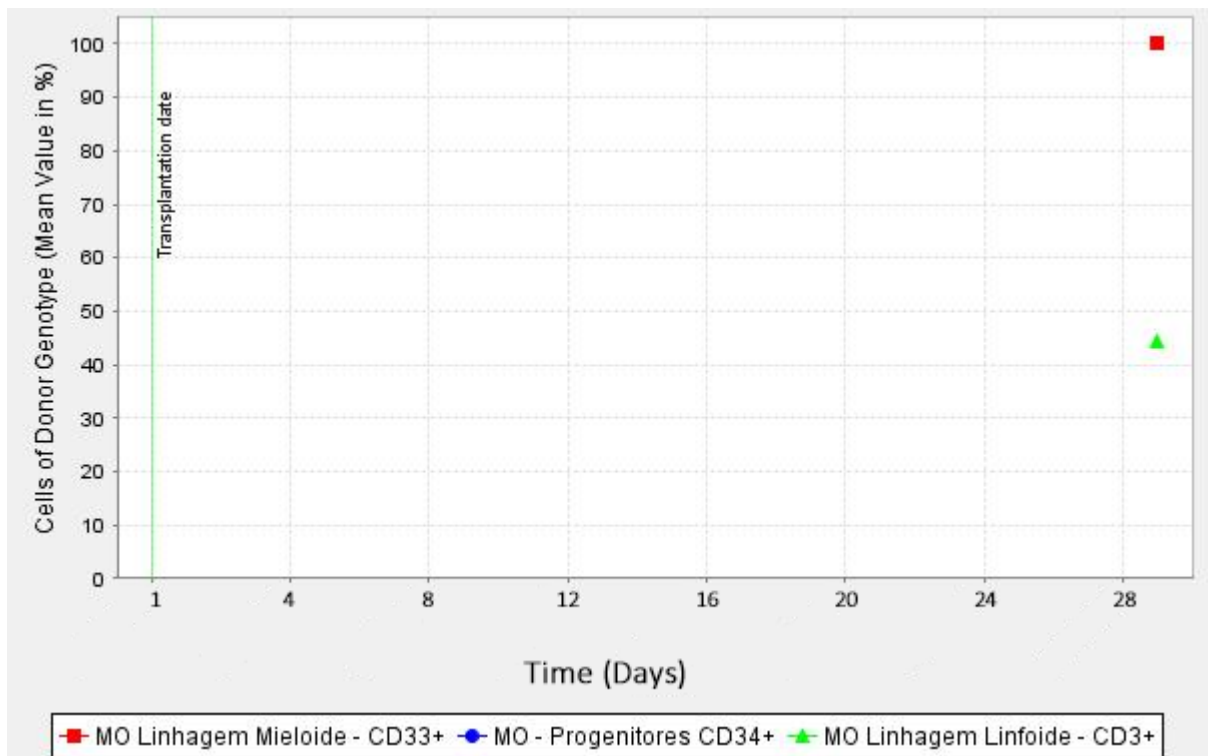
**FIG 4-** Eletroferograma pós-transplante CD33+, 29 dias após transplante



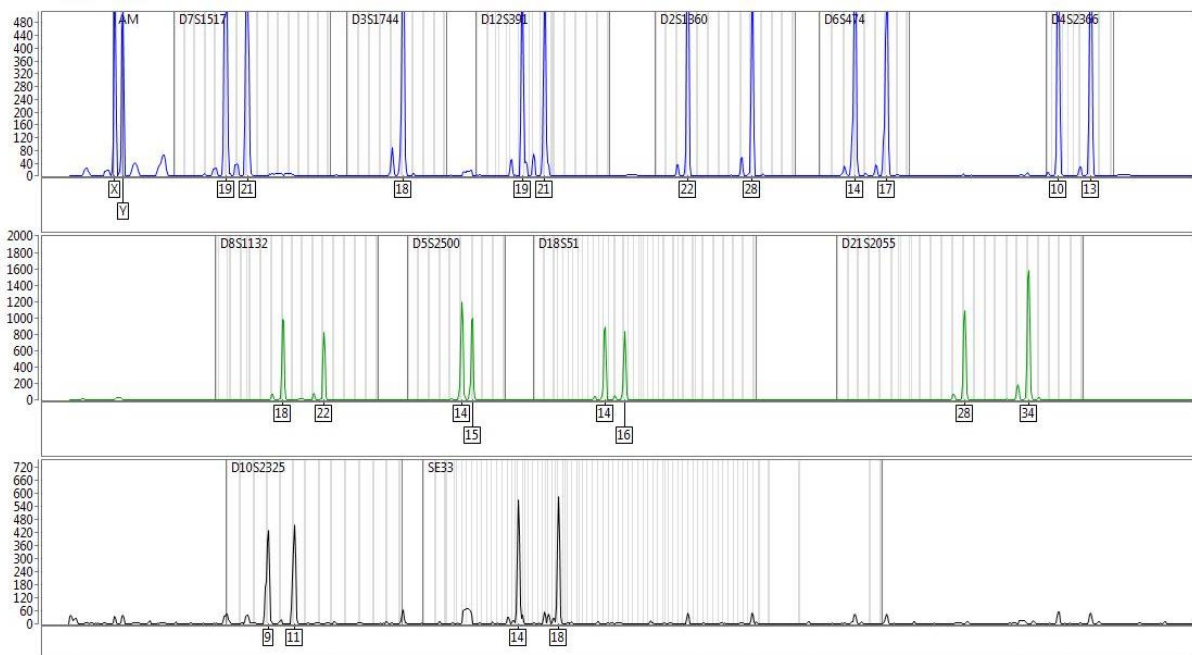
**FIG 5-** Eletroferograma pós-transplante CD34+, 29 dias após transplante

**TAB 1-** Frequência do genótipo do dador após 29 dias do transplante

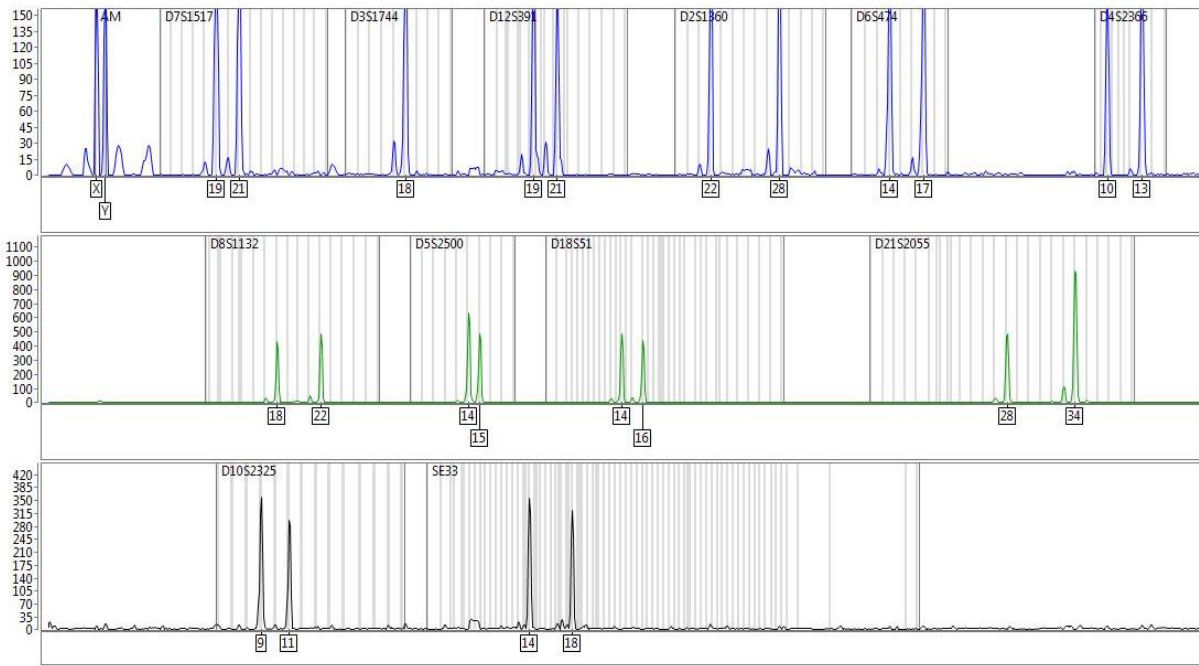
Day after transplantation	29	29	29
<b>D7S1517</b>	0.46	1.00	1.00
<b>D3S1744</b>	0.45	1.00	1.00
<b>D12S391</b>	0.43	1.00	1.00
<b>D2S1360</b>	0.43	1.00	1.00
<b>D6S474</b>	0.40	1.00	1.00
<b>D4S2366</b>	NI	NI	NI
<b>D8S1132</b>	0.46	1.00	1.00
<b>D5S2500</b>	NI	NI	NI
<b>D18S51</b>	0.46	1.00	1.00
<b>D21S2055</b>	0.49	1.00	1.00
<b>D10S2325</b>	0.41	1.00	1.00
<b>SE33</b>	NI	NI	NI
<b>Mean</b>	0.44	1.00	1.00
<b>Standard deviation</b>	0.03	0.00	0.00



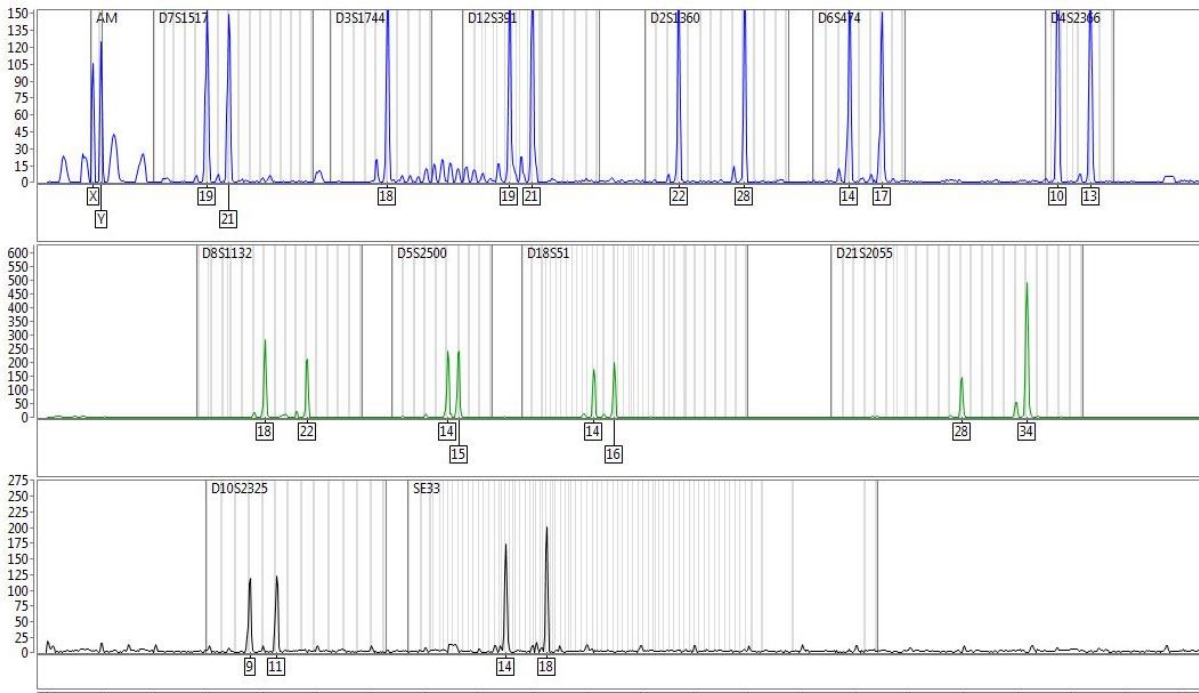
**Gráfico 1** - Gráfico da evolução das populações no recetor ao longo do tempo, 29 dias pós transplante



**FIG 6**- Eletroferograma pós-transplante CD3+, 252 dias após transplante



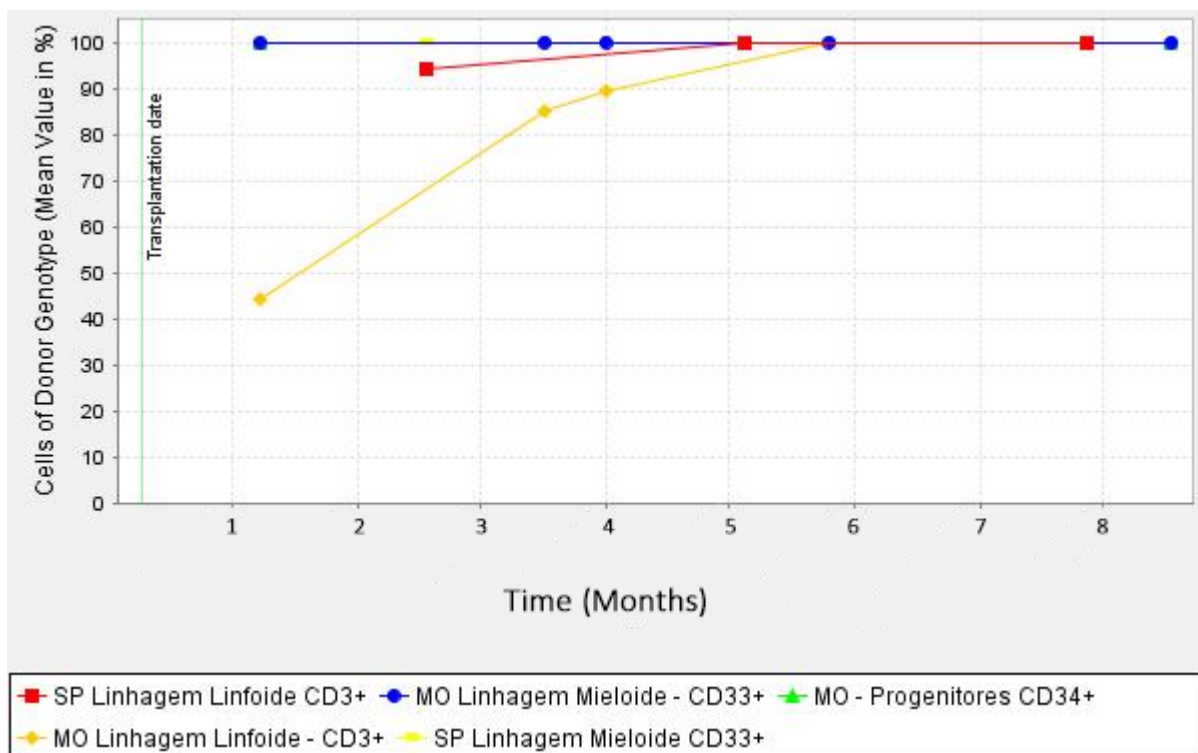
**FIG 7-** Eletroferograma pós-transplante CD33+, 252 dias após transplante



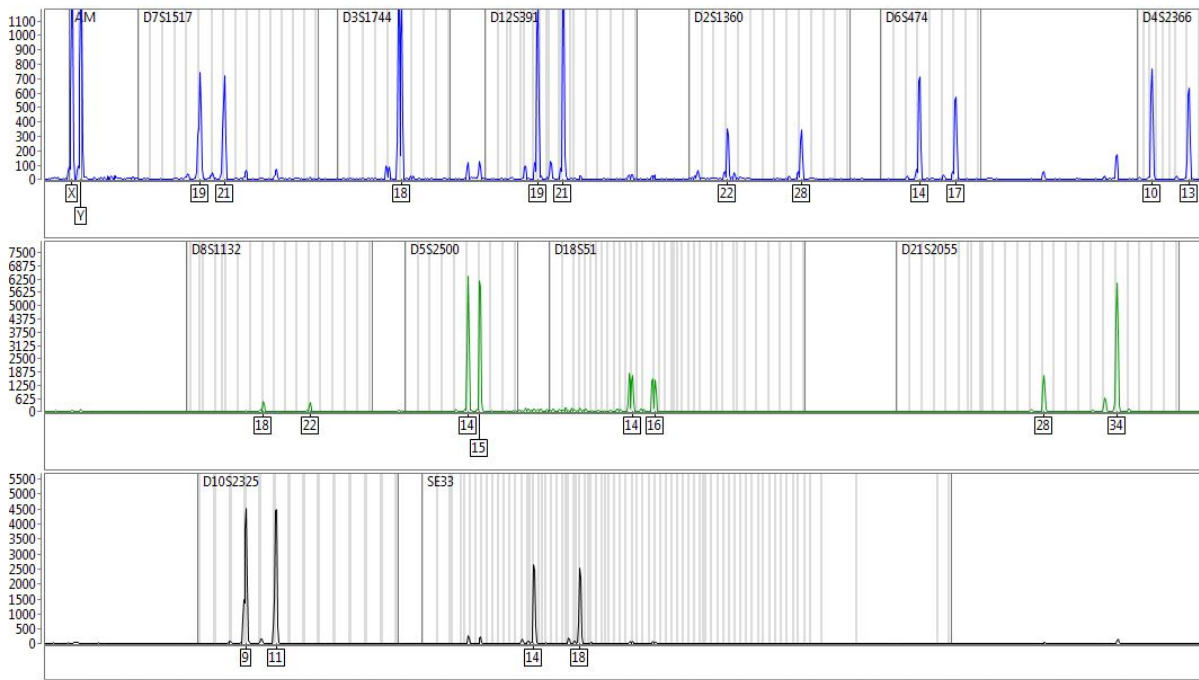
**FIG 8-** Eletroferograma pós-transplante CD34+, 252 dias após transplante

**TAB 2-** Frequência do genótipo do dador, após 252 dias do transplante

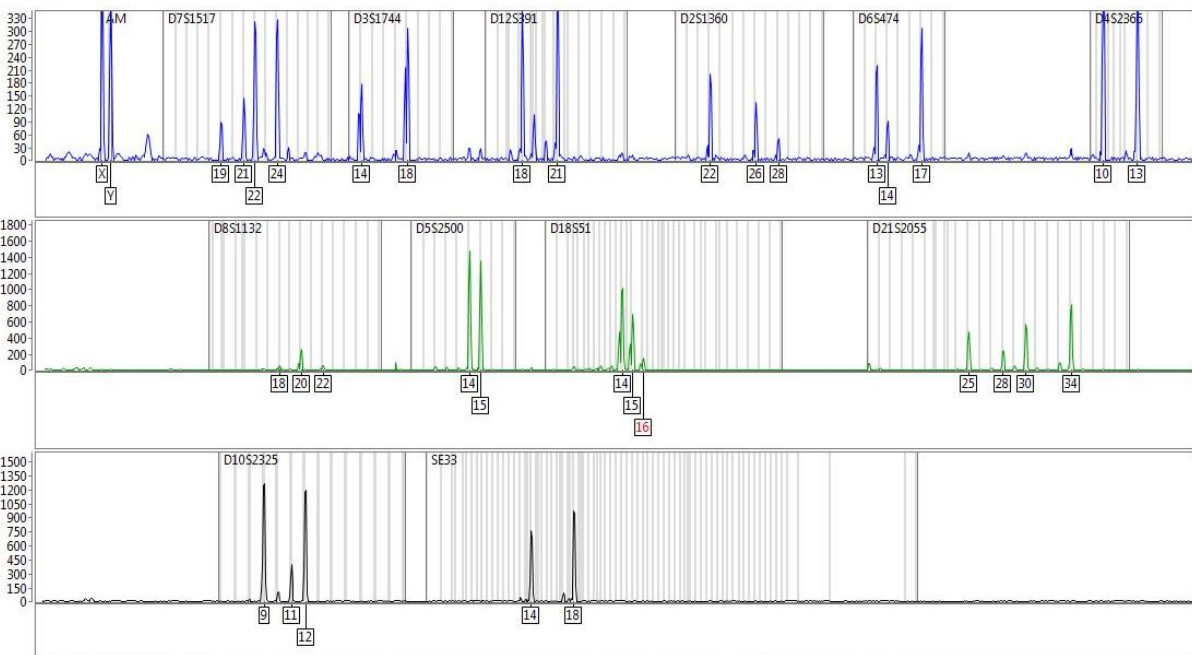
Day after transplantation	252	252	252
D7S1517	1.00	1.00	1.00
D3S1744	1.00	1.00	1.00
D12S391	1.00	1.00	1.00
D2S1360	1.00	1.00	1.00
D6S474	1.00	1.00	1.00
D4S2366	NI	NI	NI
D8S1132	1.00	1.00	1.00
D5S2500	NI	NI	NI
D18S51	1.00	1.00	1.00
D21S2055	1.00	1.00	1.00
D10S2325	1.00	1.00	1.00
SE33	NI	NI	NI
Mean	1.00	1.00	1.00
Standard deviation	0.00	0.00	0.00



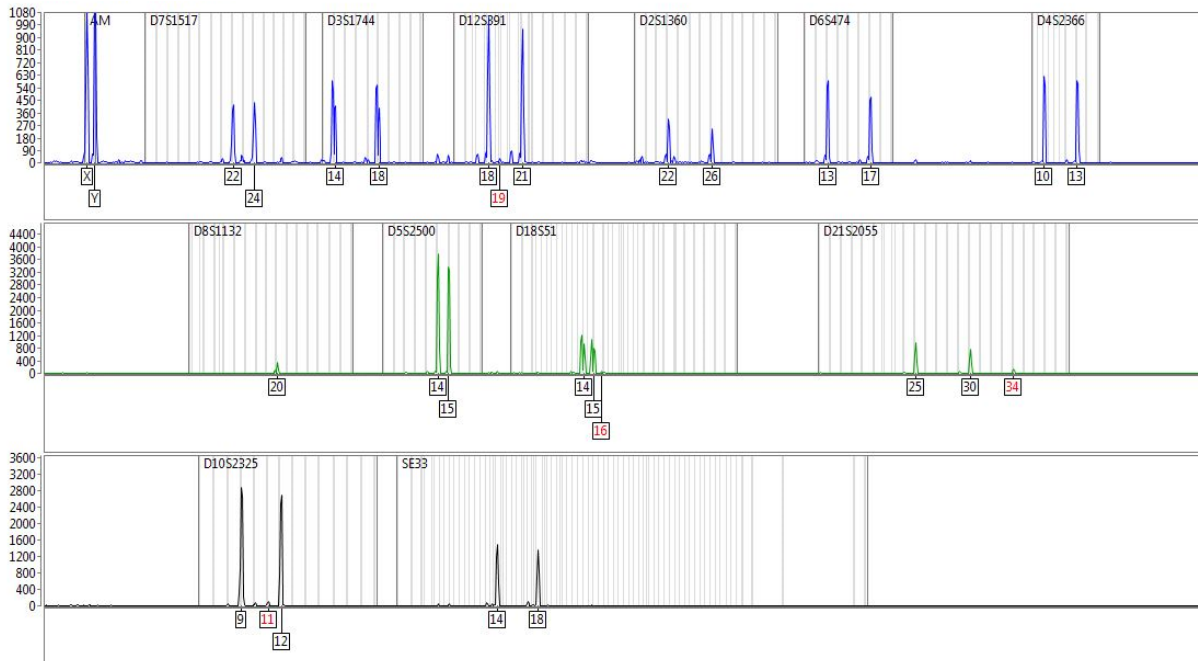
**Gráfico 2** - Gráfico da evolução das populações no recetor ao longo do tempo, 252 dias após transplante



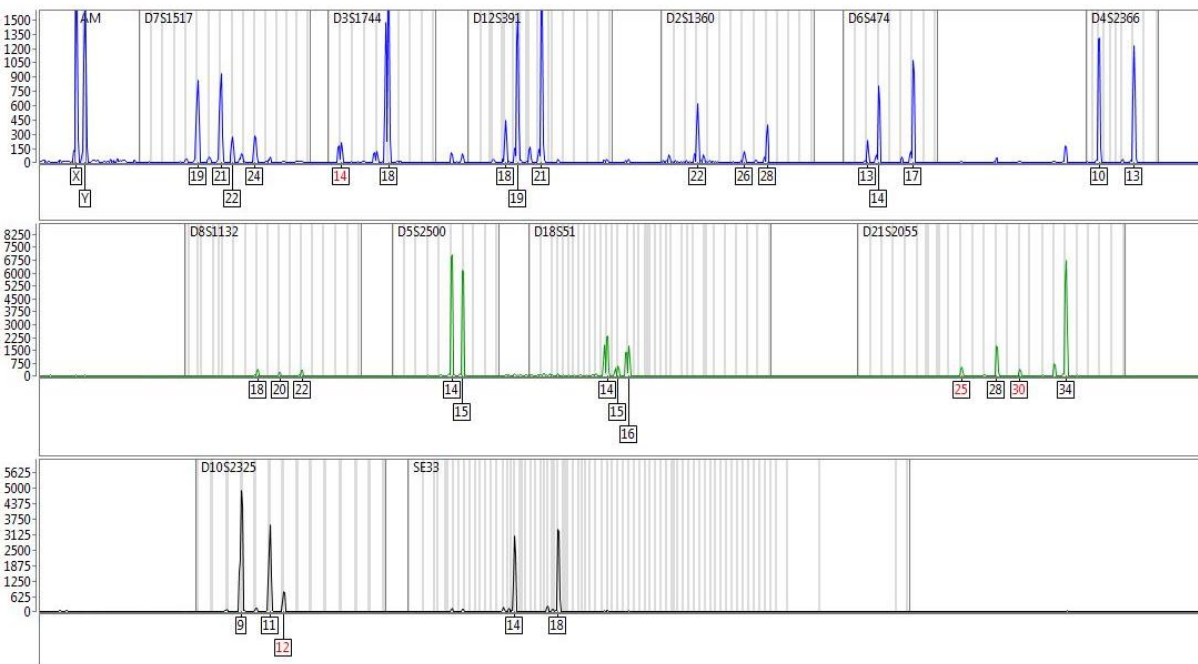
**FIG 9-** Eletroferograma pós-transplante CD3+, 1801 dias após transplante



**FIG 10-** Eletroferograma pós-transplante CD33+, 1801 dias após transplante



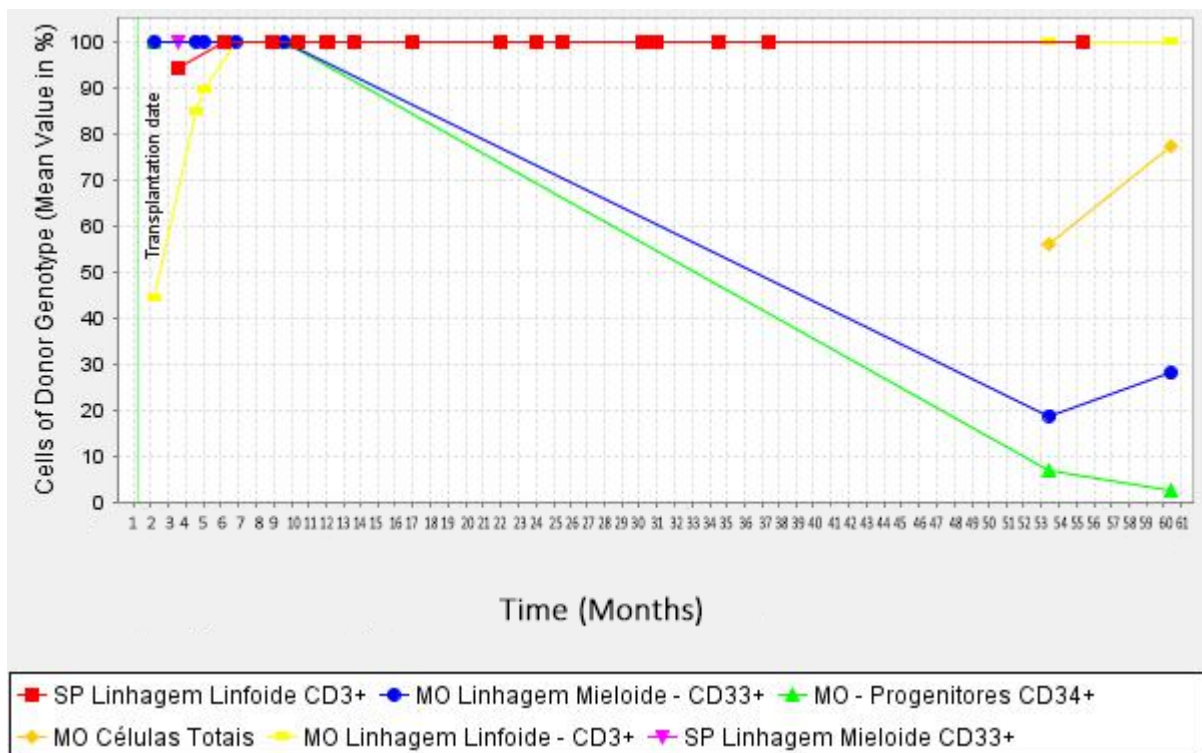
**FIG 11-** Eletroferograma pós-transplante CD34+, 1801 dias após transplante



**FIG 12-** Eletroferograma pós-transplante Celulas Totais, 1801 dias após transplante

**TAB 3-** Frequência do genótipo do dador após 1801 dias do transplante

Day after transplantation	1801	1801	1801	1801
D7S1517	1.00	0.27	0.00	0.77
D3S1744	1.00	0.27	0.00	0.78
D12S391	NI	NI	0.03	0.77
D2S1360	1.00	0.30	0.00	0.76
D6S474	1.00	0.30	0.00	0.78
D4S2366	NI	NI	NI	NI
D8S1132	1.00	NI	0.00	0.76
D5S2500	NI	NI	NI	NI
D18S51	1.00	NI	0.08	0.76
D21S2055	1.00	NI	0.08	
D10S2325	1.00	0.25	0.04	0.81
SE33	NI	NI	NI	NI
Mean	1.00	0.28	0.03	0.77
Standard deviation	0.00	0.02	0.03	0.02



**Gráfico 3** - Gráfico da evolução das populações no recetor ao longo do tempo, 1801 dias após transplante

## PARTE II – 2º Transplante Alogênico Não Relacionado

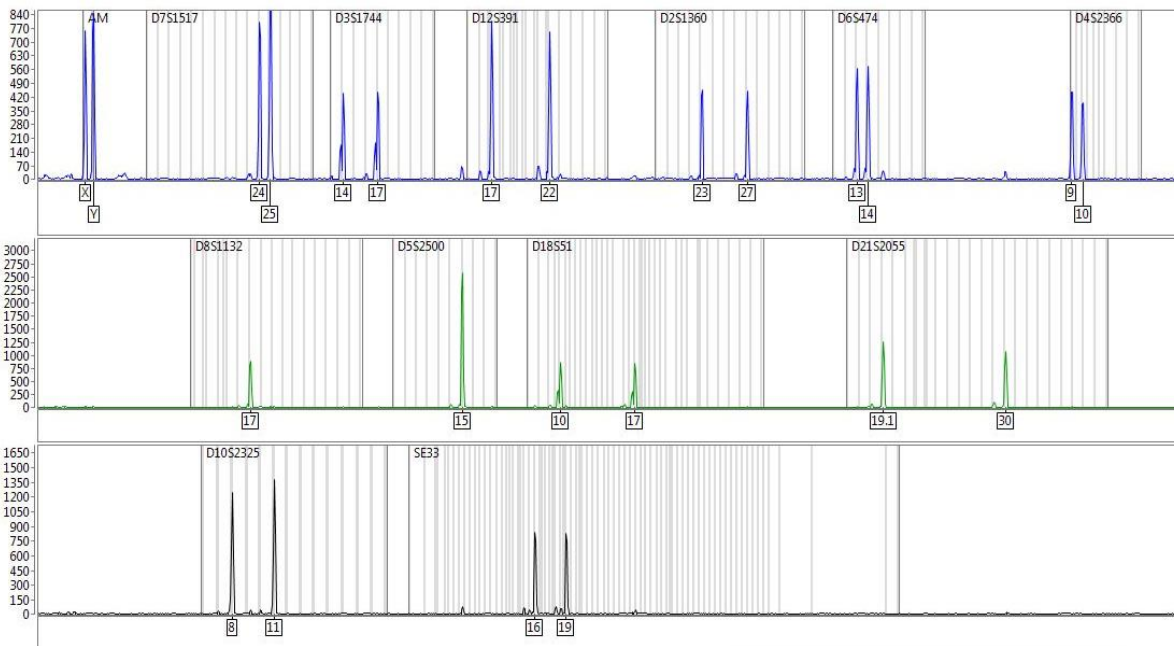


FIG 13- Eletróferograma de referência do doador

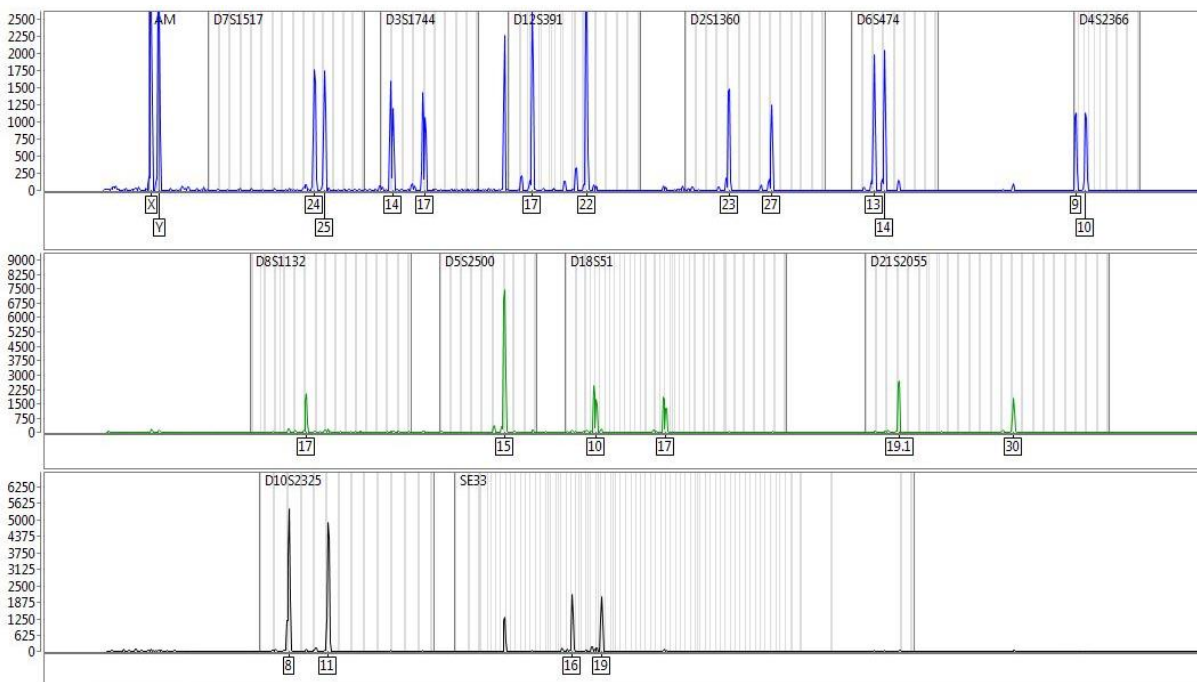
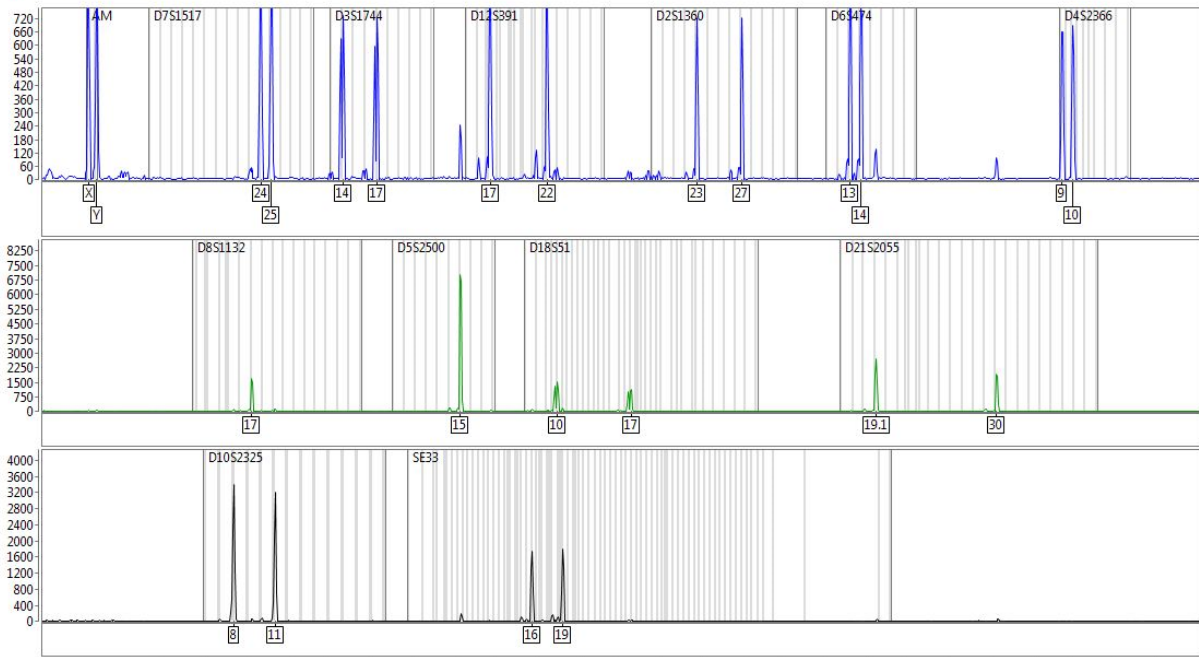
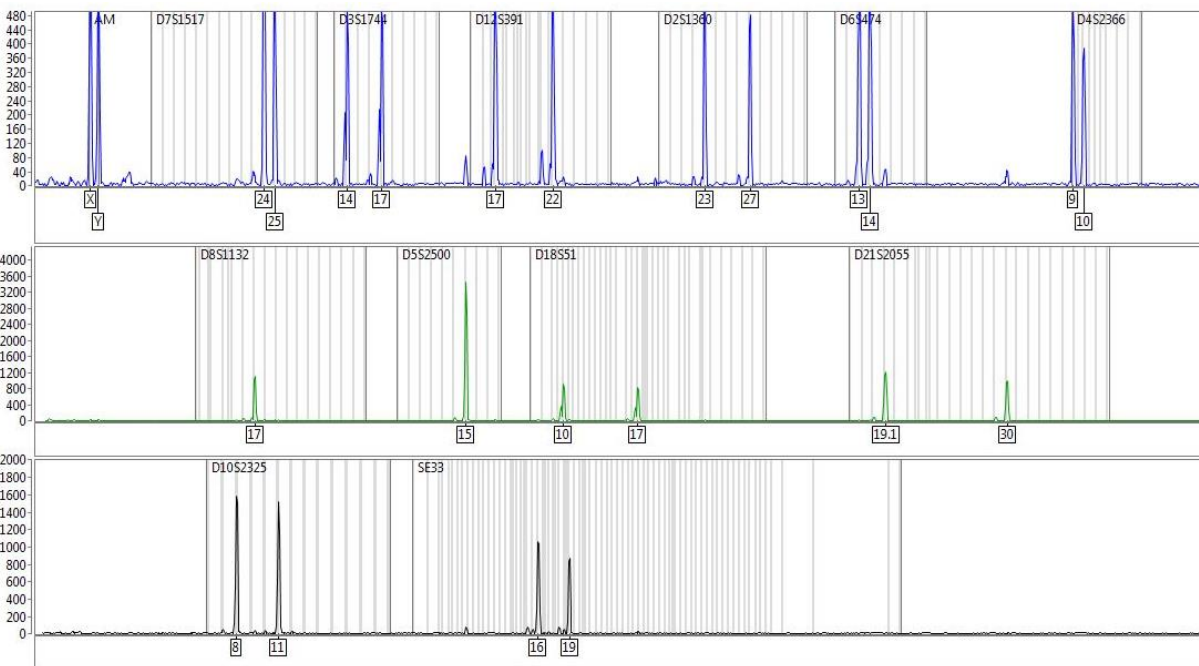


FIG 14- Eletróferograma pós-transplante CD3+, 28 dias após 2º transplante



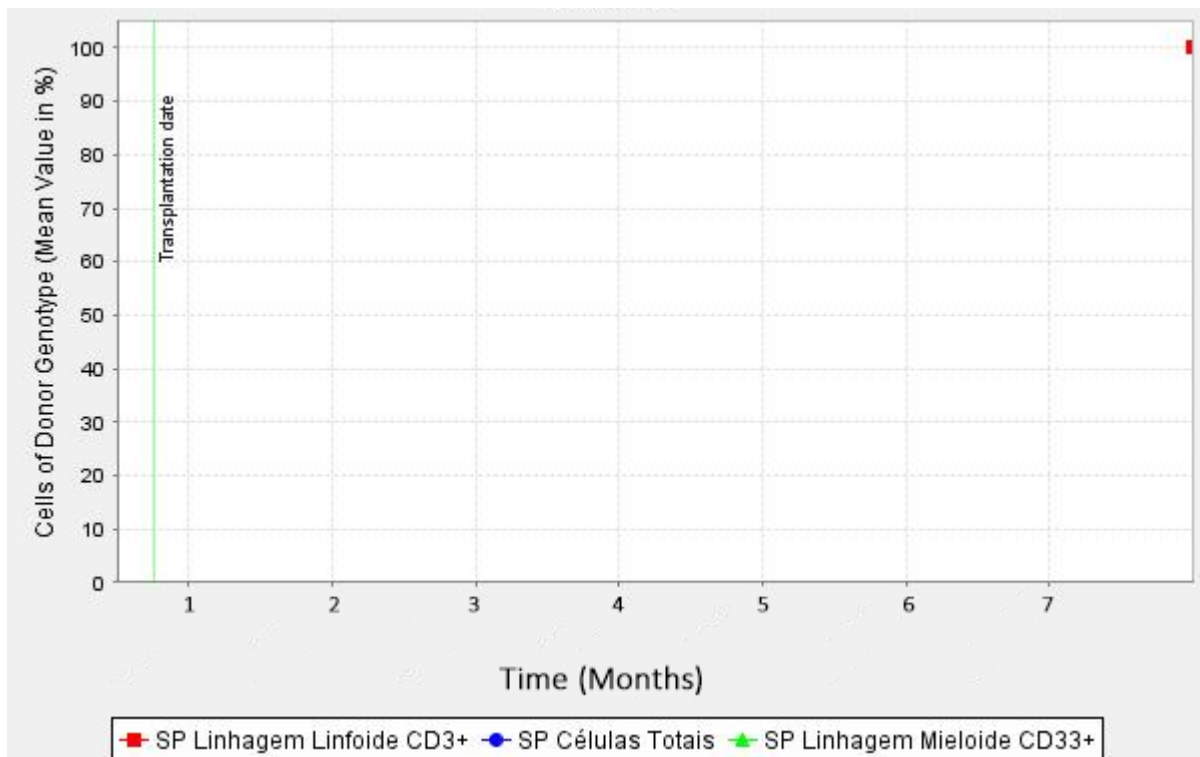
**FIG 15-** Eletroferograma pós-transplante CD33+, 28 dias após 2º transplante



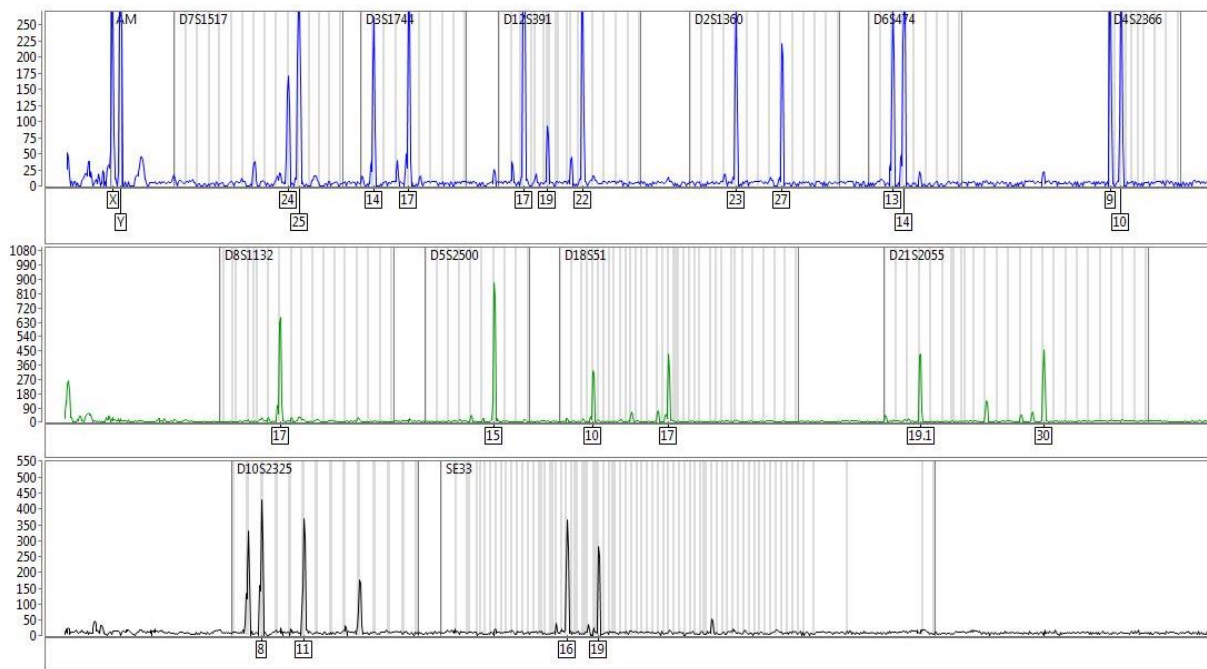
**FIG 16-** Eletroferograma pós-transplante Celulas Totais, 28 dias após 2º transplante

<b>Day after transplantation</b>	28	28	28
<b>D7S1517</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D3S1744</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D12S391</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D2S1360</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D6S474</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D4S2366</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D8S1132</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D5S2500</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D18S51</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D21S2055</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D10S2325</b>	1.00	1.00	1.00
<b>SE33</b>	1.00	1.00	1.00
<b>Mean</b>	1.00	1.00	1.00
<b>Standard deviation</b>	0.00	0.00	0.00

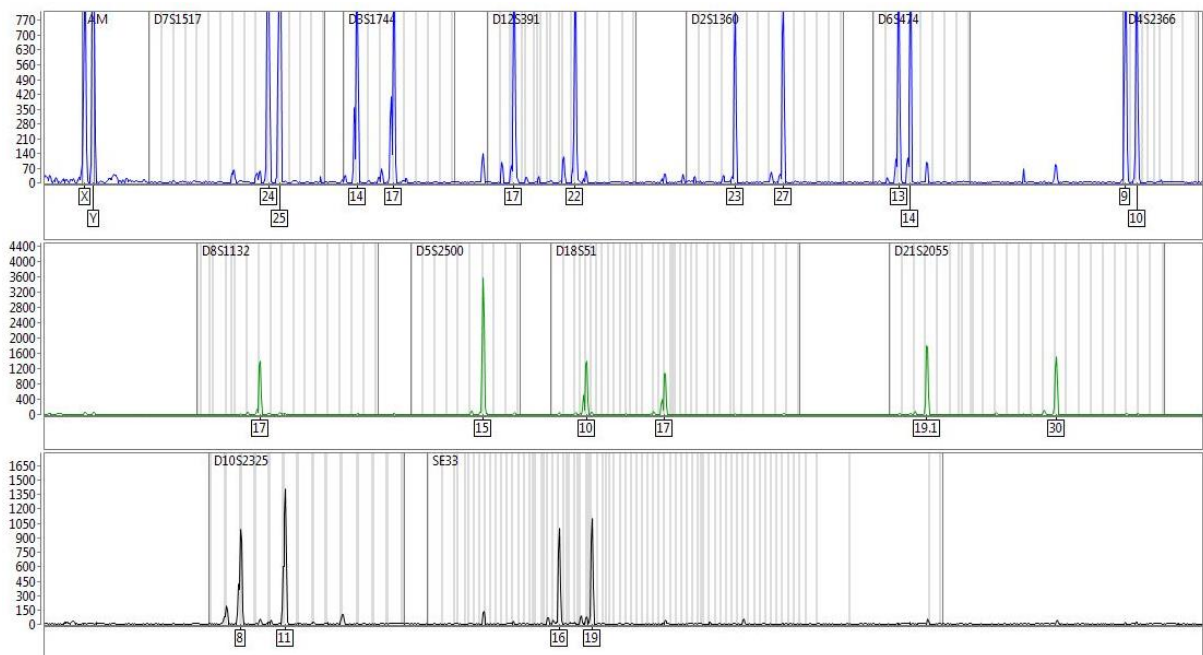
**TAB 4-** Frequência do genótipo do dador após 28 dias do 2º transplante



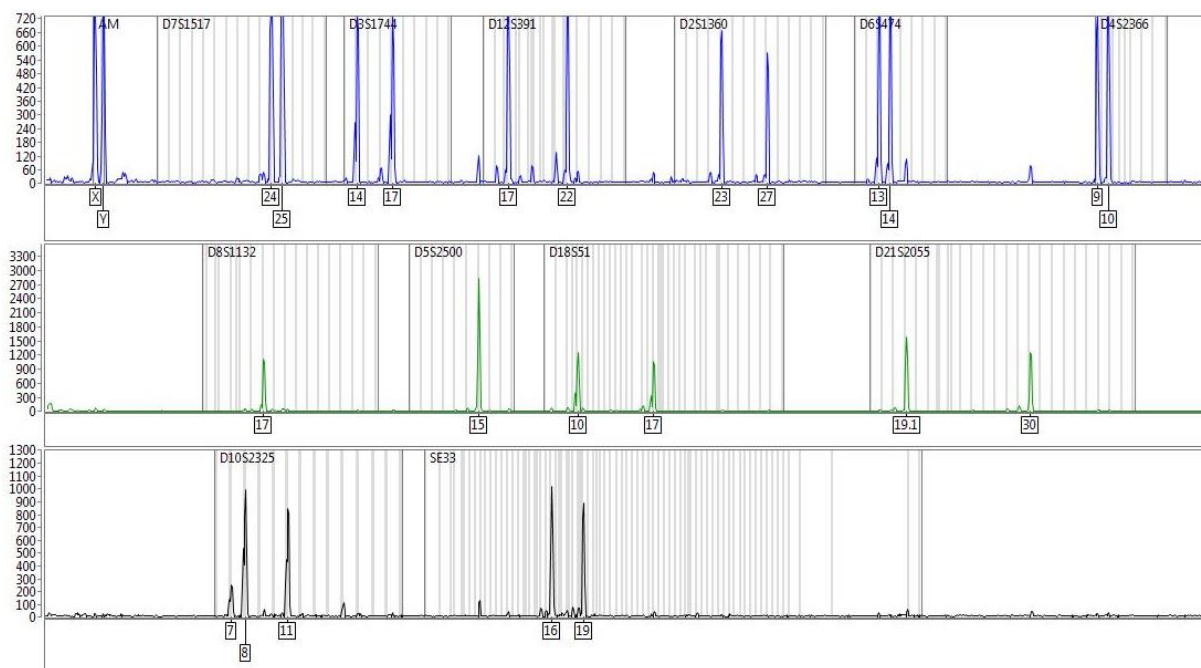
**Gráfico 4** - Gráfico da evolução das populações no recetor ao longo do tempo, 28 dias após 2º transplante



**FIG 17-** Eletroferograma pós-transplante CD3+, 136 dias após 2º transplante



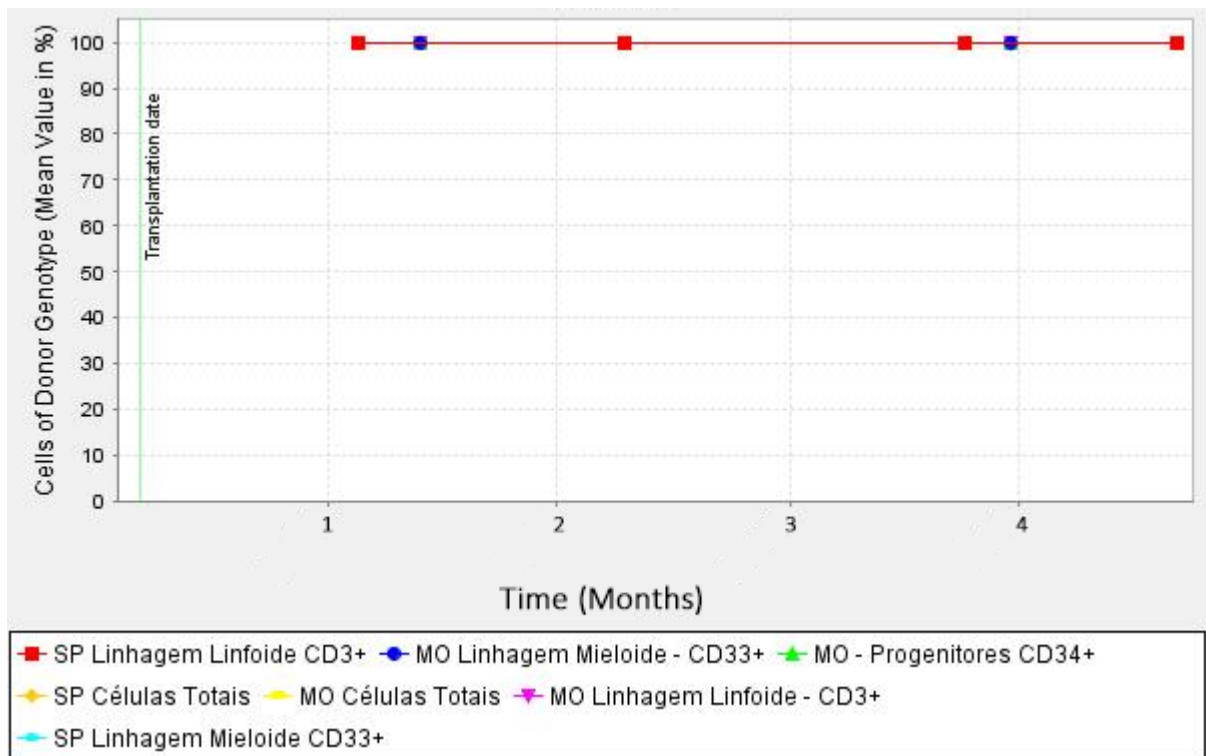
**FIG 18-** Eletroferograma pós-transplante CD33+, 136 dias após 2º transplante



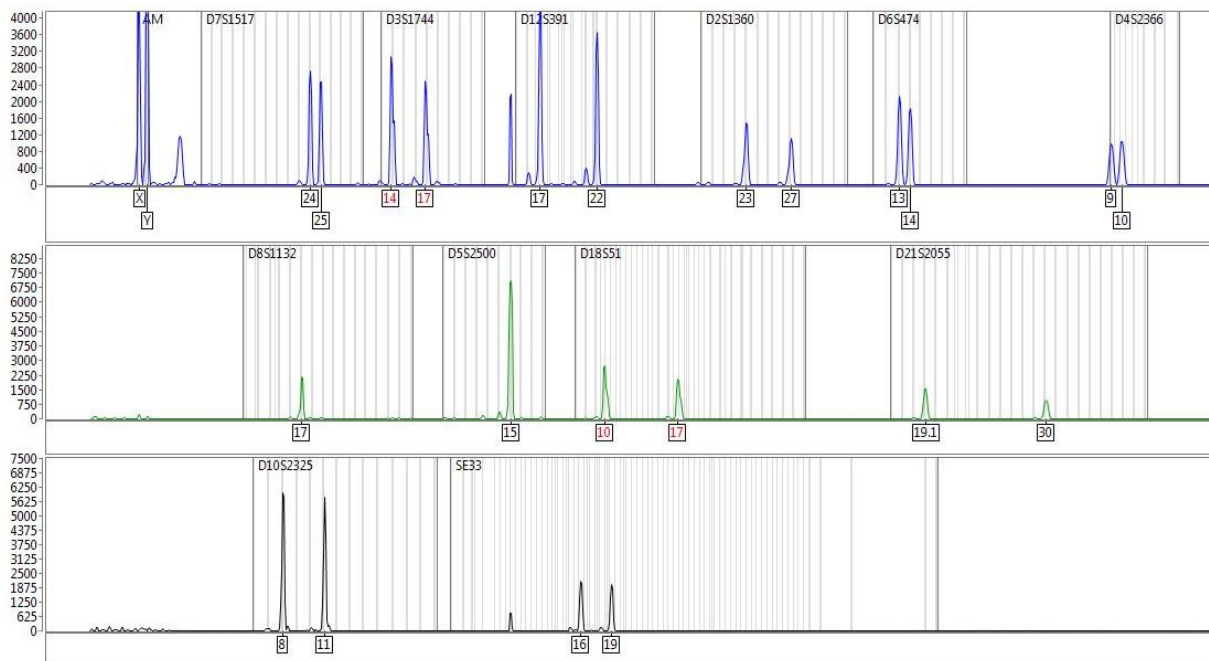
**FIG 19-** Eletroferograma pós-transplante células Totais, 136 dias após 2º transplante

<b>Day after transplantation</b>	136	136	136
<b>D7S1517</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D3S1744</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D12S391</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D2S1360</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D6S474</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D4S2366</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D8S1132</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D5S2500</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D18S51</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D21S2055</b>	1.00	1.00	1.00
<b>D10S2325</b>	1.00	1.00	1.00
<b>SE33</b>	1.00	1.00	1.00
<b>Mean</b>	1.00	1.00	1.00
<b>Standard deviation</b>	0.00	0.00	0.00

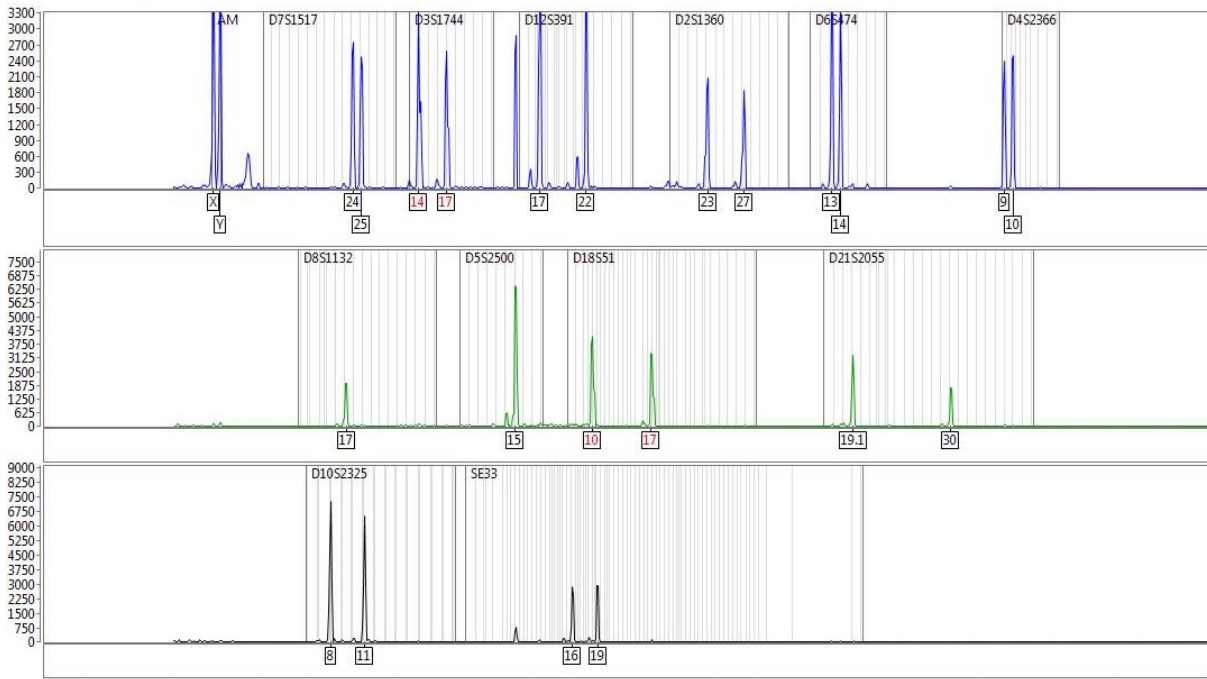
**TAB 5-**Frequência do genótipo do dador, após 136 dias do 2ºtransplante



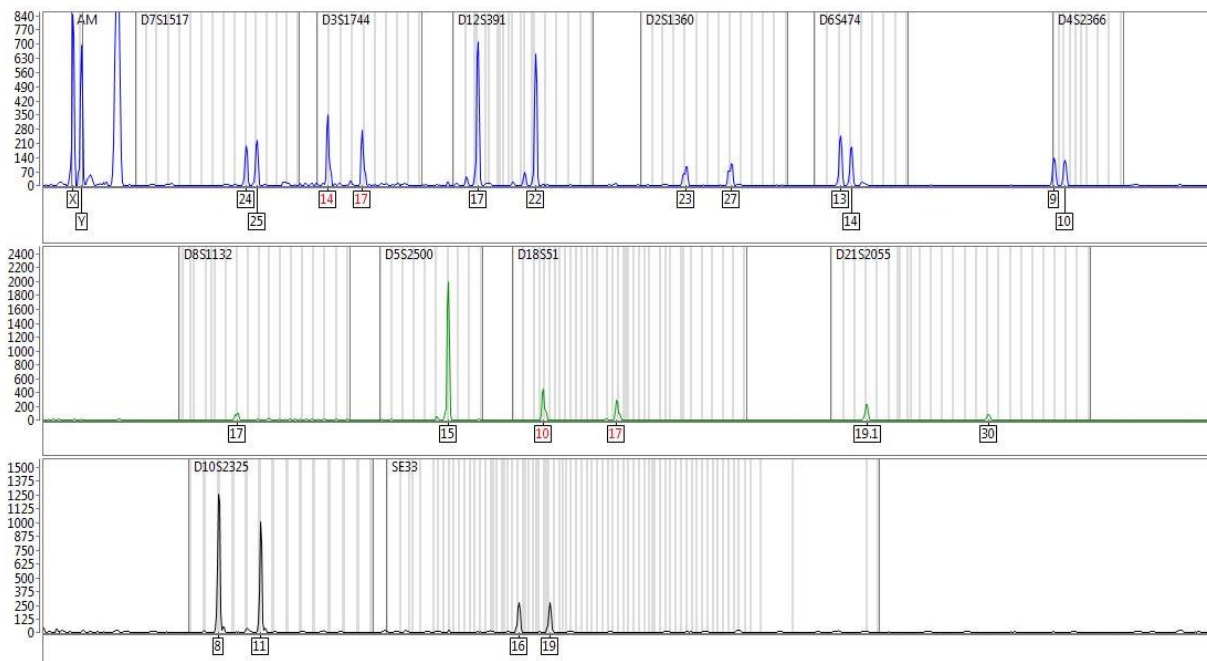
**Gráfico 5** - Gráfico da evolução das populações no recetor ao longo do tempo, 28 dias após 2º transplante



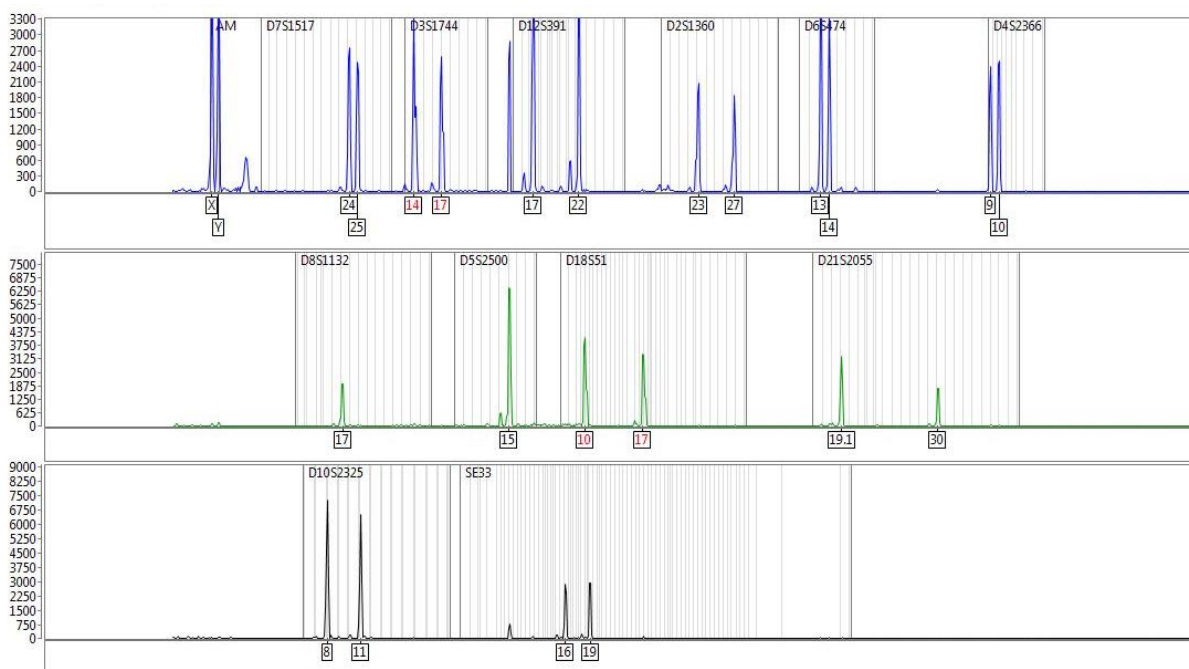
**FIG 20-** Eletroferograma pós-transplante CD3+, 366 dias após 2º transplante



**FIG 21-** Eletroferograma pós-transplante CD33+, 366 dias após 2º transplante



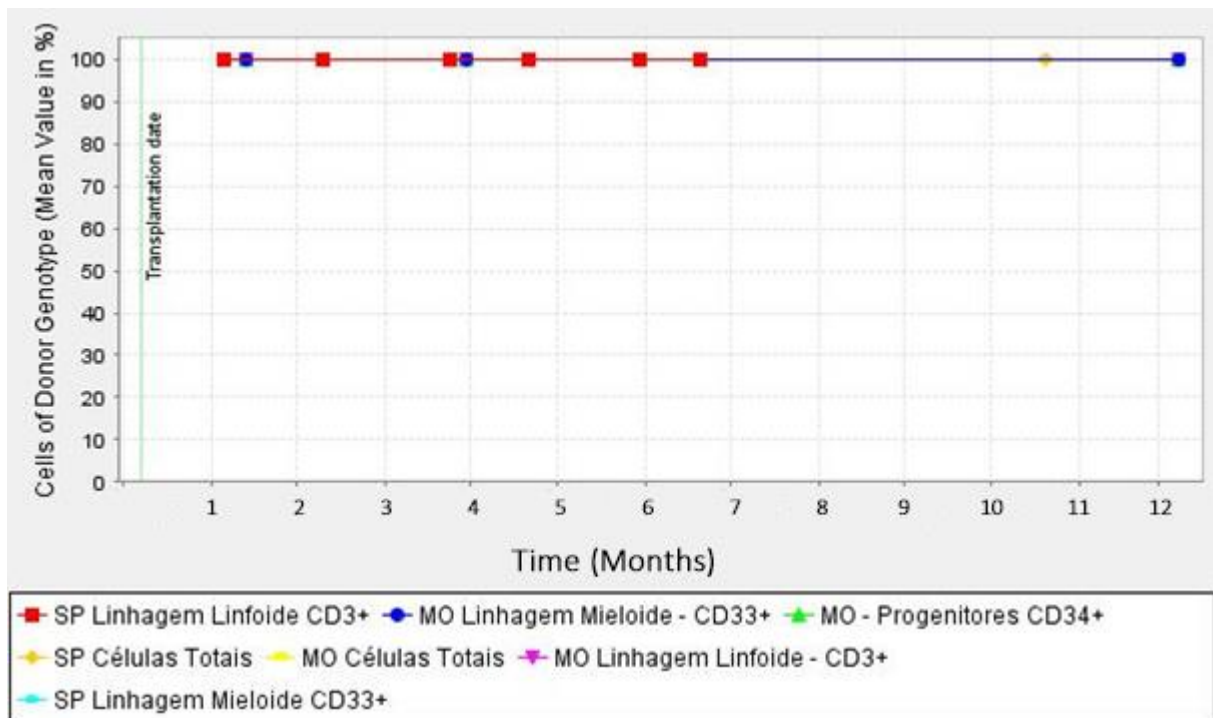
**FIG 22-** Eletroferograma pós-transplante CD34+, 366 dias após 2º transplante



**FIG 23-** Eletroferograma pós-transplante células totais, 366 dias após 2º transplante

**TAB 6-** Frequência do genótipo do dador após 366 dias do 2º transplante

Day after transplantation	366	366	366	366
<b>D7S1517</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>D3S1744</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>D12S391</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>D2S1360</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>D6S474</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>D4S2366</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>D8S1132</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>D5S2500</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>D18S51</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>D21S2055</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>D10S2325</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>SE33</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>Mean</b>	1.00	1.00	1.00	1.00
<b>Standard deviation</b>	0.00	0.00	0.00	0.00



**Gráfico 6** - Gráfico da evolução das populações no recetor ao longo do tempo, 366 dias após 2º transplante

### 9.3. Apêndice 3 – Dados do Caso de Dador Vivo



Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP

Centro de Sangue e da Transplantação de Lisboa  
Área da Transplantação



Associação para a Transplantação de Órgãos, ASOT

#### Estudo HLA para Transplantação Renal (Paciente e Dador Vivo)

##### Paciente

Nº LT: XXXX

Nome: PACIENTE A

AB0Rh(D): B+

NºAmostra: XXXXXX

Data Entrada: Ano 2024

Tipo de Amostra: Sangue

Nº Proc: Hospital: Hospital X

Médico:

Serviço: NEFROLOGIA

##### HLA Classe I/II Genotipagem (Equivalente Serológico)

A*	01:01:01 (01)		,A*	02:01:01 (02)	
B*	57:01:01 (57)		,B*	58:01:01 (58)	
Cw*	07:01:01 (07)		,Cw*	07:18:01 (07)	
DRB1*	07:01:01 (07)	DRB4*01:03N	,DRB1*	11:02:01 (11)	DRB3*02:02
DQB1*	03:03:02 (09)		,DQB1*	03:19:01 (07)	
DPB1*	04:01:01		,DPB1*	--	

Método: NGS

##### Observações:

DQA1\*02:01:01, DQA1\*05:05:01  
DPA1\*01:03:01, DPA1\*01:41:01

##### Eventuais Dadores:

Nome: DADORA 1

Parentesco: ESPOSA

AB0Rh(D): O+

NºAmostra: XXXXXX

Data Entrada: Ano 2024

Tipo de Amostra: Sangue

##### HLA Classe I/II Genotipagem (Equivalente Serológico)

A*	01:01:01 (01)		,A*	11:01:01 (11)	
B*	08:01:01 (08)		,B*	35:03:01 (35)	
C*	04:01:01 (04)		,C*	07:01:01 (07)	
DRB1*	12:01:01 (12)	DRB3*02:02	,DRB1*	15:01:01 (15)	DRB5*01:01
DQB1*	06:02:01 (06)		,DQB1*	03:01:01 (07)	
DPB1*	03:01:01		,DPB1*	11:01:01	

Método: NGS

Crossmatch anti-linfocitário: POSITIVO

##### Observações:

DQA1\*01:02:01, DQA1\*05:05:01  
DPA1\*01:03:01, DPA1\*02:01:01

Método: CDC

Data do relatório: Ano 2024



Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP

Centro de Sangue e da Transplantação de Lisboa  
Área da Transplantação



## CARACTERIZAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE ANTICORPOS ANTI HLA CLASSE I / II

(ENSAIO DE CITOMETRIA COM ESFERAS)

Paciente: **PACIENTE A**

Nº LT: **XXXX**

Nº Amostra: **XXXXXX**

Data Entrada: **Ano 2024**

Nº Externo:

Nº Proc: **Hospital: Hospital X**

Nº Encomenda:

Médico:

Nº Episódio:

Serviço: **NEFROLOGIA D. VIVO**

Nº Termo:

**Positivo > 1000 Mean Fluorescence Intensity (MFI)**

Especificidades HLA Classe I		Especificidades HLA Classe II	
Ac. anti-HLA Identificados	Fluorescência	Ac. anti-HLA Identificados	Fluorescência
A25	15635	DR103	25879
B18	14844	DR51	25775
A26	13339	DR1	25535
A43	9639	DR9	25190
B8	9143	DQ6	25063
A66	7870	DR8	24748
A11	7577	DQ5	24651
B64	6494	DR16	24406
B65	5938	DQ4	23398
B54	5064	DR12	22939
B78	4135	DR10	22595
B37	4049	DR15	20427
B60	3918	DQ2	4586
A34	3799	DR17	4013
B75	3755	DR14	4001
A69	3406	DR13	3445
A68	3225	DQ9	2218
B61	3136	DR53	1955



## CARACTERIZAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE ANTICORPOS ANTI HLA CLASSE I / II

(ENSAIO DE CITOMETRIA COM ESFERAS)

Paciente: **PACIENTE A**

Nº LT: **XXXX**

B39	3054	DR4	1896
B73	2890	DR18	1805
Cw10	2876	DQ7	1463
B35	2834	DQ8	1384
B71	2702		
Cw12	2626		
B41	2546		
A33	2440		
B38	2405		
B51	2367		
B50	2169		
B42	2147		
B55	2106		
B67	2073		
Cw5	2020		
B56	1787		
Cw1	1644		
Cw9	1628		
Cw16	1525		
B45	1382		
B77	1375		
B52	1301		
B59	1281		
Cw6	1236		
B62	1166		
B47	1100		
B27	1088		
Cw8	1078		



Instituto Português do Sangue  
e da Transplantação, IP

Centro de Sangue e da Transplantação de Lisboa  
Área da Transplantação



## CARACTERIZAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE ANTICORPOS ANTI HLA CLASSE I / II

(ENSAIO DE CITOMETRIA COM ESFERAS)

Paciente: **PACIENTE A**

Nº LT: **XXXX**

B72

1060

**Observações:**

**Data do relatório:** Ano 2024



Instituto Português do Sangue  
e da Transplantação, IP

Centro de Sangue e da Transplantação de Lisboa  
Área da Transplantação



**CARACTERIZAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE ANTICORPOS ANTI HLA CLASSE I / II**  
**FIXADORES DA FRACÇÃO C1q DO COMPLEMENTO**  
(ENSAIO DE CITOMETRIA COM ESFERAS)

Paciente: **PACIENTE A**

Nº LT: **XXXX**

Nº Amostra: **XXXXXX**

Data Entrada: **Ano 2024**

Nº Externo:

Nº Proc: **Hospital: Hospital X**

Nº Encomenda:

Médico:

Nº Episódio:

Serviço: **NEFROLOGIA D. VIVO**

Nº Termo:

**Positivo > 300 Mean Fluorescence Intensity (MFI)**

Especificidades HLA Classe I	
Ac. anti-HLA Identificados	Fluorescência
A25	6385
B18	1550
A66	1442
A26	506

Especificidades HLA Classe II	
Ac. anti-HLA Identificados	Fluorescência
DR103	19800
DR51	19252
DR9	18412
DQ6	18020
DQ5	17465
DR1	17369
DQ4	17017
DR8	15409
DR10	12144
DR16	11454
DR12	9316
DR15	2169

Observações:

Data do relatório: Ano 2024



Instituto Português do Sangue  
e da Transplantação, IP

Centro de Sangue e da Transplantação de Lisboa  
Área da Transplantação



## Estudo de Microbiologia para Transplantação

### Paciente

Nome: PACIENTE A

Nº LT: XXXX

### Potencial Dador

Nome: DADORA 1

Parentesco: Esposa

Marcador	Data Entrada	N.º Amostra	Resultado	Valor	Val. Referência
Ac CMV IgG	2024	XXXXXX	Positivo	63.2000	P>6 UA/mL
AgHBs		XXXXXX	Negativo	0.3200	P>1,00
AcHBs		XXXXXX	Positivo	509.3000	P>=10 UI/L
AgHBe		XXXXXX	Negativo	0.3860	P>1,00
AcHBe		XXXXXX	Negativo	1.8800	P<1,00
AcHBc		XXXXXX	Negativo	0.1100	P>1,00
Ac HCV		XXXXXX	Negativo	0.0900	P>1,00
Ag/Ac HIV1/2		XXXXXX	Negativo	0.0500	P>1,00

Método: Pesquisa de anticorpos efectuada por imunoensaio (químio-luminescência)

Observações:

Data do relatório: Ano 2024



Instituto Português do Sangue  
e da Transplantação, IP

Centro de Sangue e da Transplantação de Lisboa  
Área da Transplantação



## Estudo de Microbiologia para Transplantação

### Paciente

Nome: PACIENTE A

Nº LT: XXXX

Marcador	Data Entrada	N.º Amostra	Resultado	Valor	Val. Referência
Ac CMV IgG	2024	XXXXXX	Positivo	208.0000	P>6 UA/mL
AgHBs		XXXXXX	Negativo	0.2100	P>1,00
AcHBs		XXXXXX	Positivo	443.3500	P>=10 UI/L
AcHBc		XXXXXX	Negativo	0.0800	P>1,00
Ac HCV		XXXXXX	Negativo	0.1000	P>1,00
Ag/Ac HIV1/2		XXXXXX	Negativo	0.0400	P>1,00
Ac HTLV I/II		XXXXXX	Negativo	0.2000	P>1,00
AgHBe		XXXXXX	Negativo	0.3450	P>1,00
AcHBe		XXXXXX	Negativo	1.9600	P<1,00

**Método:** Pesquisa de anticorpos efectuada por imunoensaio (químio-luminescência)

### **Observações:**

322001717 anti Hbs = 658.97 mIU/mL

**Data do relatório:** Ano 2024

PACIENTE			
Nome	PACIENTE A	UTR:	HCC
		Nº LT:	XXXX
DADOR			
Nome	DADORA 1		
Parentesco	ESPOSA	Id Amostra Células	XXXXXX
		Data Entrada	2024
Id Amostra Soro	XXXXXX	Data Entrada	2024
Crossmatch Linf. T CD3+		Crossmatch Linf B CD19+	
Ratio MFI A / MFI CN	3.45	Ratio MFI A / MFI CN	18.99
Resultado	POSITIVO	Resultado	POSITIVO
Id Amostra Soro	XXXXXX	Data Entrada	XX-M2-Ano15
Crossmatch Linf T CD3+		Crossmatch Linf B CD19+	
Ratio MFI A / MFI CN	7.13	Ratios MFI A / MFI CN	16.21
Resultado	POSITIVO	Resultado	POSITIVO
Crossmatch Linf T: CD3+ Positivo >1,5		Crossmatch Linf B: CD19+ Positivo >1,5	

Resultado = Ratio MFI da amostra (A) / MFI Controlo negativo (CN)

**Cut-Offs Analíticos para o Crossmatch por Citometria de Fluxo:**

Soro sem reatividade anti-linfócito (T e/ou B) do dador: Ratio Shift MFI  $\leq 1.5$

Soro com reatividade anti-linfócito (T e/ou B) do dador fracamente positiva: Ratio Shift MFI: 1.51 a 1.8

Soro com reatividade anti-linfócito (T e/ou B) do dador positiva: Ratio Shift MFI >1.8

Observações	
Data do Relatório	2024



Instituto Português do Sangue  
e da Transplantação, IP

Centro de Sangue e da Transplantação de Lisboa  
Área da Transplantação



## Crossmatch Antilinfocitário Transplantação Renal (Citotoxicidade mediada por complemento)

### Paciente

Nome: PACIENTE A

Nº LT: XXXX

Nº Amostra: XXXXXX

Data Entrada: 2024

Nº Proc: Hospital:

Médico:

Serviço:

Nº Externo:

Nº Encomenda:

Nº Episódio:

Nº Termo:

### Potencial Dador

Nome: DADORA 1

Nº de Amostra: XXXX

Parentesco: Esposa

Data Entrada: 2024

Nº Proc: Hospital: Hospital X

Médico:

Serviço: NEFROLOGIA DADOR VIVO

Nº Externo:

Nº Encomenda:

Nº Episódio:

Nº Termo: XXXXXX

### Resultado

Cross-Match: **Células T - Positivo**

**Células B - Positivo**

**Células Totais -**

Método: CDC

### Observações

Soro de pico.

O resultado do crossmatch manteve-se positivo após a inativação das IgM.

A responsabilidade deste resultado é do Laboratório de Alossensibilização e Serologia HLA.

Data do relatório: Ano 2024



Instituto Português do Sangue  
e da Transplantação, IP

Centro de Sangue e da Transplantação de Lisboa  
Área da Transplantação



## Crossmatch Antilinfocitário Transplantação Renal (Citotoxicidade mediada por complemento)

### Paciente

Nome: PACIENTE A

Nº LT: XXXX

Nº Amostra: XXXXXX

Data Entrada: 2024

Nº Proc: Hospital:

Médico:

Serviço:

Nº Externo:

Nº Encomenda:

Nº Episódio:

Nº Termo:

### Potencial Dador

Nome: DADORA 1

Nº de Amostra: XXXX

Parentesco: Esposa

Data Entrada: 2024

Nº Proc: Hospital: Hospital X

Médico:

Serviço: NEFROLOGIA DADOR VIVO

Nº Externo:

Nº Encomenda:

Nº Episódio:

Nº Termo: XXXXXX

### Resultado

Cross-Match: Células T - Negativo

Células B - Positivo

Células Totais -

Método: CDC

### Observações

O resultado do crossmatch manteve-se positivo para linfócitos B após a inativação das IgM.

A responsabilidade deste resultado é do Laboratório de Alossensibilização e Serologia HLA.

Data do relatório: Ano 2024





Instituto Português do Sangue  
e da Transplantação, IP

Centro de Sangue e da Transplantação de Lisboa  
Área da Transplantação



## Estudo HLA para Transplantação

### Conclusão

Os estudos imunogenéticos HLA-ABC DRDQDP do candidato Paciente A e da potencial dadora Dadora 1 (esposa) revelou que ao nível especificidade serológica HLA contam-se as seguintes incompatibilidades HLA :

- 1 em HLA-A;
- 2 em HLA-B;
- 1 em HLA-C;
- 1 em HLA-DRB1, o HLA-DR11 e o HLA-DR12 são splits do HLA-DR5;
- 1 em HLA-DQB1 e
- 2 em HLA-DPB1.

A comparação dos repertórios estendidos HLA, em alta resolução alélica, identificam a carga total de 91 incompatibilidades moleculares de epítipo neste transplante, nas quais verificam-se, que 27 são antibody-verified epitopos (11 em HLA Classe Ia e 16 em HLA Classe II).

Os grupos ABO deste par dador/recetor são compatíveis.

Os crossmatches antilinfocitário HLA Classe I e Classe II por citometria de fluxo são POSITIVOS tanto no soro de pico como no soro recente.

Os crossmatches antilinfocitário HLA Classe I e Classe II por citotoxicidade mediada pelo complemento, são POSITIVOS para linfócitos B soro de pico como no soro recente. No caso dos linfócitos T são POSITIVOS no soro de pico e negativos no soro recente.

No imunoensaio com o soro do doente foi detetada aloreatividade contra a especificidades (DSAs), presente no genótipo da potencial dadora, anti HLA-A\*11, anti HLA-B\*08, anti HLA-B\*35, anti HLA-DR\*12, anti HLA-DR\*15, anti HLA-DR51, anti HLA-DQ\*06 e anti HLA-DQ\*07. Identificando-se os possíveis epletos 177DT, e 163RW, para HLA- Classe Ia e 120N, 185T e 37S para HLA- Classe II presentes na tipagem da potencial dadora. Os anticorpos anti HLA-DR\*12, anti HLA-DR\*15, anti HLA-DR51, anti HLA-DQ\*06 são fixadores da fracção C1q do complemento.

Nota: Antibody-verified epitopos são epitopos para os quais está descrito reatividade por um aloanticorpo.

Local, 2024