

PATRÍCIA SOARES DE SOUZA

**Relevância da monitorização dos
anticorpos anti-HLA após o transplante renal :
estudo clínico e anatomopatológico**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título
de Doutor em Ciências

Área de concentração: Nefrologia
Orientadora: Dra. Maria Cristina Ribeiro de Castro

São Paulo
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Patrícia Soares de

Relevância da monitorização dos anticorpos anti-HLA após o transplante renal :
estudo clínico e anatomopatológico / Patrícia Soares de Souza. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Nefrologia.

Orientadora: Maria Cristina Ribeiro de Castro.

Descritores: 1.Transplante de rim 2.Antígenos HLA 3.Anticorpos 4.Rejeição
de enxerto 5.Biópsia

USP/FM/SBD-222/08

Dedico esta tese aos pacientes que, com carinho e confiança, aceitaram participar deste estudo.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Cristina Ribeiro de Castro, pela orientação na execução desta tese. Agradeço pela amizade e por todo o apoio e estímulo para que este estudo se concretizasse.

Ao Dr. Nicolas Panajotopoulos, pela agradável convivência e pelos ensinamentos, e correções sempre oportunas.

Ao Prof. Dr. Luiz Estevam Ianhez e aos assistentes da Unidade de Transplante Renal, pessoas com as quais eu muito aprendi.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil Filho, que propiciou as condições para que a parte experimental deste estudo pudesse ser realizada.

À Dra. Daísa Silva Ribeiro David, pela disponibilidade na realização das pesquisas de C4d nas biópsias.

Ao Prof. Dr. Elias David-Neto, que sempre representou para mim um grande mestre na área de Transplante.

Ao Hélcio Rodrigues, pelo apoio e pela importante contribuição em todas as etapas deste estudo.

Aos amigos do Laboratório de HLA: Carlos Sérgio, Germano Preugh, Ivete Maria, Sandra Regina, Célia Yamaguti, Izabel Romano, Cláudia Rosales, Olga Morita, Marcelo Barrocal, Mário D'Angelo e Ioni Amorim. Este trabalho tem um pouco de cada um de vocês!

À Carol Borba e Susane Cutrim, pela amizade e companhia nas discussões sobre o instigante mundo da Imunologia.

Aos amigos da Pesquisa Clínica da Urologia: Fabiana Agena, Luciana Fadel, Melissa Sato, Nádia Lenze, Abram Beutel e Rafael Nascimento, obrigada pelos momentos de convívio sempre alegre, dedicação ao trabalho e cuidado com os pacientes.

À Carla Ronda, pela amizade que fomos construindo no decorrer desses anos e por compartilhar comigo momentos importantes na realização dos experimentos deste estudo.

À Fabiana Agena, pela amizade, dedicação e empenho que foram de extrema importância na realização deste estudo.

À amiga de residência de Nefrologia e de Pós-Graduação, Elisângela Prado, pela amizade, carinho e companheirismo nesta fase tão marcante da minha vida. Durante alguns anos trilhamos caminhos semelhantes, compartilhamos os mesmos sonhos e ideais, agora resta a realização destes sonhos.

À Adriana Sañudo, pela valiosa ajuda na análise estatística.

Ao Sr. Jair Muro, que com paciência, atenção e presteza me ajudou com dicas infalíveis para resolver questões burocráticas.

À minha família,

Ao meu pai, Homero de Souza, modelo de trabalho, de seriedade e de honestidade. Ensinaamentos que fizeram toda a diferença na minha vida.

À minha mãe, Armandina Soares de Souza (*in memoriam*), meu modelo de luta e dedicação à família e que desde cedo me ensinou a trilhar o caminho do estudo e do conhecimento.

Às minhas irmãs, Cibele, Catarina e Lucrécia, por todo o carinho, cuidado e amor que sempre tiveram por mim.

Aos sobrinhos, Camila, Natália, Renato, Clarice, Lívia, Pedro e Alice, obrigada pelos momentos de alegria que me proporcionaram durante esta jornada. Vocês são o máximo!

Ao “meu amor querido” Paulo Tércio, patamar sólido que sempre pude me apoiar. Obrigada pelo apoio e incentivo e por ter compartilhado comigo os momentos de calma e de tempestade. Ao nosso filho Augusto, meu companheiro inseparável nos momentos finais deste estudo.

Finalmente, agradeço a Deus por iluminar meu caminho...

*“Fazer da interrupção um caminho novo.
Fazer da queda um passo de dança,
do medo uma escada,
do sono uma ponte,
da procura um encontro.”*

Fernando Sabino

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Sueli Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Células endoteliais como alvo para rejeição.....	3
1.2 Vias de alo-reconhecimento.....	5
1.3 Mecanismos efetores da rejeição.....	6
1.4 Classificação histológica das rejeições.....	8
1.5 Avaliação imunológica.....	11
1.5.1 Prova-cruzada contra linfócitos.....	11
1.5.2 Reatividade contra painel.....	14
1.6 Revisão da literatura.....	15
1.6.1 Anticorpos anti-HLA pré-transplante.....	15
1.6.2 Anticorpos anti-HLA pós-transplante.....	17
2. OBJETIVOS.....	24
3. MÉTODOS.....	26
3.1 Casuística.....	27
3.2 Desenho do estudo.....	29
3.3 Estudo imunológico.....	33
3.3.1 Obtenção de soros do receptor.....	33
3.3.2 Obtenção de células do doador.....	33
3.3.3 Teste de citotoxicidade dependente de complemento (CDC).....	34
3.3.4 Teste de reatividade contra painel por ELISA.....	35
3.3.5 Prova-cruzada contra linfócitos por citometria de fluxo.....	37
3.3.6 Teste de microesferas marcadas (Luminex®).....	38

3.4	Estudo histológico	40
3.4.1	Microscopia óptica	40
3.4.2	Imunofluorescência indireta para C4d	40
3.4.3	Imunoperoxidase para C4d	41
3.5	Análise estatística	43
4.	RESULTADOS	44
4.1	Pacientes incluídos	45
4.2	Reatividade contra painel no pré-transplante renal	47
4.3	Monitorização dos anticorpos anti-HLA no pós-transplante	47
4.4	Dados demográficos e características clínicas dos pacientes conforme os Grupos	49
4.5	Histologia	51
4.6	Estudo imunopatológico	53
4.7	Estudo imunológico nos Grupos	55
4.8	Associação entre anticorpos anti-HLA, rejeição aguda e marcação por C4d	59
4.9	Evolução clínica	66
4.9.1	Tratamento e reversibilidade das rejeições agudas	66
4.9.2	Sobrevida do paciente	67
4.9.3	Sobrevida do enxerto	69
4.9.4	Função renal	75
5.	DISCUSSÃO	77
6.	CONCLUSÕES	88
7.	REFERÊNCIAS	90

LISTA DE ABREVIATURAS

AACE: Anticorpo anti-célula endotelial

Ac anti-IL-2R: Anticorpo anti-receptor de Interleucina 2

ADCC: *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*

AGH: Antiglobulina humana

APC: *Antigen Presenting Cells*

CAPPesq: Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

CDC: *Complement Dependent Cytotoxicity*

CDC-AHG: *Complement Dependent Cytotoxicity-Antihuman-globulin*

CDC-NIH: *Complement Dependent Cytotoxicity-National Institute of Health*

CF: Citometria de Fluxo

DTT: Ditionitrito

ELISA: *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FCXM: *Flow Cytometry Crossmatch*

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*

HE: Hematoxilina-eosina

HLA: *Human Leukocyte Antigens*

IF: Imunofluorescência

INF: Interferon

IL: Interleucina

IP: Imunoperoxidase

IVIg: Imunoglobulina polivalente humana

MHC: *Major Histocompatibility Complex*

MICA: *MHC class I Chain related gene A*

MICB: *MHC class I Chain related gene B*

NK: *Natural Killer*

NTA: *Necrose Tubular Aguda*

TCR: *T Cell Receptor*

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

PAS: *Ácido periódico de Shiff*

PBS: *Tampão de salina fosfato*

PE: *Phycoerythrin*

PRA: *Panel Reactive Antibodies*

UNOS: *United Network Organ Sharing*

UTR-HC-FMUSP: *Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da*

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

VEC: *Vascular Endothelial Cell*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de execução das coletas de sangue para pesquisa de anticorpos anti-HLA.....	29
Figura 2 - Pacientes com suspeita de rejeição.	31
Figura 3 - Detecção de C4d em biópsia de rim transplantado pelas técnicas de imunofluorescência (A) e por imunoperoxidase (B).....	42
Figura 4 - Pacientes incluídos no estudo.	45
Figura 5 - Distribuição dos pacientes em grupos conforme a evolução do PRA pós-transplante.	49
Figura 6 - Diagnóstico histológico das biópsias realizadas.....	52
Figura 7 - Achados histológicos de rejeição aguda conforme os Grupos....	52
Figura 8 - Dinâmica do aparecimento dos anticorpos anti-HLA <i>de novo</i> após o transplante renal no Grupo B.....	56
Figura 9 – Dinâmica dos anticorpos anti-HLA após o transplante renal nos Grupos C, D e E.	58
Figura 10 - Incidência de rejeição aguda entre os Grupos.	60
Figura 11 - Tipos de rejeição aguda entre os Grupos.....	63
Figura 12 - Sobrevida dos pacientes global (A) e por Grupos (B).	68
Figura 13 - Sobrevida do enxerto Global (A) e por Grupos (B).....	70
Figura 14 - Sobrevida do enxerto conforme presença ou ausência de anticorpos anti-HLA.	71
Figura 15 - Sobrevida do enxerto em 1 ano conforme ocorrência de rejeição aguda	72
Figura 16 - Sobrevida do enxerto em 1 ano conforme o tipo de rejeição aguda	73
Figura 17 - Sobrevida do enxerto em 1 ano conforme marcação pelo C4d na biópsia renal.....	74
Figura 18 - Box-Plot da mediana (A) da Creatinina sérica (mg/dL) e (B) da Depuração de Creatinina (mL/min) entre os Grupos.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Categorias dos pacientes segundo níveis de PRA	30
Tabela 2 - Dados demográficos e características clínicas dos 111 pacientes segundo os grupos	50
Tabela 3 - Marcação pelo C4d nas biópsias com rejeição aguda	54
Tabela 4 - Características dos pacientes com rejeição aguda mediada por células e mediada por anticorpos	62
Tabela 5 - Características imunológicas dos pacientes com Rejeição Aguda Mediada por Anticorpos	65
Tabela 6 - Tratamento e reversibilidade das rejeições agudas mediadas por anticorpos	66

RESUMO

Souza PS. *Relevância da monitorização dos anticorpos anti-HLA após o transplante renal: estudo clínico e anatomopatológico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 99p.

INTRODUÇÃO: O objetivo deste estudo foi avaliar prospectivamente os anticorpos anti-HLA após o transplante renal e associar estes achados com episódios de rejeição aguda, marcação por C4d e sobrevida do enxerto. **MÉTODOS:** Foram avaliados 926 soros de 111 pacientes no primeiro ano pós-transplante ou até a perda do enxerto. Os anticorpos foram analisados por PRA-ELISA (*Panel Reactive Antibodies by Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Anticorpos anti-HLA doador-específicos foram detectados por provas-cruzadas e caracterizados pelo método de microesferas marcadas com antígenos HLA. Episódios de rejeição aguda foram classificados conforme os Critérios de Banff 97, atualizados em 2003. **RESULTADOS:** Conforme o PRA-ELISA pós-transplante os pacientes foram classificados em 5 Grupos: Grupo A (n=80): sem evidência de anticorpos pré e pós-transplante; Grupo B (n=8): pacientes com anticorpos *de novo*; Grupo C (n=5): pacientes sensibilizados que permaneceram com mesmo nível de PRA-ELISA; Grupo D (n=4): pacientes sensibilizados que elevaram o nível de PRA-ELISA e Grupo E (n=14): pacientes sensibilizados que diminuíram o nível de PRA-ELISA durante o primeiro ano pós-transplante. A incidência de rejeição aguda foi de 23,4%. Pacientes dos Grupos B, C e D apresentaram mais episódios de rejeição aguda (respectivamente, 57%; 60% e 100%) que os dos Grupos A (18%) e E (7%), ($p<0,001$). Rejeições ocorridas no Grupo A foram histologicamente menos severas do que as dos outros Grupos ($p=0,03$) e com menor incidência de C4d+ ($p<0,001$). Entre os pacientes com rejeição aguda, 44% deles apresentaram anticorpos no momento da rejeição, sendo que em 90% dos casos esses anticorpos foram doador-específicos. Rejeição mediada por células, ou seja, sem anticorpos e com C4d-, ocorreu em 56% dos casos. A incidência global de rejeição mediada por anticorpos (RMA) foi de 11%. A sobrevida do enxerto censurada para óbito foi menor em pacientes com rejeição aguda ($p<0,001$), especialmente naqueles com anticorpos anti-HLA doador-específicos ($p<0,001$), com C4d+ ($p=0,003$) e nos casos de RMA ($p<0,003$). **CONCLUSÃO:** Nossos dados sugerem que a monitorização dos anticorpos anti-HLA após o transplante renal pode ser útil no diagnóstico das respostas mediadas por anticorpos e tem implicações em termos de sobrevida do enxerto.

Descritores: 1.Anticorpos 2.Rejeição de enxerto 3.Biópsia 4.Transplante de rim 5.Antígenos HLA

SUMMARY

Souza PS. *Relevance of anti-HLA monitoring after kidney transplantation: Clinical and anatomopathological study* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 99p.

INTRODUCTION: The aim was to follow prospectively anti-HLA antibodies (Abs) after kidney transplantation and to evaluate their association with acute rejection episodes, C4d staining and graft survival. **METHODS:** We analyzed 926 sera from 111 transplanted patients until graft lost or during 1 year post-transplant. The antibodies were analyzed using Panel Reactive Antibodies by Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (PRA-ELISA). Donor-specific antibodies (DSA) were detected by crossmatch tests and characterized by single antigen beads. Acute rejections (AR) were classified by Banff 97 criteria, updated in 2003. **RESULTS:** According to post-transplant PRA-ELISA the patients were classified in 5 groups: Group A (n=80): no evidence of Abs pre and post-transplant; Group B (n=8): patients with Abs *de novo*; Group C (n=5): sensitized patients who sustained the same PRA-ELISA levels; Group D (n=4): sensitized patients who increased PRA-ELISA levels and Group E (n=14): sensitized patients who decreased PRA-ELISA levels during the first year. The overall incidence of acute rejection was 23,4%. Patients from Groups B, C and D had more AR (respectively, 57%; 60% and 100%) than patients from Groups A (18%) and E (7%), ($p<0.001$). Patients from Group A had lower Banff scores than other groups ($p=0.03$) and lower rates of C4d positivity on AR biopsies ($p<0.001$). Among patients with AR, 44% of them had antibodies which appeared/increased during the AR episodes, and 90% were DSA. AR were pure cell-mediated (C4d-/Abs-) in 56% of the cases. The overall incidence of antibody-mediated rejection (AMR) was 11%. One-year censored graft survival was lower in patients with AR ($p<0.001$), specially in those with DSA ($p<0.001$), C4d+ ($p=0.003$), and AMR ($p<0.003$). **CONCLUSION:** Our data suggest that monitoring of anti-HLA antibodies post-transplantation is an useful tool for the diagnosis of antibody-mediated responses, and has prognostic implications in terms of graft survival.

Descriptors: 1.Antibodies 2.Graft rejection 3.Biopsy 4.Kidney transplantation 5.HLA antigens

1. INTRODUÇÃO

O transplante renal é atualmente a terapia de escolha para a maioria dos pacientes com insuficiência renal crônica em fase avançada.

Nas últimas décadas, a sobrevida do enxerto aumentou substancialmente. Segundo dados da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de São Paulo, a sobrevida do enxerto renal de doador falecido entre os anos de 1997 a 2003 foi de 87% no primeiro ano e de 52,2% no oitavo ano (1). Os dados da UNOS (*United Network Organ Sharing*) demonstram que a sobrevida do enxerto no primeiro ano e a projetada para 10 anos (transplantes realizados entre 1998-2001) é de, respectivamente, 89% e 51% para doador falecido e de 95% e 68% para doador vivo. Esses resultados representam melhora de 15% e 13% na sobrevida do enxerto nos últimos 10 anos para transplante com doador falecido e vivo, respectivamente (2). Isso se deve, em parte, à terapia imunossupressora, com maior sucesso na prevenção e no tratamento da rejeição aguda.

A despeito da melhoria dos protocolos de imunossupressão, considerável número de enxertos ainda é perdido devido à rejeição aguda refratária aos tratamentos imunossupressores disponíveis, principalmente naqueles pacientes com sensibilização anti-HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigens*) prévia. Há crescente evidência de que, além de mecanismos celulares, mecanismos humorais também estejam envolvidos na rejeição aguda e crônica do enxerto (3).

1.1 Células endoteliais como alvo para rejeição.

As células endoteliais têm um importante papel na imunologia dos transplantes, pois fazem a interface entre o sistema imune do receptor e o órgão transplantado (4). Algumas das funções imunológicas das células endoteliais são as de iniciar, facilitar e regular a migração transepitelial (diapedese) das células imunes do sangue para o parênquima do órgão transplantado.

Adicionalmente, as células endoteliais expressam, em sua superfície, moléculas antigênicas dos sistemas ABO, HLA e não-HLA.

Os antígenos do sistema HLA são glicoproteínas altamente polimórficas codificadas por genes localizados no braço curto do cromossomo 6 em humanos e classificados em 2 subgrupos: antígenos HLA Classe I e antígenos HLA Classe II. Os antígenos HLA Classe I, localizados nos *loci* A, B e C, são expressos na superfície de todos os tipos de células nucleadas e de plaquetas. Os antígenos HLA Classe II, localizados nos *loci* DR, DQ e DP, são expressos na superfície das APC (do inglês, *Antigen Presenting Cells* ou Células Apresentadoras de Antígenos).

As APCs são células que processam peptídeos antigênicos em seu citoplasma e os expõem na fenda da molécula HLA classe II na superfície celular. Compreendem as células dendríticas (células apresentadoras profissionais), macrófagos, linfócitos B, linfócitos T ativados, célula endotelial, células epiteliais, células musculares lisas e fibroblastos, sendo

que estes 3 últimos tipos celulares apresentam antígenos após estímulo de citocinas específicas, como o TNF- α e o INF- γ (5, 6).

Apesar de vários dados sobre a relevância do sistema HLA na evolução do transplante de órgãos sólidos, esse não é o único sistema envolvido nos processos de rejeição. Moraes *et al* (7) descreveram o Sistema VEC (do inglês, *Vascular Endothelial Cell System*), que é um dos constituintes dos Sistemas não-HLA. Anticorpos direcionados contra esse sistema antigênico são denominados Anticorpos Anti-Célula Endotelial (AACE) e foram primeiramente definidos como sendo auto-anticorpos associados a doenças auto-imunes, especialmente vasculites. Esses anticorpos podem induzir a ativação das células endoteliais e aumentar a expressão de moléculas de adesão, aumentar o estado pró-coagulante ou induzir à apoptose (4, 8), que são fatores implicados na rejeição de órgãos transplantados.

Outros sistemas antigênicos não-HLA compreendem as moléculas do sistema MICA e MICB (do inglês, *MHC class I Chain related gene A and B*, respectivamente). Esses sistemas antigênicos foram descritos como família de genes polimórficos, localizados próximo ao *loci* do HLA-B no cromossomo 6 (9). São moléculas expressas na superfície das células endoteliais e epiteliais e funcionam como alvos para resposta imune humoral e celular durante rejeição de enxerto (10).

1.2 Vias de alo-reconhecimento

O processo de rejeição tem início quando os linfócitos T do receptor reconhecem antígenos do doador expressos no enxerto. Ao reconhecerem esses antígenos como não-próprios, os linfócitos T são ativados e desencadeiam mecanismos efetores celulares e humorais da rejeição (5). O alo-reconhecimento é o evento central e primário no desencadeamento da resposta imune. Pode ocorrer por duas vias distintas, mas não excludentes: a via direta e a via indireta. Ambas as vias de alo-reconhecimento são importantes no processo de rejeição e podem ocorrer simultaneamente (6).

Na via direta, os linfócitos T do receptor reconhecem o complexo peptídeo-molécula HLA expresso na superfície das APCs do doador (11). O complexo peptídeo-molécula HLA do doador é reconhecido como não-próprio pelo TCR (do inglês, *T Cell Receptor*) do receptor e inicia-se o mecanismo primário de indução de citotoxicidade.

Na via indireta, os linfócitos T do receptor reconhecem alo-antígenos processados e apresentados na forma de peptídeos presentes na superfície celular das APCs do receptor, geralmente junto à molécula HLA classe II.

No processo de rejeição ao órgão transplantado, as duas vias de alo-reconhecimento parecem estar envolvidas. Imediatamente após o transplante, o enxerto é rico em APCs, em especial em células dendríticas, o que favorece a apresentação do alo-antígeno por via direta. Por esse motivo, acredita-se que exista uma maior participação da via direta nos processos de rejeição aguda. Com o passar do tempo, as

APCs do doador diminuem, o que parece favorecer maior participação da via indireta, sendo que alguns autores postulam que essa seja a via predominante na rejeição crônica (12-14).

Mais recentemente, foi descrita a via semi-direta de alo-reconhecimento. Essa via envolve contato célula-célula ou ainda distribuição e captação de vesículas exossomais podendo estimular resposta imunológica nas células T (15).

1.3 Mecanismos efetores da rejeição

Após o alo-reconhecimento, ocorre ativação dos linfócitos T CD8⁺ e dos linfócitos T CD4⁺. Os antígenos HLA de classe I ativam os linfócitos T citotóxicos CD8⁺, dando início à expansão clonal de células alo-reativas, que induzem a citotoxicidade através da liberação de grânulos citotóxicos, de perforinas e granzimas, culminando em apoptose e lise celular. Os antígenos HLA de classe II ativam os linfócitos T auxiliares CD4⁺, dando início à produção de citocinas com perfil Th1 e Th2 (5).

A terminologia da Th1 e Th2 é utilizada para identificar dois subtipos de células T auxiliares (CD4⁺), de acordo com as citocinas produzidas e com o perfil funcional. As células T auxiliares CD4⁺ Th1 produzem principalmente interleucina-2 (IL-2), que potencializa o estímulo para expansão clonal de linfócitos T citotóxicos CD8⁺, estimula produção de INF- γ e de TNF- α e ainda a imunidade celular pró-inflamatória por meio da ativação de monócitos,

macrófagos e células NK (do inglês, *Natural Killer*). Essas células efectoras podem infiltrar o enxerto.

As células T auxiliares CD4⁺ Th2, que regulam a ativação de linfócitos B, produzem interleucina 4 (IL-4), 5 (IL-5), 10 (IL-10) e 13 (IL-13). Além disso, estão envolvidas na resposta humoral e têm ação imuno-reguladora ou antiinflamatória (16).

As interleucinas de perfil Th2, principalmente a IL-4, por serem fatores de crescimento de linfócitos B, levam à expansão clonal de plasmócitos e à produção de anticorpos, cuja interação com alo-antígenos específicos ativa a resposta inflamatória envolvendo o sistema complemento. Outro mecanismo de ação dos anticorpos pode ser por citotoxicidade celular dependente de anticorpo (do inglês, *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity- ADCC*) com ativação de células NK ou de macrófagos, promovendo lise das células-alvo (5).

Nos casos mais severos, com lesão endotelial intensa, pode ocorrer ativação da cascata do complemento e do sistema de coagulação, fazendo migrar para o parênquima do órgão transplantado polimorfonucleares e plaquetas, com formação de trombos e obstrução vascular, evoluindo, muitas vezes, para a perda do enxerto.

Essa cascata de eventos culmina em lesão tecidual e manifestações clínicas variadas, podendo levar à rejeição aguda ou crônica. Drogas imunossupressoras são usadas para bloquear esse processo de rejeição.

1.4 Classificação histológica das rejeições

Vários critérios morfológicos para a classificação das rejeições aguda e crônica foram propostos (17, 18). Essas classificações visam a padronizar a interpretação da biópsia renal após o transplante, sendo a Classificação de Banff 97 universalmente aceita para essa finalidade (18).

A recente incorporação do marcador C4d na avaliação morfológica de enxertos renais está auxiliando o entendimento da patologia no transplante renal. O C4d é um produto da degradação do fator C4 da via clássica do sistema complemento. Liga-se covalentemente, ligação forte e estável, à superfície da célula endotelial, o que facilita sua detecção por imuno-histoquímica, e é um indicador indireto da presença de anticorpos no tecido renal (19).

Em muitos episódios de rejeição, os componentes humorais e celulares podem ocorrer simultaneamente, sendo o componente humoral muitas vezes não diagnosticado em cortes histológicos convencionais. Diante da necessidade de diferenciar lesão histológica mediada por células daquelas mediadas por anticorpos, considera-se atualmente que a pesquisa de C4d deve ser feita em todas as biópsias de rins transplantados (20, 21). Os achados de evidência de ação de anticorpos no processo podem ocorrer em casos em que o diagnóstico histológico é de necrose tubular aguda, alterações limítrofes, rejeição aguda ou rejeição crônica (22).

Alguns achados histológicos sugerem fortemente a participação de anticorpos, como a presença de neutrófilos em capilares peritubulares, arterite transmural, necrose fibrinóide arterial, glomerulite aguda com infiltrado de

monócitos e macrófagos e a presença de trombos capilares. No entanto, esses achados não são específicos para o diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos e, portanto, outros critérios diagnósticos devem ser avaliados.

Revisões periódicas e mais recentes incorporaram o diagnóstico de *Rejeição Mediada por Anticorpos* à Classificação de Banff (22, 23). Dessa forma, atualmente as rejeições são classificadas como agudas ou crônicas, podendo ser mediadas por anticorpos ou por células (23). Os critérios definidos pela classificação de Banff para a Rejeição Mediada por Anticorpos são:

- Rejeição aguda/ativa mediada por anticorpos:
 1. Evidência morfológica de lesão tecidual aguda, como:
 - Necrose tubular aguda; ou
 - Neutrófilos e/ou células mononucleares em capilares peritubulares e/ou glomérulos e/ou trombose capilar; ou
 - Arterite intimal/necrose fibrinóide/ arterite intramural ou transmural.
 2. Evidência imunopatológica de ação de anticorpos, como:
 - Deposição de C4d; e/ou
 - Deposição de imunoglobulinas nos capilares peritubulares (raro); ou
 - Deposição de imunoglobulinas e complemento nas áreas de necrose arterial fibrinóide.

3. Evidência sorológica de anticorpos circulantes, como:

- Presença de anticorpos dirigidos contra antígenos HLA do doador; ou
- Presença de anticorpos contra outros antígenos endoteliais do doador (anticorpos não-HLA).

▪ Rejeição crônica/ativa mediada por anticorpos:

1. Evidência morfológica de lesão tecidual, como:

- Duplicação (“duplo contorno”) da membrana basal glomerular; e/ou
- Multilaminação da membrana basal glomerular; e/ou
- Fibrose intersticial/atrofia tubular com ou sem perda de capilares peritubulares;
- Fibrose intimal em artérias sem duplicação da camada elástica.

2. Evidência imunopatológica de ação de anticorpos, como:

- Deposição difusa de C4d em capilares peritubulares.

3. Evidência sorológica de anticorpos circulantes:

- Presença de anticorpos dirigidos contra antígenos HLA do doador; ou
- Presença de anticorpos contra outros antígenos endoteliais do doador (anticorpos não-HLA).

Além da disfunção do enxerto, achados morfológicos, imunopatológicos e sorológicos são necessários para o diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos (24).

1.5 Avaliação imunológica

1.5.1 Prova-cruzada contra linfócitos

Desde os primeiros transplantes realizados, sabe-se que receptores com anticorpos anti-HLA isotipo IgG pré-formados e direcionados contra antígenos HLA do doador têm maior risco de rejeição hiperaguda (25). Após a introdução, por Patel e Terasaki, da prova-cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC), a incidência de rejeição hiperaguda diminuiu drasticamente (26). Esse teste é a base para a detecção de anticorpos anti-HLA. Mais recentemente, métodos mais sensíveis (que detectam anticorpos em baixos títulos) e mais específicos (que detectam somente anticorpos anti-HLA) têm sido desenvolvidos, o que contribuiu para o crescente interesse pelos processos mediados por anticorpos.

O teste CDC clássico, também denominado CDC-NIH (do inglês, *Complement Dependent Cytotoxicity-National Institute of Health*), baseia-se na incubação de linfócitos do doador com soro do receptor, seguida de adição de complemento de coelho e posterior verificação da lise celular por meio de corantes vitais com leitura da reação em microscópio óptico (27). No

decorrer dos anos, surgiram modificações da técnica CDC-NIH com o intuito de aumentar sua sensibilidade. A adição de antiglobulina humana (AGH; do inglês, *antihuman globulin- AHG*) na prova-cruzada contra linfócitos T (CDC-AGH) aumentou a sensibilidade do teste, propiciando a detecção de anticorpos em baixos títulos e de anticorpos não fixadores de complemento (28, 29). Como os linfócitos B expressam, em sua superfície, imunoglobulinas, o uso de AGH não é preconizado na prova-cruzada contra esse tipo celular, pois o AGH pode se ligar à imunoglobulina de superfície e fixar complemento, independentemente de anticorpos reativos contra antígenos do doador, levando a um resultado falso-positivo.

Pela técnica de CDC, pode-se detectar tanto anticorpos do isotipo IgM quanto do isotipo IgG. Para caracterizá-los, utiliza-se o agente redutor ditiotreitól (DTT), que destrói as pontes dissulfeto das moléculas de IgM, inativando-as, sem interferir na reatividade dos anticorpos da classe IgG.

A despeito do uso de CDC-AGH, a técnica de citometria de fluxo (CF) foi introduzida na década de 90 e é capaz de detectar anticorpos em baixos títulos e não fixadores de complemento. A prova-cruzada por citometria de fluxo (FCXM, do inglês, *Flow Cytometry Crossmatch*) baseia-se na incubação do soro do receptor com linfócitos totais do doador, seguida da adição de anticorpo secundário conjugado com fluorocromo (30). Tem a vantagem de propiciar a avaliação, independente e simultânea, da prova-cruzada contra os linfócitos T e B do doador, além de ser mais sensível do que a prova-cruzada CDC-AGH. A desvantagem é que, por ser muito sensível, podem ocorrer resultados falso-positivos. A relevância clínica da

sua positividade é aumentada pela interpretação combinada com a pesquisa de anticorpos pelos ensaios de fase sólida (31).

Vale ressaltar que provas-cruzadas positivas contra linfócitos T sugerem a presença de anti-HLA classe I. No entanto, provas-cruzadas positivas contra linfócitos B podem indicar a presença de anticorpos anti-HLA classe I ou classe II, uma vez que os linfócitos B expressam constitutivamente em sua superfície moléculas HLA classe I e classe II, sendo que as moléculas HLA classe I estão presentes em alta densidade nesse tipo celular. Anticorpos detectados por CDC são, em geral, direcionados contra antígenos HLA, mas, ocasionalmente, podem ser direcionados contra antígenos não-HLA.

Ensaio de fase sólida são aqueles que utilizam moléculas HLA purificadas e aderidas em placas ou à microesferas. O desenvolvimento e a implementação dessas técnicas otimizaram a identificação dos anticorpos anti-HLA e são mais sensíveis e específicas do que os ensaios de citotoxicidade para identificar anticorpos anti-HLA classe I e classe II (32). Exemplos de ensaios de fase sólida são as provas-cruzadas por ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e por microesferas (plataforma Luminex®). Essas provas-cruzadas são análogas aos testes de painel por essas técnicas, conforme discutido a seguir.

O tipo do teste utilizado deve ser levado em consideração na interpretação clínica dos resultados, uma vez que todos os testes apresentam limitações. Apesar de a técnica de CDC propiciar informações úteis a respeito do perfil de anticorpos do receptor, o uso de ensaios de fase

sólida podem fornecer informações adicionais de relevância clínica, de modo a aumentar a sensibilidade dos testes utilizados (33).

1.5.2 Reatividade contra painel

O teste de reatividade contra painel ou PRA (do inglês, *Panel Reactive Antibody*) indica o grau de sensibilização HLA do receptor de transplante de órgãos em relação à população de possíveis doadores. Historicamente, sua avaliação é feita pela técnica de CDC, utilizando-se um painel de linfócitos com especificidades HLA previamente definidas e que representem a tipagem HLA da população estudada.

Ensaio de fase sólida, tais como o teste PRA-ELISA (do inglês, *Panel Reactive Antibodies by Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) e a citometria de fluxo com o uso de microesferas, foram introduzidos com a finalidade de aumentar a sensibilidade e, principalmente, de propiciar a definição da especificidade dos anticorpos detectados.

O PRA-ELISA baseia-se na utilização de moléculas HLA solúveis aderidas em placas. Para a realização desse ensaio, são utilizados anticorpos secundários que podem detectar anticorpos do isotipo IgM ou IgG (34). Sua sensibilidade é semelhante à do teste CDC-AGH e apresenta a vantagem adicional de propiciar a diferenciação entre os anticorpos anti-HLA de classe I e de classe II. Além disso, como a detecção de anticorpos anti-HLA é específica, esse teste não sofre interferência de auto-anticorpos nem de outros anticorpos anti-linfocitários (35).

Recentemente, foram introduzidas técnicas que avaliam a reatividade contra painel por citometria de fluxo. Essas técnicas baseiam-se no uso de alelos HLA extraídos de células recombinantes. Esses alelos podem ser de classe I ou de classe II e são aderidos às microesferas, de modo a determinar a especificidade do anticorpo encontrado (36, 37). Dentre os testes disponíveis, estão aqueles que utilizam microesferas marcadas com HLA classe I e II (*LabScreen Mixed*®), microesferas marcadas com HLA classe I ou Classe II (*FlowPRA*®), ou ainda microesferas marcadas individualmente com o alelo HLA de interesse (*Single Antigen*®). São testes de alta sensibilidade e que independem da disponibilidade de células do doador. No entanto, trata-se de metodologia de alto custo e que não está disponível na maioria dos centros transplantadores.

Uma abordagem prática para os receptores de transplante renal seria o uso de um teste rotineiro para avaliar a presença de anticorpos anti-HLA, associado ao emprego de algum outro teste com capacidade de avaliar a especificidade do anticorpo, definindo assim o risco imunológico do receptor de transplante renal.

1.6 Revisão da literatura

1.6.1 Anticorpos anti-HLA pré-transplante

Pacientes podem ser sensibilizados contra antígenos HLA através de exposição prévia a transplantes, gestações/abortamentos e hemotransfusões (38).

A presença de anticorpos anti-HLA no período pré-transplante é um fator de risco conhecido e independente para rejeição e para falência do enxerto (39, 40). Um estudo que avaliou o impacto da presença de anticorpos anti-HLA pré-transplante sobre a sobrevida do enxerto no 2º ano após o transplante renal, demonstrou que pacientes sem anticorpos anti-HLA apresentaram sobrevida do enxerto de 84%, enquanto que, pacientes com anticorpos anti-HLA isolados, seja de classe I ou de classe II, apresentaram, respectivamente, sobrevida de 77% e 79%. Pacientes com anticorpos anti-HLA classe I e classe II evoluíram com 70% de sobrevida do enxerto em 2 anos (41).

Na UTR-HCFMUSP, cerca de 30% dos pacientes em lista de espera para transplante renal têm anticorpos anti-HLA pré-transplante. Uma forma de diminuir o risco de rejeição nesses casos seria o uso de terapia de indução. Castro *et al* compararam o uso de terapia de indução, o grau de sensibilização anti-HLA pré-transplante e a ocorrência de rejeição aguda e demonstraram que o uso de terapia de indução, com Basiliximab® ou Timoglobulina, em pacientes com PRA entre 10 e 50%, diminuiu a taxa de rejeição aguda quando comparado com o grupo que não a havia recebido (42). O mesmo ocorreu com pacientes com PRA maior que 50% e que receberam indução com Timoglobulina (42).

Mais recentemente, a dessensibilização de pacientes com imunoglobulina polivalente humana (IVIg) está sendo utilizada com o intuito de diminuir o título dos anticorpos anti-HLA doador-específicos, de modo a negatizar a prova-cruzada de pacientes hipersensibilizados e, dessa forma,

tornar viável o transplante nos mesmos (43, 44). Outros protocolos de dessensibilização utilizam a combinação de plasmaferese e IVIg (45).

1.6.2 Anticorpos anti-HLA pós-transplante

Nos últimos 40 anos, as células T foram consideradas o principal fator regulador e desencadeante dos processos de rejeição, o que contribuiu para o surgimento de novas drogas imunossupressoras com capacidade para reduzir a ativação e a proliferação das células T e, conseqüentemente, a diminuição das taxas de rejeição aguda. No entanto, rejeições agudas continuam ocorrendo e têm impacto na rejeição crônica (46).

A introdução de técnicas que melhor identificam anticorpos circulantes reacendeu o interesse em avaliar a produção de anticorpos após o transplante e seu impacto sobre a ocorrência de rejeição e sobrevida do enxerto. Tanto estudos *in vivo* quanto *in vitro* expandiram o atual entendimento das lesões mediadas por anticorpos, e atualmente é aceito que a contribuição dos anticorpos para rejeições aguda e crônica é maior do que havia sido previamente avaliada (47, 48).

Em um estudo pioneiro, Halloran *et al* atraíram a atenção dos pesquisadores para a importância dos anticorpos anti-HLA após o transplante e do seu impacto na sobrevida do enxerto (49). Esses autores relataram que 20% dos pacientes sem anticorpos anti-HLA no pré-transplante desenvolveram anticorpos anti-HLA classe I *de novo* nos primeiros três meses após a cirurgia. Todos esses pacientes cursaram com

rejeição aguda, enquanto que 41% dos pacientes que não desenvolveram anticorpos apresentaram esse evento. Os elevados níveis de anticorpos pós-transplante foram associados à severidade da rejeição aguda. Lesão vascular, glomerulite e infarto renal foram achados histológicos predominantes entre os pacientes com anticorpos, enquanto tubulite predominou naqueles pacientes sem anticorpos (50).

Em nosso centro, Castro *et al* avaliaram retrospectivamente 339 transplantes renais, nos quais 21 pacientes (6%) evoluíram com rejeição aguda Banff III. Dentre os pacientes desse grupo que evoluíram com perda do enxerto (38%) houve aumento do PRA, por citotoxicidade, de 5% no pré-transplante para 40% no pós-transplante, sugerindo que a imunidade humoral anti-HLA estaria implicada na patogênese e na gravidade desse tipo de rejeição no pós-transplante (51).

Monteiro *et al* estudaram, em nossa instituição, soros pré e pós-transplante renal de 124 pacientes e demonstraram que a presença de anticorpos anti-HLA classe I do isotipo IgG no pós-transplante, detectados pela técnica de PRA-ELISA, foi o principal fator de risco para a diminuição da sobrevida do enxerto em 1 ano (52). Outros autores (53) avaliaram retrospectivamente, também por técnica de PRA-ELISA, 112 receptores de transplante renal, que evoluíram com perda do enxerto e foram reinscritos para novo transplante. Esses pacientes foram comparados com 123 pacientes transplantados na mesma ocasião, mas que permaneceram com o enxerto funcionando durante um período de 5 anos. Dentre os pacientes que cursaram com perda do enxerto, os autores puderam detectar anticorpos anti-HLA em 51% deles, enquanto que esses anticorpos foram detectados

em apenas 1,6% dos pacientes do grupo controle. Anticorpos anti-HLA doador-específicos foram detectados em 60% dos pacientes com anticorpos e precederam a falência do enxerto, sugerindo que a produção de anticorpos pós-transplante é fator preditor para a falência do enxerto.

Crespo *et al* estudaram 81 pacientes que cursaram com rejeição aguda nos primeiros 3 meses após o transplante e demonstraram que nenhum dos pacientes com rejeição córtico-sensível apresentou anticorpos anti-HLA doador-específicos, enquanto que esses anticorpos foram detectados em 37% dos pacientes com rejeição córtico-resistente (54).

Em um estudo prospectivo que avaliou 49 pacientes com risco imunológico elevado, os autores (55) detectaram que 38,8% dos pacientes apresentaram anticorpos anti-HLA não doador-específico e que 22,4% deles apresentaram anticorpos doador-específicos, sendo que estes últimos cursaram com rejeição mediada por anticorpo.

Em outro estudo, que avaliou anticorpos anti-HLA pelas técnicas de CDC, ELISA e microesferas em 1.229 receptores de transplante de rim com pelo menos 1 ano de transplante, os autores demonstraram que 5,5% dos pacientes apresentaram anticorpos anti-HLA doador-específicos, 11,3% apresentaram anticorpos não doador-específicos e 83% permaneceram sem anticorpos (56). Na análise multivariada, a incompatibilidade HLA-DR, a sensibilização pré-transplante e a ocorrência de rejeição aguda no pós-transplante associaram-se significativamente à presença de anticorpos, sejam anti-HLA doador-específicos ou não. Pacientes com anticorpos evoluíram com pior sobrevida do enxerto, pior função renal e mais proteinúria.

A prevalência de anticorpos anti-HLA em 2.278 transplantados renais foi de 20,9%, conforme demonstrado por Terasaki *et al* em um estudo multicêntrico (57). Pacientes que desenvolveram anticorpos pós-transplante tiveram 8,3% de falência do enxerto em 1 ano, contra 3,3% de falência naqueles sem anticorpos. Os autores sugerem que o aparecimento de anticorpos circulantes precede o episódio de rejeição não só em transplante renal, mas também em transplantes de coração, pulmão e fígado, e que esses anticorpos podem estar envolvidos na rejeição crônica. Neste estudo, e em outros, a pesquisa dos anticorpos foi aleatória, em qualquer ocasião pós-transplante, e a especificidade dos mesmos não foi definida.

Enquanto a importância dos anticorpos anti-HLA classe I é conhecida, a determinação da relevância dos anticorpos anti-HLA classe II ainda não foi totalmente estabelecida, uma vez que grande número de pacientes desenvolve anticorpos classe I e classe II simultaneamente. A incidência de anticorpos anti-HLA classe II, mas não classe I, detectada no pós-transplante aumenta em paralelo com o aumento da incidência de rejeição aguda, segundo alguns autores (58). A análise multivariada demonstra que anticorpos anti-classe II são fatores de risco para rejeição crônica em pacientes com antecedente de rejeição aguda (58) e que sua detecção a partir do 3º ano pós-transplante pode associar-se à perda do enxerto por rejeição crônica (59). Considerando que os anticorpos anti-HLA podem ser detectados antes da rejeição ou da falência do enxerto, sugere-se que sua monitorização prospectiva possa ser um marcador precoce e não invasivo, que auxilia no diagnóstico e na terapêutica precoce da rejeição (53, 60-63).

Outro importante marcador para o diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos é a deposição de C4d em capilares peritubulares nas biópsias renais. O estudo pioneiro que utilizou a marcação por C4d foi o de Feucht *et al* (19). Nesse estudo, 51 de 93 biópsias de rins transplantados que cursaram com disfunção do enxerto foram positivas para C4d, sendo a sobrevida do enxerto após um ano de 57% nos pacientes com deposição difusa e de 90% nos pacientes com biópsias sem deposição de C4d. Sua deposição em capilares peritubulares é preditiva da sobrevida do enxerto, independentemente da lesão histológica encontrada e dos demais fatores prognósticos (64). A deposição de C4d tem especificidade de 96% e sensibilidade de 95% quando a presença de anticorpos anti-HLA doador-específicos circulantes são considerados padrão-ouro para o diagnóstico de rejeição mediada por anticorpo (65).

O C4d praticamente não é detectado em doença renal primária, mas está presente em cerca de 30% das biópsias realizadas após-transplante renal (20, 66). Ocorre em 24% a 43% das biópsias renais com rejeição aguda Banff I; em 45% na rejeição aguda Banff II; em 50% das rejeições Banff III; em 50% a 60% das glomerulites e somente em 14% das biópsias sem evidência histológica de rejeição. Sua detecção é limitada a órgãos transplantados; e, diante de um resultado positivo, deve-se avaliar o quadro clínico e a presença de anticorpos anti-HLA circulantes (22).

Fatores de risco para deposição de C4d são a presença de anticorpos pré-formados, número de transplantes prévios, número de gestações, resistência ao tratamento anti-rejeição e presença de anticorpos anti-HLA *de novo* (54, 67, 68).

Vários estudos tentam correlacionar a presença de C4d com anticorpos circulantes, mas essa correlação não é perfeita. Anticorpos anti-HLA podem ser detectados na ausência de C4d, e vice-versa (3, 67, 69, 70). Anticorpos anti-HLA classe I e/ou classe II estão presentes em cerca de 88% a 95% dos pacientes que cursam com rejeição do enxerto e deposição para C4d, enquanto ocorrem em menos de 10% das rejeições sem marcação para C4d (67, 71). A deposição de C4d sem detecção de anticorpos anti-HLA circulantes pode ser consequência da absorção desses anticorpos pelo enxerto (40), o que pode ser demonstrado através da eluição de anticorpos anti-HLA do enxerto rejeitado e nefrectomizado (72). Anticorpos circulantes na ausência de C4d podem ocorrer no caso de anticorpos não fixadores de complemento ou de anticorpos anti-HLA em baixos títulos e, portanto, não detectados pelas técnicas habituais; ou ainda pela presença de anticorpos não-HLA (73).

A relevância dos anticorpos não-HLA na deposição de C4d em biópsias de enxerto renal ainda permanece obscura devido ao limitado número de estudos disponíveis na literatura. Alguns autores sugerem que, *in vitro*, anticorpos não-HLA não desencadeiam lise mediada por complemento das células endoteliais ou de outras células-alvo; no entanto, tais anticorpos possuiriam outras funções efetoras, tais como efeitos pró-inflamatórios, pró-coagulantes e indução da apoptose das células endoteliais. Essa modulação da resposta imune via anticorpos não-HLA pode também ser responsável pela disfunção e pela perda do enxerto (74). Outros estudos, no entanto, sugerem que anticorpos não-HLA podem causar deposição de C4d na rejeição aguda (22, 75), mas esse seria um evento raro e dependente do título desses anticorpos (76).

Relação entre anticorpos circulantes, deposição de C4d e patologia renal são critérios diagnósticos para rejeição mediada por anticorpos, o que é atualmente aceito como entidade clínico-patológica (77).

Analisando os estudos já realizados, observamos que a pesquisa dos anticorpos no pós-transplante não foi realizada de forma seriada e dinâmica em nenhum deles, mas sim de forma aleatória. A correlação temporal com os episódios clínicos e com a histologia da rejeição não foi bem definida, principalmente em subgrupos de pacientes sensibilizados e não sensibilizados, tornando difícil definir a importância da detecção desses anticorpos como marcadores precoces de rejeição aguda. Com base nas lacunas existentes na literatura, optamos por um estudo com coletas seriadas de soro durante o primeiro ano após o transplante renal, com o intuito de avaliar os anticorpos anti-HLA após o mesmo, bem como sua associação com os episódios de rejeição aguda e com a marcação de C4d nas biópsias renais.

Nesse contexto, considerando o potencial papel dos anticorpos anti-HLA após o transplante renal, levantamos como hipótese no presente estudo que os anticorpos anti-HLA estão associados à rejeição aguda, à marcação positiva pelo C4d em biópsias renais e à menor sobrevida do enxerto, especialmente quando esses anticorpos são dirigidos contra antígenos HLA do doador.

2. OBJETIVOS

Principal

- Avaliar a presença de anticorpos anti-HLA após o transplante renal e sua influência na rejeição aguda do enxerto.

Secundários

- Avaliar a especificidade de anticorpos anti-HLA classe I e classe II no decorrer da evolução clínica dos transplantes;
- Associar a detecção desses anticorpos com os episódios de rejeição e com achados histológicos de biópsias renais, conforme a Classificação de Banff 97, atualizada em 2003;
- Avaliar o impacto da rejeição sobre a função renal e sobre a sobrevida do enxerto ao final do primeiro ano de transplante.

3. MÉTODOS

3.1 Casuística

Este é um estudo prospectivo observacional que avaliou pacientes submetidos a transplante renal isolado, com doador falecido ou vivo. Foi realizado na Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (UTR HC-FMUSP), e os pacientes foram acompanhados durante um período de 12 meses após o transplante ou até a perda do enxerto.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) em sessão de 11 de maio de 2005, sob o nº 1.099/04, e submetido à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com aprovação em 01/02/2006, Processo nº 2005/03958-4.

A avaliação para inclusão dos pacientes no estudo foi realizada no momento da internação hospitalar para a realização do transplante. Os pacientes que preencheram todos os critérios de inclusão e nenhum dos critérios de exclusão foram então convidados a participar e a consentir formalmente a sua participação no estudo.

Critérios de Inclusão

- Pacientes com mais de 12 anos de idade;
- Receptores de rim primário ou casos de re-transplante, com doadores falecidos ou vivos (parentes ou não parentes);

- Pacientes que tenham consentido e outorgado o seu consentimento por escrito.

Critérios de Exclusão

- Pacientes receptores de transplantes de múltiplos órgãos ou com transplante prévio de outro órgão, que não o rim;
- Pacientes recebendo alguma droga em fase de investigação;
- Pacientes com dificuldade de acesso vascular periférico para coleta freqüente de sangue.

Após consentirem em participar do estudo, foi feita uma reavaliação da história clínica e imunológica, incluindo antecedentes de transplantes, gestações/abortos, hemotransfusões, provas-cruzadas prévias e grau de sensibilização anti-HLA.

Todos os pacientes receberam rim de doador com tipagem sangüínea ABO compatível e foram transplantados com prova-cruzada por CDC negativa.

A imunossupressão utilizada foi definida de acordo com as indicações habituais do grupo, levando-se em consideração as características clínicas e imunológicas dos pacientes no pré-transplante. O controle clínico e as condutas foram realizados conforme a rotina do serviço. As biópsias renais foram indicadas pelo médico assistente quando o paciente apresentava sinais clínicos e/ou laboratoriais que sugerissem rejeição.

3.2 Desenho do estudo

Os pacientes foram submetidos a coletas de sangue para pesquisa de anticorpos anti-HLA imediatamente antes do transplante e nos dias 7, 14, 30, 60, 90, 180 e 360 após o mesmo, conforme demonstrado na Figura 1.

Foram utilizados soros para a pesquisa de anticorpos anti-HLA pelo teste de reatividade contra painel (PRA-ELISA). Os soros foram testados para avaliar a presença ou a ausência de anticorpos anti-HLA classe I e classe II do isotipo IgG (teste qualitativo). Detectada a presença de anticorpos anti-HLA, foi realizado o teste de PRA-ELISA quantitativo, de modo a definir a porcentagem e a especificidade (classe I e/ou classe II) dos anticorpos.

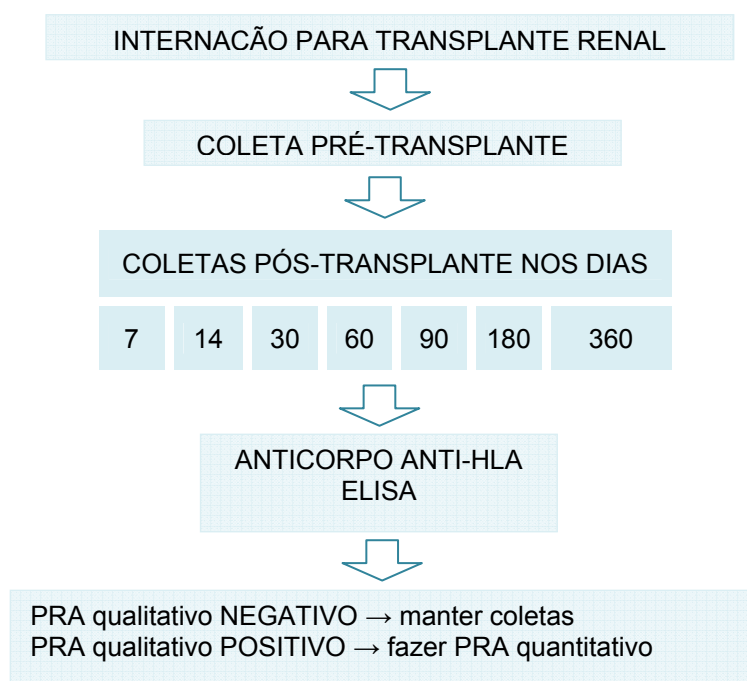


Figura 1 - Fluxograma de execução das coletas de sangue para pesquisa de anticorpos anti-HLA.

Na amostra do 12º mês, foi avaliada a creatinina sérica e calculada a depuração de creatinina pela equação de Cockcroft-Gault.

Considerando a freqüente, embora discreta, oscilação dos resultados de PRA-ELISA, tanto no período pré quanto pós-transplante, os pacientes foram alocados em 6 Categorias conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Categorias dos pacientes segundo níveis de PRA

Pacientes sem anticorpos anti-HLA	
PRA=0%	Categoria 0
Pacientes com anticorpos anti-HLA	
PRA de 1 a 10%	Categoria 1
PRA de 11 a 30%	Categoria 2
PRA de 31 a 50%	Categoria 3
PRA de 51 a 80%	Categoria 4
PRA de 81 a 100%	Categoria 5

PRA: Reatividade contra painel

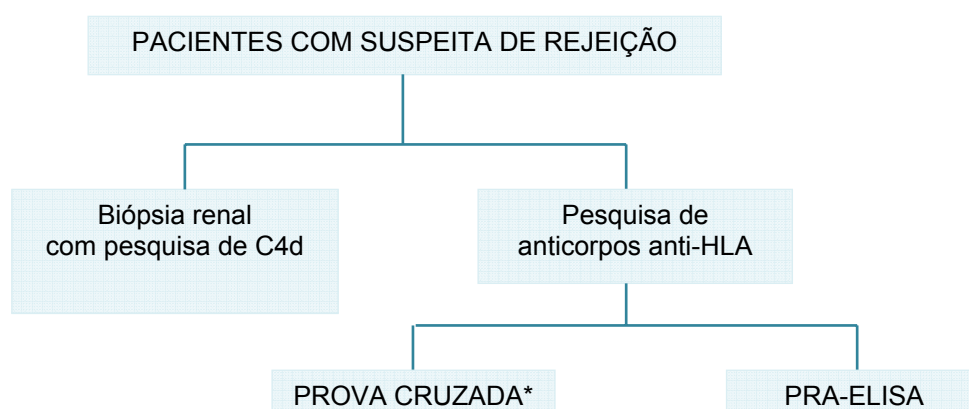
No período pós-transplante, foi considerado aumento do PRA quando o paciente ascendeu em Categoria (por exemplo, passou da Categoria 1 para a Categoria 2). De forma análoga, foi considerada diminuição do PRA quando o paciente descendeu em Categoria. A mudança de Categoria indica que houve alteração substancial na reatividade contra painel.

A presença de anticorpos anti-HLA dirigidos contra antígenos HLA do doador (anticorpos doador-específicos) foi avaliada por prova-cruzada contra linfócitos T e B pela técnica de CDC-AGH, com e sem tratamento com DTT. Nos pacientes que receberam terapia com anticorpos anti-linfocitários (Timoglobulina), a pesquisa de anticorpos anti-HLA doador-específicos foi realizada por prova-cruzada contra linfócitos por citometria de fluxo, pois

essa droga pode ocasionar um resultado falso-positivo na prova-cruzada por CDC. Isso ocorre porque os anticorpos anti-linfocitários podem se ligar aos antígenos na superfície dos linfócitos. Essa ligação antígeno-anticorpo, em presença de complemento de coelho, culmina na ativação da cascata do sistema complemento e conseqüente lise celular, proporcionando resultados falso-positivos.

Nos casos em que as provas-cruzadas foram positivas ou na indisponibilidade de células do doador para a realização da prova-cruzada, o teste de microesferas *Single Antigen*® foi empregado para definir a especificidade do anticorpo encontrado.

Em todos os casos de suspeita clínica de rejeição, definida como piora da função renal, diminuição do débito urinário e/ou função retardada do enxerto (necessidade de diálise nos primeiros 7 dias após o transplante), o paciente foi submetido à biópsia renal com pesquisa de C4d, conforme rotina do serviço. Nessa ocasião, foi realizada nova coleta de soro para pesquisa dos anticorpos por prova-cruzada contra linfócitos T e B do doador e por PRA-ELISA, conforme mostra a Figura 2.



* prova-cruzada contra linfócitos T e B por citotoxicidade e/ou por citometria de fluxo.

Figura 2 - Pacientes com suspeita de rejeição.

As biópsias renais foram realizadas pela equipe de Urologia da UTR HC-FMUSP, preferencialmente pela via percutânea, e avaliadas na Divisão de Anatomia Patológica da FMUSP. Os fragmentos foram submetidos à avaliação histopatológica com as colorações tradicionais e à pesquisa de C4d por imunofluorescência indireta e/ou imunoperoxidase e classificadas conforme os Critérios de Banff 97, atualizados em 2003.

Marcação positiva para C4d foi definida como deposição linear do C4d detectada por imunofluorescência (IF) ou por imunoperoxidase (IP) e assim classificada:

C4d Negativo: sem qualquer marcação;

C4d Mínimo: marcação entre 1% e 10% dos capilares peritubulares;

C4d Focal: marcação entre 11% e 50% dos capilares peritubulares;

C4d Difuso: marcação >50% dos capilares peritubulares.

Consideramos como episódios distintos de rejeição aquelas cujo tempo do diagnóstico entre uma biópsia e outra foi superior a 30 dias.

A rejeição aguda mediada por anticorpos anti-HLA foi definida como aquela que, além da disfunção renal, apresentou-se com pelo menos dois dos seguintes critérios: lesão histológica na biópsia renal compatível com rejeição, deposição de C4d difusa ou focal em capilares peritubulares e presença de anticorpos anti-HLA doador-específicos circulantes.

Pacientes que retornaram para o tratamento dialítico, submetidos ou não à nefrectomia do enxerto, foram considerados como casos de falência do transplante. Pacientes que evoluíram para óbito com enxerto funcional não foram considerados como casos de falência do transplante.

Rejeições consideradas leves na classificação de Banff (limítrofes e Banff I) foram tratadas durante 3 dias com pulsos diários de Metilprednisolona endovenosa na dose de 8 a 12 mg/Kg/dia. Rejeições córtico-resistentes ou classificadas como Banff II ou Banff III foram tratadas com Timoglobulina na dose de 1,5 mg/Kg/dia durante 5 dias. Rejeições mediadas por anticorpos foram tratadas com IVIg na dose de 2g/Kg durante 2 dias e/ou com plasmaferese.

3.3 Estudo imunológico

3.3.1 Obtenção de soros do receptor

Os soros foram obtidos a partir da coleta de 15 mL de sangue periférico em tubos *vacutainer* (Becton Dickson, Mountainview, CA, EUA) sem anticoagulante, e permaneceram armazenados em refrigeradores a – 40 °C até o momento da realização dos ensaios.

3.3.2 Obtenção de células do doador

Nos casos de transplantes com doadores vivos, células mononucleares dos doadores foram obtidas a partir de 30 mL de sangue periférico coletados em tubos *vacutainer* (Becton Dickson, Mountainview, CA, EUA) com o anticoagulante heparina sódica.

Nos casos de transplantes com doadores falecidos, foram coletados fragmentos de baço ou linfonodo dos doadores e foram reduzidos a fragmentos menores para liberação das células presentes no parênquima.

Em ambos os casos, a suspensão celular obtida foi centrifugada a 1.500 rpm por 10 minutos, e ressuspensa em meio de cultura enriquecido com Soro Fetal Bovino a 10%. A contagem celular foi ajustada para se obter uma concentração de 15 a 20 x 10⁶ células/mL.

Os linfócitos totais foram distribuídos em tubos de criopreservação e refrigerados a -80 °C até o momento do uso.

3.3.3 Teste de citotoxicidade dependente de complemento (CDC)

As células mononucleares do doador foram separadas por centrifugação, utilizando-se Ficoll-Hypaque com gradiente de densidade 1,077g/L (78). Após a centrifugação, foi coletada a “nuvem” de células mononucleares. A trombina foi utilizada para eliminar as plaquetas existentes na suspensão celular, de modo que restassem apenas os linfócitos.

Pela técnica de aderência à lã de náilon, os linfócitos foram separados em linfócitos T e linfócitos B (79). A seguir, a concentração celular foi ajustada para 2,5 a 3,0 x 10⁶ células/mL antes de serem distribuídas em placas.

Foi incubado 1 µL da suspensão celular (linfócitos T ou linfócitos B do doador) com 1 µL de soro do receptor por poço, em placa de Terasaki (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA), durante 30 minutos para a placa com linfócitos T e durante 60 minutos para a placa com linfócitos B, em

temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 5 μL de complemento de coelho por poço (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA) em ambas as placas e a suspensão celular foi submetida à incubação durante 90 minutos em temperatura ambiente (80). A reação foi evidenciada pela adição de 10 μL de Stain-Fix (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA) e, depois de transcorridos 20 minutos, o resultado foi avaliado em microscópio de contraste de fase.

Para caracterizar o isotipo do anticorpo, foi utilizado o agente redutor ditioneitol (DTT), que destrói as pontes dissulfeto da molécula de IgM inativando-a, sem interferir na reatividade dos anticorpos do isotipo IgG. O DTT foi utilizado na proporção de 1:10 e incubado com o soro-teste durante 30 minutos a 37 °C, sob agitação a cada 5 minutos.

Para obter maior sensibilidade nesse teste, foi utilizado o anticorpo antiglobulina humana, AGH (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA), em uma placa contendo linfócitos T.

O teste de citotoxicidade foi considerado positivo quando houve mais de 20% de lise celular com o soro-teste, em comparação com o controle negativo.

3.3.4 Teste de reatividade contra painel por ELISA

Essa técnica baseia-se na apresentação de antígenos HLA purificados aderidos em placas de Terasaki manufaturadas. Esses antígenos são alvo para ligação de anticorpos presentes no soro do paciente (34).

O LAT™ Mixed (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA) contém antígenos HLA classe I e classe II aderidos às placas de Terasaki. É um teste qualitativo, e seu resultado é positivo ou negativo e depende, respectivamente, da presença ou da ausência desses anticorpos no soro testado.

O LAT™ 1240 (One Lambda, Canoga Park, CA) apresenta um painel de antígenos HLA com especificidades selecionadas, contendo 28 antígenos classe I e 12 antígenos classe II, e permite definir a porcentagem e a especificidade dos anticorpos na amostra testada, sendo, portanto, um teste quantitativo.

Foram incubados 10 µL de soro-teste por poço na placa de Terasaki durante 60 minutos na temperatura ambiente. Paralelamente e em poços específicos, foram incubados 10 µL de soro-controle. A placa foi então lavada com tampão de lavagem previamente diluído. A seguir, foram adicionados 10 µL de anticorpo anti-IgG humano conjugado com fosfatase alcalina em cada poço e incubado durante 40 minutos na temperatura ambiente. Após repetir a lavagem mais 2 vezes, foram adicionados 10 µL por poço de substrato enzimático, seguindo-se nova incubação a 37 °C por 10 a 15 minutos. A seguir, foram adicionados 5 µL por poço de solução bloqueadora antes de se iniciar a leitura. A leitura do teste foi realizada por leitor Bio-Tek ELx-800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA), e os resultados foram analisados por programa LAT para *Windows One Lambda*.

Para o LATTM Mixed, o resultado foi positivo ou negativo. O resultado do LATTM 1240 foi por porcentagem de PRA, variando de 0 a 100%, e a especificidade dos anticorpos detectados foi definida sempre que possível.

3.3.5 Prova-cruzada contra linfócitos por citometria de fluxo

Em uma placa de 96 poços de fundo em U, foram dispensados 100 μ L de suspensão celular (linfócitos totais do doador) com $0,5 \times 10^6$ células por poço. Após centrifugação da placa a 1.800 rpm durante 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e a suspensão celular foi ressuspensa em agitador de placa. A seguir, a suspensão celular foi lavada com 150 μ L por poço com tampão FACS (salina, soro fetal bovino a 2%, Azida 0,1%), seguida de nova centrifugação a 1.800 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Depois, foram adicionados 25 μ L por poço do soro correspondente (soro-controle negativo, soro-controle positivo e soro-teste) e a suspensão celular foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. O soro-controle negativo é composto por soro coletado de homem sadio, sem antecedentes de transfusão de hemocomponentes e do tipo sangüíneo AB; o soro-controle positivo é o soro de pacientes hipersensibilizados com anticorpos anti-HLA.

Após repetir o processo de lavagem por mais 3 vezes, a suspensão celular foi incubada com 25 μ L de anticorpo anti-IgG humano conjugado com FITC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), na diluição de 1:50, a 4 °C, durante 30 minutos. Repetiu-se a lavagem mais 3 vezes e, a seguir, a suspensão celular foi incubada com 25 μ L por poço de anticorpo anti-CD3

marcado com Cy-Chrome (Pharmigen, San Diego, CA, EUA), e com 25 μ L por poço de anticorpo anti-CD19 marcado com PE (Pharmigen, San Diego, CA, EUA), ambos na diluição de 1:10, a 4 °C durante 30 minutos e ao abrigo da luz. Esses anticorpos marcam antígenos de superfície nos linfócitos T e B, respectivamente. Após mais 3 lavagens, as células foram ressuspensas em 400 μ L de tampão FACS em tubos de leitura e, só então, foi iniciada a leitura do teste (30).

A análise do teste foi realizada em aparelho FACS-Calibur® (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). O resultado foi expresso em mediana de intensidade de fluorescência.

A prova-cruzada foi positiva quando a mediana de intensidade de fluorescência foi maior que 40 canais para linfócitos T e que 50 canais para linfócitos B acima dos valores do controle negativo.

3.3.6 Teste de microesferas marcadas (Luminex®)

Os testes LABScreen® (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA) baseiam-se na utilização de microesferas marcadas com antígenos HLA purificados classe I e classe II (81). As microesferas são codificadas por cores e podem ser avaliadas em um único tubo. O teste Mixed® detecta simultaneamente a presença de anticorpos anti-HLA classe I e/ou classe II. O teste de Flow-PRA® detecta a porcentagem e a especificidade dos anticorpos anti-HLA detectados em cada amostra. O teste *Single Antigen*® confirma a especificidade do anticorpo encontrado no teste de Flow-PRA®.

Em uma placa com 96 poços, foram incubados 2,5 μL de microesferas com 10 μL de soro-teste em cada poço, durante 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob homogeneização constante. Para cada conjunto de testes, foi utilizado um soro-controle negativo. Todos os dados foram normalizados para cada esfera, de acordo com os resultados do controle negativo.

Após a incubação, foram adicionados 150 μL de tampão de lavagem previamente diluído. A placa foi selada e submetida à homogeneização, seguida de centrifugação a 1.300 rpm durante 5 minutos. Depois, o tampão de lavagem foi removido com movimento súbito e o procedimento de lavagem foi repetido mais duas vezes.

Foram diluídos anticorpos IgG caprino anti-humano conjugado com PE em tampão de lavagem na diluição de 1:100 (0,5 μL de anticorpo IgG caprino anti-humano conjugado com PE com 49,5 μL de tampão de lavagem para cada poço). Foram adicionados 50 μL dessa solução por poço seguida de homogeneização e, só então, foi iniciada a incubação durante 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob homogeneização constante. Após nova lavagem, foram adicionados 70 μL de PBS. A seguir, o conteúdo da placa de reação foi transferido para a placa de aquisição, com fundo em U, para iniciar a leitura do teste.

A leitura do teste foi realizada em LABScanTM100 (Luminex Corporation, Austin, Texas, EUA) e foi avaliada por intensidade de fluorescência medida por citometria de fluxo.

Para os testes FlowPRA® e *Single Antigen*®, o valor fluorescente de cada esfera corresponde ao valor de cada esfera dividido pelo valor do controle negativo. Para os testes Mixed®, o sinal fluorescente equivale ao valor da esfera menos o valor do controle negativo.

3.4 Estudo histológico

3.4.1 Microscopia óptica

Para microscopia óptica, as colorações utilizadas foram hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS) e Tricrômio de Masson. A representatividade da amostra foi definida como sendo amostra cortical, com mais de 10 glomérulos e pelo menos 2 artérias.

3.4.2 Imunofluorescência indireta para C4d

Os fragmentos de rim congelado foram cortados numa espessura de 2 a 4 μm e colocados em superfície seca para descongelar durante 30 minutos. A seguir, os fragmentos foram submetidos à lavagem com PBS, seguida da aplicação de 150 μL do complexo avidina/biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) para bloquear a biotina endógena, durante 20 minutos. Após nova lavagem com PBS, foi iniciada a incubação dos fragmentos com anticorpo monoclonal de camundongo anti-C4d humano

(1:100 clone 10-11, Biogenesis, Sandown, NH, MO, EUA) durante 30 minutos. Os fragmentos foram lavados com PBS mais 3 vezes, durante 2 a 3 minutos. A seguir, foram incubados com anticorpo biotilado IgG de cavalo anti-camundongo na diluição de 1:100 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 30 minutos e incubados com FITC-estreptavidina na diluição 1:100 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 30 minutos (82).

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico.

3.4.3 Imunoperoxidase para C4d

A técnica de imunoperoxidase para C4d foi utilizada em amostras de biópsia renal em parafina.

Inicialmente as lâminas, contendo fragmentos de biópsia renal de 2 μm de espessura, foram submetidas à desparafinização e, em seguida, foram submetidas à hidratação.

Depois, os fragmentos foram submetidos à lavagem com PBS. A seguir, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3%. Os fragmentos foram submetidos a 2 sessões de lavagem em água corrente destilada, e os antígenos foram recuperados por cocção em panela-de-pressão imersos em tampão de ácido cítrico 10 mM pH 6,0 por 5 minutos. Após mais 2 sessões de lavagem em água corrente destilada, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3%. Na seqüência, foi iniciada a incubação dos fragmentos com

anticorpo policlonal de coelho anti-C4d humano na diluição 1:50 (Biomedica, Wien, Austria), a 4 °C e durante 18 horas.

A detecção foi feita com a técnica de polímeros para amplificação (Novolink Max Polymer, Novocastra, Newcastle, UK) durante 30 minutos a 37° C. Três sessões de lavagem com PBS foram realizadas após a incubação com o polímero. A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB) a 37° C por 5 minutos. Contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico.

A Figura 3 mostra a detecção de C4d por imunofluorescência e por imunoperoxidase.

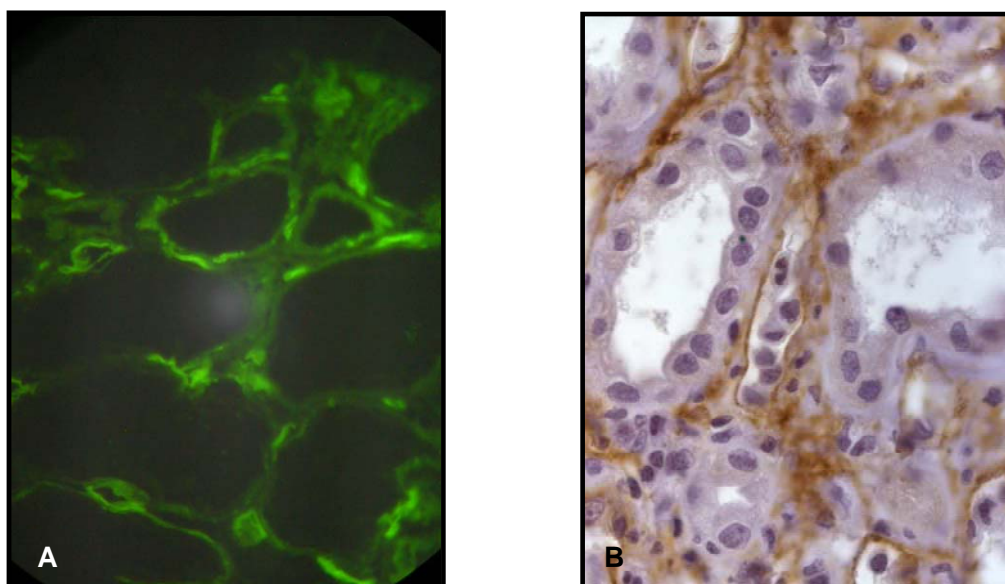


Figura 3 - Detecção de C4d em biópsia de rim transplantado pelas técnicas de imunofluorescência (A) e por imunoperoxidase (B).

3.5 Análise estatística

Associação entre variáveis qualitativas foi realizada através do teste Qui-Quadrado ou do Teste Exato de Fisher, quando as frequências esperadas foram menores que cinco. As diferenças nas médias foram avaliadas através de análise de variância (ANOVA) ou teste de Kruskal-Wallis nos casos em que a suposição de normalidade dos dados não foi satisfeita.

As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan-Meier e a comparação entre essas curvas foi realizada através do teste *log-rank*. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa SPSS para *Windows*, versão 16 (SPSS Inc, Chicago, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Pacientes incluídos

No período de junho de 2005 a julho de 2006, foram realizados 139 transplantes na Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da FMUSP. Dezesesseis pacientes preencheram algum critério de exclusão, a saber: 8 receberam transplantes-duplos (5, rim-pâncreas; 2, rim-fígado e 1 recebeu transplante de rim após transplante de coração), 4 estavam recebendo droga em fase de investigação, 2 eram menores de 12 anos e 2 apresentavam dificuldade de acesso vascular para coletas freqüentes de sangue. Dez pacientes se recusaram a participar do estudo. Outras causas de exclusão foram a ocorrência de 1 óbito e de 1 caso de trombose vascular que ocorreram em menos de 24 horas após o transplante. Como mostra a Figura 4, foram incluídos 111 pacientes no estudo.

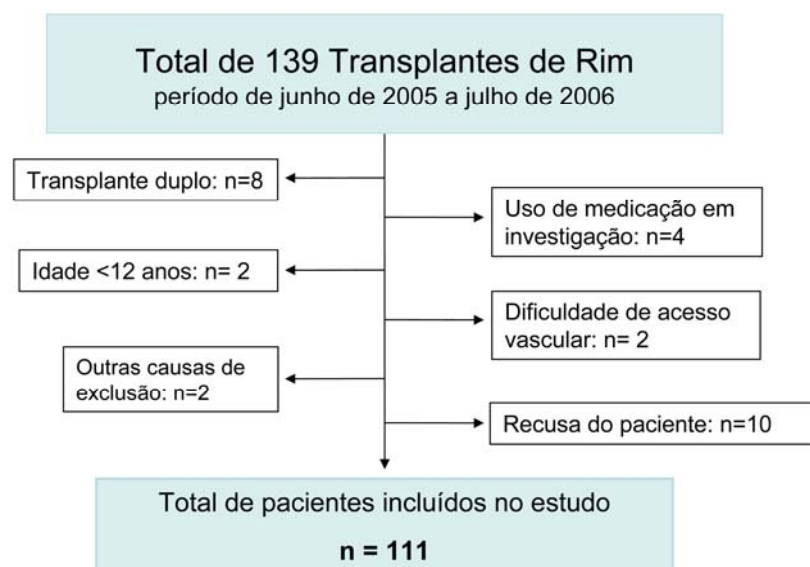


Figura 4 - Pacientes incluídos no estudo.

Foram estudados 57 pacientes do gênero masculino e 54 do gênero feminino, com idade média de $43,6 \pm 13,0$ anos. Quarenta pacientes (36%) receberam rins de doadores falecidos e 71 (64%) receberam de doadores vivos, sendo 50 de doadores vivos parentes e 21 de doadores vivos não-parentes. Em 96 pacientes (86,5%) foi o primeiro transplante; em 15, o segundo (13,5%).

Todos os pacientes apresentavam prova-cruzada contra linfócitos T e B por CDC negativa na véspera do transplante e receberam alguma terapia de indução: 92 (83%) receberam indução com anticorpo anti-receptor de interleucina-2 (Ac anti-IL-2R) e 19 (17%), com anticorpos anti-linfocitários (Timoglobulina). Entre os 19 pacientes que receberam Timoglobulina, em 17 a indicação foi pelo maior risco imunológico (5 por prova-cruzada histórica positiva, 5 por PRA>50% e 7 por se tratar de re-transplante) e em 2, pelo tempo de isquemia maior que 24 horas.

Quatro pacientes, além de receberem indução com Timoglobulina, receberam também IVIg no momento do transplante, sendo que 3 deles haviam participado de um protocolo de dessensibilização anti-HLA no pré-transplante com essa medicação, pois apresentavam prova-cruzada com soro histórico positiva contra os doadores; o outro paciente recebeu essa medicação somente no momento do transplante, e a indicação foi pelo antecedente de rejeição aguda mediada por anticorpos.

A imunossupressão de manutenção foi baseada em esquema tríplice: todos os pacientes receberam Prednisona, inibidor de calcineurina (Tacrolimo ou Ciclosporina) e Micofenolato (mofetil ou sódico) ou Rapamicina. Nenhum paciente recebeu Azatioprina.

4.2 Reatividade contra painel no pré-transplante renal

Conforme o PRA-ELISA pré-transplante, os pacientes foram classificados como sem anticorpos anti-HLA (PRA negativo) ou com anticorpos anti-HLA (PRA positivo).

Oitenta e oito pacientes (79,3%) apresentavam PRA classe I e classe II negativos e 23 pacientes (20,7%) apresentavam PRA classe I e/ou classe II positivos no pré-transplante. Dentre estes, 7 (6,3%) apresentavam somente anticorpos anti-HLA classe I (PRA entre 7% e 90%), 7 (6,3%) apresentavam somente anticorpos anti-HLA classe II (PRA entre 16% e 92%) e 9 (8,1%) apresentavam anticorpos anti-HLA classe I e classe II (7 deles com PRA>50%).

4.3 Monitorização dos anticorpos anti-HLA pós-transplante

Foram avaliados 926 soros coletados de 111 pacientes (média de 8,4 soros/paciente) para pesquisa de reatividade contra painel pela técnica de PRA-ELISA no decorrer do estudo.

Em 80 de 111 (72%) pacientes a pesquisa de anticorpos anti-HLA por PRA-ELISA persistiu negativa durante o primeiro ano pós-transplante. Porém, em 31 de 111 pacientes (28%) a pesquisa para anticorpos anti-HLA pós-transplante foi positiva. Em 8 pacientes (7,2%), o anticorpo detectado foi de Classe I; em 8 (7,2%), classe II; e em 15 (13,5%), classe I e classe II.

Após a análise dos testes e considerando a oscilação das Categorias de PRA, os pacientes foram alocados em 5 grupos, a saber:

Grupo A: pacientes com PRA negativo no pré e no pós-transplante (n=80).

Grupo B: pacientes com PRA negativo no pré-transplante e que desenvolveram anticorpos anti-HLA *de novo* no decorrer do estudo (n=8). Nesse grupo, o PRA classe I variou de 14% a 85%; o PRA classe II variou de 38% a 100%.

Grupo C: pacientes com PRA positivo no pré-transplante e que se mantiveram na mesma Categoria de variação do PRA durante todo o estudo (n=5). Nesse grupo, a variação do PRA classe I foi de 0% a 10%; do PRA classe II, 0% a 9%.

Grupo D: pacientes com PRA positivo no pré-transplante e que ascenderam para outra Categoria de PRA no decorrer do estudo (n=4). A elevação do PRA classe I variou de 40% a 75%; do PRA classe II, de 58% a 67%.

Grupo E: pacientes com PRA positivo no pré-transplante e que descenderam para outra Categoria de PRA no decorrer do estudo (n=14). A diminuição do PRA classe I variou de 15% a 67%; do PRA classe II, de 16% a 76%.

Na Figura 5 pode-se observar a distribuição dos pacientes em Grupos conforme a monitorização do PRA pós-transplante.

PRA pré-transplante	PRA pós-transplante			
	Grupo	Evolução	Variação do PRA	
			Classe I	Classe II
Sem anticorpos n=88	A	Sem anticorpos	0%	0%
	B	Acs de novo	14-85%	38-100%
Com anticorpos n=23	C	↔	0-10%	0-9%
	D	↑	40-75%	58-67%
	E	↓	15-67%	16-76%

Acs: Anticorpos anti-HLA; PRA: Reatividade contra painel
 Acs *de novo*: anticorpos anti-HLA *de novo*
 ↔ : manteve; ↑: aumentou; ↓: diminuiu

Figura 5 - Distribuição dos pacientes em grupos conforme a evolução do PRA pós-transplante.

4.4 Dados demográficos e características clínicas dos pacientes conforme os Grupos

Os dados clínicos dos 111 pacientes alocados em seus respectivos Grupos estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Dados demográficos e características clínicas dos 111 pacientes segundo os grupos

	Grupo A		Grupo B		Grupo C		Grupo D		Grupo E		<i>p</i>
n (%)	80	72%	8	7,2%	5	4,5%	4	3,6%	14	12,6%	
Idade	43,3±14,3		46,9±5,4		40,4±5,4		51,0±11,0		42,5±9,9		0,342
Gênero											
Feminino	36	45%	3	37,5%	4	80,0%	3	75,0%	8	57,1%	0,344
Tipo de Doador											
Falecido	25	31,3%	5	62,5%	4	80,0%	1	25,0%	5	35,7%	0,106
Primeiro TX	73	91,3%	7	87,5%	3	60,0%	3	75,0%	10	71,4%	0,102
Gestação Prévia											
Sim (pelo menos 1)	25	70%	3	100%	4	100%	3	100%	7	87,5%	0,315
Transfusão Prévia											
Sim (pelo menos 1)	48	60%	5	62,5%	5	100%	3	75%	12	87,5%	0,169
Nº incomp. HLA-A e -B											
0	2		0		0		0		0		
1-2	44		7		5		2		9		0,329
3-4	34		1		0		2		5		
Nº incomp. HLA-DR											
0	28		4		2		1		6		
1	36		3		2		1		6		0,925
2	16		1		1		2		2		
Indução											
Ac anti-IL-2R	75	94%	8	100%	2	40,0%	2	50%	5	37,5%	
Ac anti-linfocitário	5		0		3		2		9		<0,001
Manutenção											
Tac+micofenolato	72	92,3%	7	87,5%	5	100%	3	75%	14	100%	0,453

Ac: anticorpo; Ac anti-IL-2R: anticorpo anti-receptor da interleucina 2; Tac: tacrolimo; TX: transplante;
 Nº incomp. HLA-A e -B: número de incompatibilidades HLA-A e HLA-B;
 Nº incomp. HLA-DR: número de incompatibilidades HLA-DR

Os pacientes dos Grupos A, B, C, D e E foram semelhantes com relação à idade, gênero, tipo de doador, número de transplantes, antecedente de gestações e transfusões, número de incompatibilidades HLA-A, HLA-B e HLA-DR, e na terapia imunossupressora de manutenção ($p=NS$). A indução com Timoglobulina foi mais utilizada nos pacientes dos grupos C, D e E que nos pacientes dos grupos A e B ($p<0,001$).

Embora exista maior proporção de doadores falecidos nos grupos B e C, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Com relação à imunossupressão de manutenção, 101 pacientes receberam Tacrolimo e Micofenolato e 8 receberam Ciclosporina e Rapamicina ($p=0,453$). Vale ressaltar que, um paciente recebeu Tacrolimo e Rapamicina e o outro recebeu Ciclosporina e Micofenolato.

Os 4 pacientes que receberam IVIg antes do transplante receberam indução com Timoglobulina e terapia de manutenção com Tacrolimo e Micofenolato. Dois pacientes pertencem ao grupo C e 2, ao grupo D.

4.5 Histologia

Foram realizadas 67 biópsias de enxerto renal em 51 pacientes que cursaram com disfunção do enxerto ao longo do primeiro ano pós-transplante (1,31 biópsias/paciente). Os resultados dessas biópsias estão representados na Figura 6.

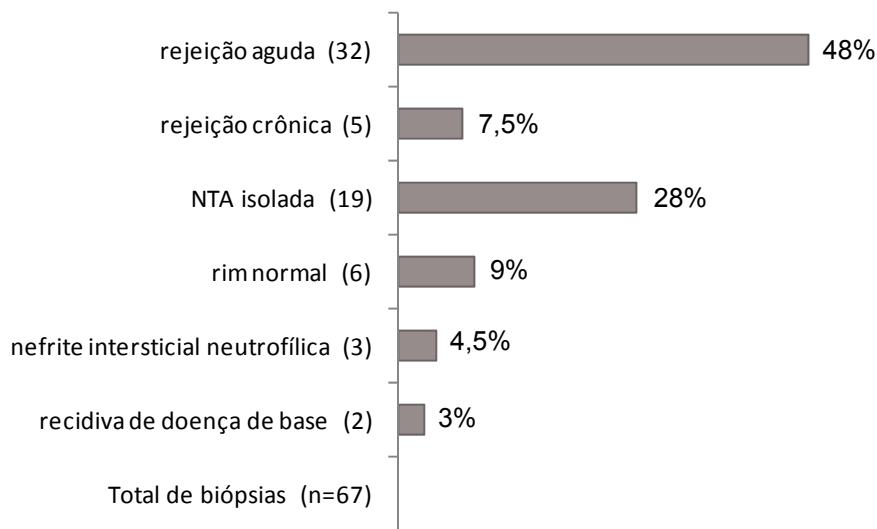
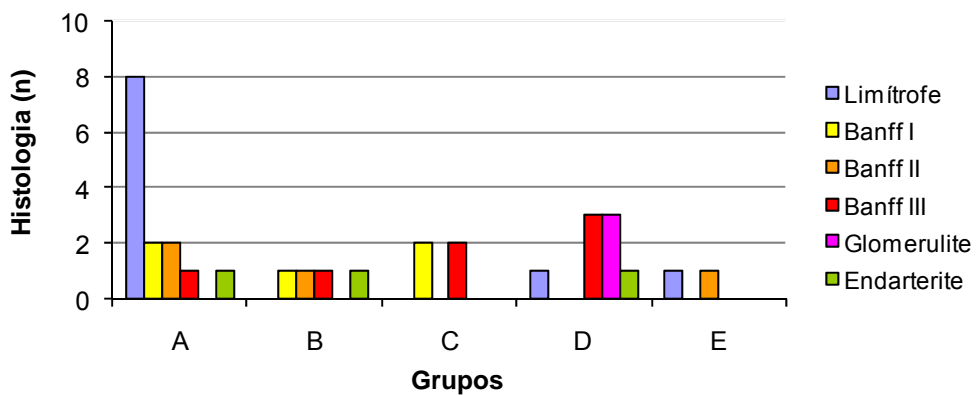


Figura 6 - Diagnóstico histológico das biópsias realizadas.

Os principais diagnósticos histológicos foram de rejeição aguda (48%) e ocorreram em 32 biópsias realizadas em 26 pacientes. A Figura 7 traz a representação gráfica das lesões histológicas de rejeição aguda entre os nos diferentes Grupos. Lesões classificadas como Banff limítrofe e Banff I ocorreram mais freqüentemente no Grupo A, enquanto que lesões Banff II, Banff III e glomerulite foram mais comuns nos Grupos B, C, D e E ($p=0,031$).



$p=0,031$ (A vs BCDE)

Figura 7 - Achados histológicos de rejeição aguda conforme os Grupos.

Rejeição crônica foi diagnosticada em 5 biópsias realizadas em 4 pacientes, sendo 3 do Grupo A e 1 do Grupo B. Esses casos foram excluídos da análise.

Necrose tubular aguda (NTA) isolada foi diagnosticada em 19 biópsias realizadas em 17 pacientes. Em 10 deles, essa foi a única biópsia realizada no decorrer do estudo. Em 7 pacientes, o diagnóstico histológico de NTA ocorreu antes (4 pacientes) ou após (3 pacientes) o diagnóstico histológico de rejeição aguda.

Rim histologicamente normal foi o diagnóstico em 6 biópsias realizadas em 6 pacientes. Em 2 pacientes a biópsia realizada diagnosticou recidiva da doença de base, no caso, recidiva de glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF). Nefrite intersticial neutrofílica (NIN) foi o diagnóstico em 3 biópsias de 2 pacientes.

4.6 Estudo imunopatológico

A pesquisa de C4d foi realizada em 65 das 67 biópsias obtidas durante o estudo. Em 62 de 65 biópsias (95%) a técnica empregada para sua detecção foi a imunofluorescência; em 3 de 65 biópsias (5%), foi a imunoperoxidase.

Nas biópsias com histologia de rim normal, de recidiva da doença de base e de NIN, a pesquisa para C4d foi negativa. Em 1 paciente com rejeição crônica e em 1 com NTA, a pesquisa para C4d foi positiva, respectivamente, difusa e focalmente.

A pesquisa de C4d foi realizada em 30 das 32 biópsias com rejeição aguda. Em 2 de 32 casos (6%), a análise do C4d não foi possível devido a problemas técnicos.

A pesquisa para C4d foi negativa em 53% (16/30) dos casos analisados. Em 30% (9/30) das biópsias o C4d foi positivo, tendo deposição focal em 4 e difusa em 5. Em 17% das biópsias, detectamos rim necrótico (5/30). Marcação positiva para C4d e rim necrótico foram analisados em conjunto, quando os dados clínicos e imunológicos indicavam componente humoral.

Foi detectado C4d positivo difuso em 2 biópsias com lesões limítrofes e em 1 biópsia com Banff I. A positividade do C4d foi mais comum nas lesões Banff II, Banff III e nas com glomerulite ($p < 0,001$) do que nas lesões histologicamente menos graves. A associação entre achados histológicos de rejeição aguda e marcação por C4d pode ser visualizada na Tabela 3.

Tabela 3 - Marcação pelo C4d nas biópsias com rejeição aguda

Histologia	C4d negativo (n)	C4d positivo (n)	Total (n)
Limítrofe ^a	8	2	10
Banff I ^a	4	1	5
Banff II ^b	2	2	4
Banff III ^b	0	7	7
Glomerulite isolada ^b	0	2	2
Endarterite isolada	2	0	2
Total	16	14	30

a vs. b: $p < 0,001$

4.7 Estudo imunológico nos Grupos

- Grupo A (n=80)

No Grupo A, as pesquisas para anticorpos anti-HLA, por PRA-ELISA e por CF, foram negativas em 13 dos 14 pacientes (93%) com rejeição aguda comprovada por biópsia. Um dos 14 pacientes (7%) cursou com rejeição aguda Banff III, marcação positiva para C4d e evoluiu com perda do enxerto. Nesse caso, não detectamos anticorpos anti-HLA no teste de PRA-ELISA; no entanto, as provas-cruzadas por CF e por *Single Antigen*® foram positivas, e consideramos que essa rejeição foi mediada por anticorpos.

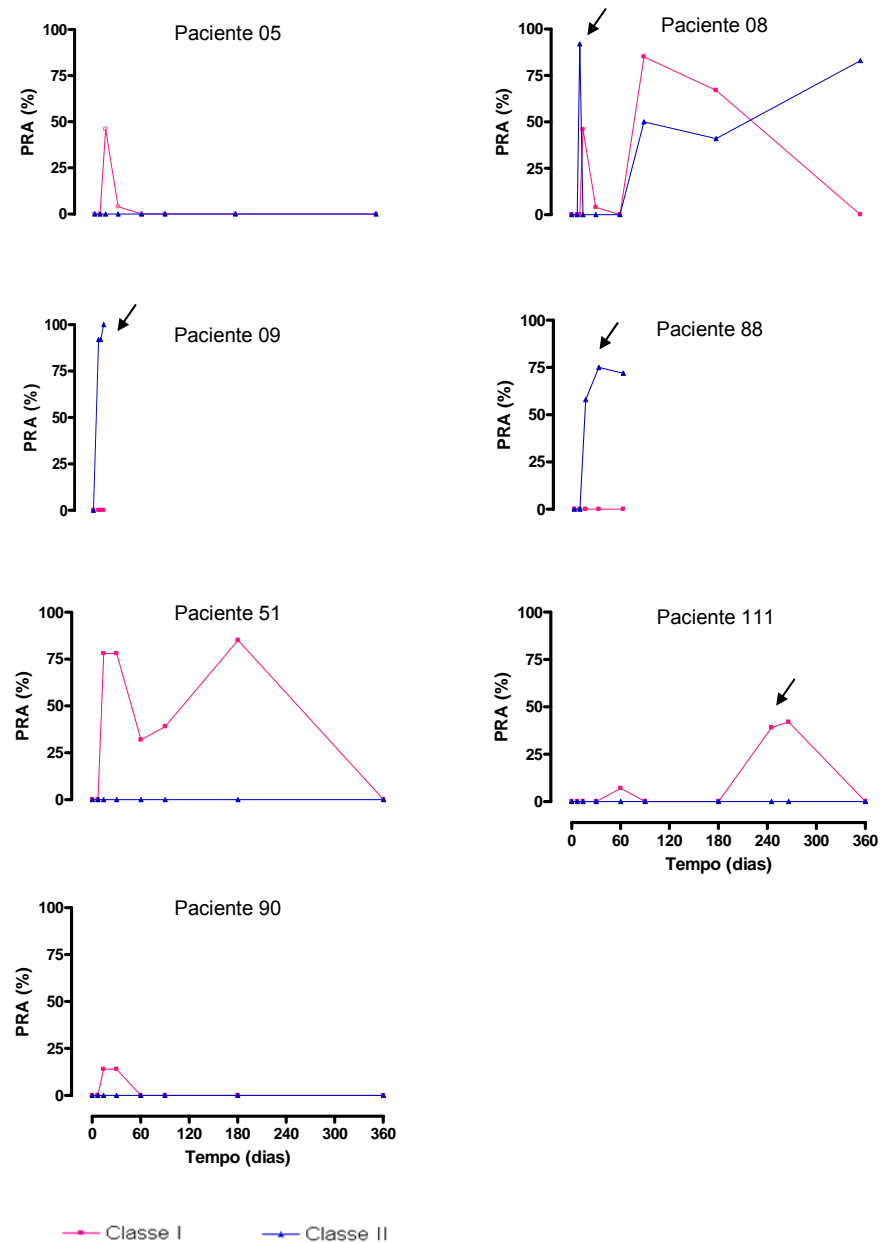
- Grupo B (n=8)

Um paciente deste Grupo foi excluído da análise devido ao diagnóstico histológico de rejeição crônica.

Em 7 pacientes os anticorpos foram detectados entre 7 e 90 dias pós-transplante, mediana de 14 dias. Foram de classe I em 4; de classe II, em 2; e de classe I e classe II em 1 paciente. Quatro pacientes cursaram com rejeição aguda (57%); em 2 deles (50%) os anticorpos foram doador-específicos; em 1 caso, não doador-específico; e 1 caso, não foi possível determinar sua especificidade.

Vale ressaltar que pacientes com anticorpos anti-HLA *de novo* tiveram 3,17 vezes mais rejeição aguda que pacientes que permaneceram sem anticorpos (respectivamente, 18% vs 57%; p=0,035).

A relação temporal entre o aparecimento dos anticorpos anti-HLA classe I e classe II *de novo* e o episódio de rejeição aguda, nos pacientes do Grupo B, está ilustrada na Figura 8.



As setas indicam o momento da rejeição aguda

Figura 8 - Dinâmica do aparecimento dos anticorpos anti-HLA de novo após o transplante renal no Grupo B.

- Grupos C, D e E (n=23)

Todos os 23 pacientes dos Grupos C, D e E apresentaram anticorpos anti-HLA não doador-específicos no pós-transplante. Anticorpos anti-HLA doador-específicos foram detectados em 2 pacientes do Grupo C (40%); em 4, do Grupo D (100%); e em 1, do Grupo E (7,1%).

A dinâmica dos anticorpos anti-HLA nos pacientes dos Grupos C, D e E está demonstrada na Figura 9.

Achado interessante foi que em 4 de 14 pacientes do Grupo E a porcentagem de PRA foi diminuindo gradativamente até a completa negatificação.

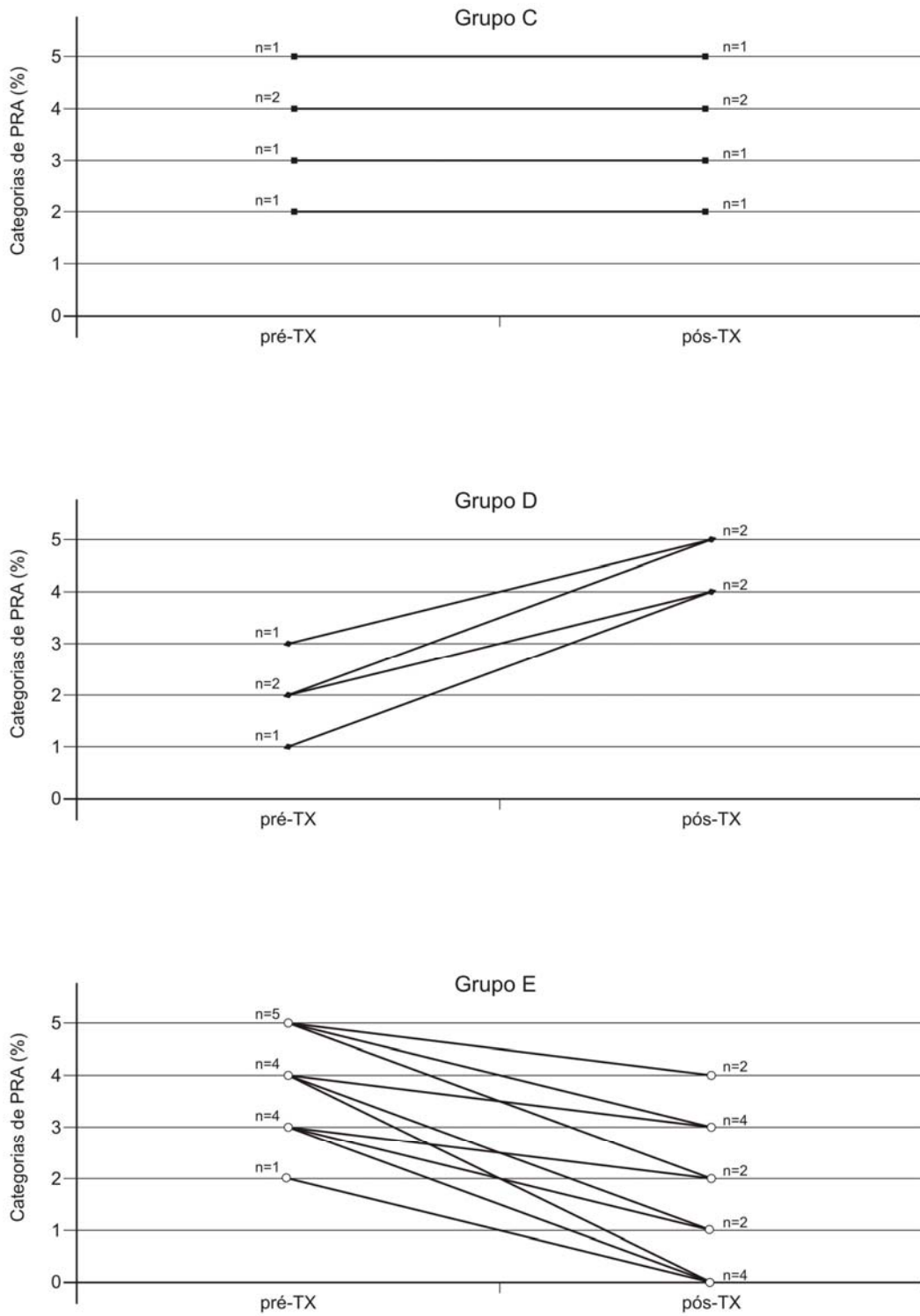


Figura 9 - Dinâmica dos anticorpos anti-HLA após o transplante renal nos Grupos C, D e E.

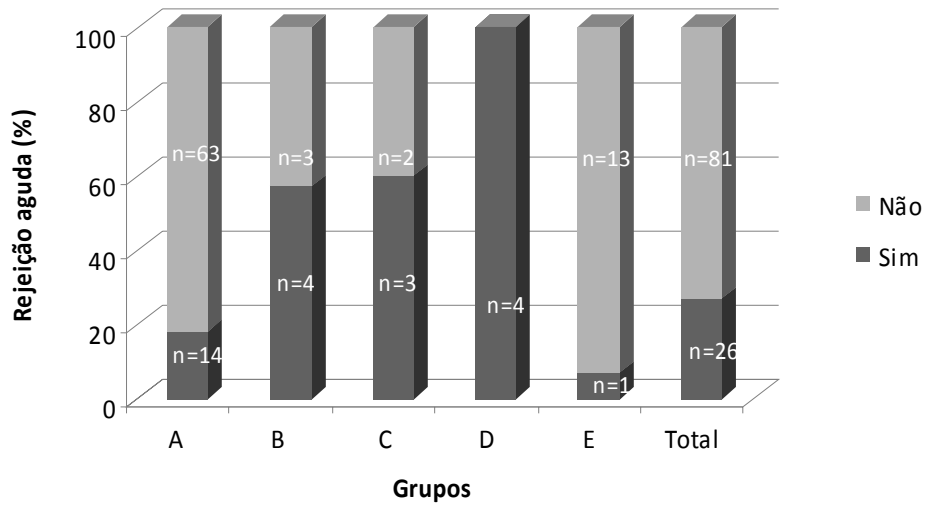
Nos 4 pacientes que receberam IVIg no pré-transplante, não detectamos o reaparecimento de anticorpos anti-HLA doador-específicos no pós-transplante. Esses pacientes não cursaram com rejeição aguda no pós-transplante.

4.8 Associação entre anticorpos anti-HLA, rejeição aguda e marcação por C4d

A incidência de rejeição entre os pacientes desta casuística foi de 27% (30 de 111 pacientes). Em 26 de 111 pacientes (23,4%) com disfunção do enxerto, a biópsia apresentou lesão histológica de rejeição aguda; em 4 de 111 (4%), a lesão histológica foi de rejeição crônica. Todos os pacientes com rejeição crônica foram excluídos da análise.

Episódios de rejeição aguda ocorreram entre 5 e 340 dias pós-transplante, mediana de 13 dias. Em 10 pacientes, a rejeição ocorreu nos primeiros 7 dias após o transplante; em 7, entre 8 e 30 dias; em 5, entre 30 e 180 dias; e em 3, entre 240 e 360 dias.

A incidência de rejeição aguda foi maior nos pacientes dos Grupos B, C e D (respectivamente, 57%, 60% e 100%) do que nos pacientes dos Grupos A e E (respectivamente 18% e 7%), $p < 0,001$. A Figura 10 demonstra a incidência de rejeição aguda nos diferentes Grupos.



AE vs BCD: $p < 0,001$

Figura 10 - Incidência de rejeição aguda entre os Grupos.

Em todos os 26 pacientes que, além de disfunção do enxerto, apresentaram histologia compatível com rejeição aguda, foi realizada a pesquisa de anticorpos anti-HLA doador-específicos e a marcação pelo C4d. Naqueles casos em que não existiam células estocadas do doador (4 pacientes no grupo A; 1, no B; 1, no C), a pesquisa de anticorpos anti-HLA doador-específicos foi realizada por *Single Antigen®*. Um dos 26 pacientes com rejeição aguda, pertencente ao Grupo B, foi excluído da análise devido à impossibilidade de classificar a rejeição aguda como sendo ou não mediada por anticorpos.

Foram detectados anticorpos anti-HLA doador-específicos em 10 de 111 pacientes (9%), o que corresponde a 40% dos pacientes com rejeição aguda (10 de 25 pacientes), sendo 2 deles do Grupo B (30%), 2 do Grupo C (40%), 4 do Grupo D (100%) e 1 do Grupo E (7,1%) quando comparado com sua detecção em apenas 1 paciente do Grupo A (1,3%), $p < 0,001$.

Em 14 de 25 pacientes (56%), tanto a pesquisa para C4d quanto a pesquisa de anticorpos anti-HLA doador-específicos foram negativas. Esses casos foram diagnosticados como rejeição aguda mediada por células e ocorreram em 13 pacientes do Grupo A e em 1 paciente do grupo C, conforme mostrado na Tabela 4.

Em 11 de 25 pacientes (44%), a pesquisa para C4d foi positiva ou o material apresentava-se necrótico, e a pesquisa de anticorpos anti-HLA doador-específicos foi positiva em 10 deles (91%) e em um caso os anticorpos detectados foram não doador-específico. Esses casos foram diagnosticados como rejeição aguda mediada por anticorpos, conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Características dos pacientes com rejeição aguda mediada por células e mediada por anticorpos

Rejeição Aguda	Paciente	Idade	Gênero	PO da rejeição	Ac específico	Histologia	C4d	Grupo
Mediada por células	2	44	M	140	neg	Limítrofe	neg	A
	3	50	F	6	neg	Banff I	neg	A
	18	26	F	16	neg	endarterite	neg	A
	19	17	F	10	neg	Limítrofe	neg	A
	29	51	F	260	neg	Banff I	neg	A
	30	53	F	20	neg	Limítrofe	neg	A
	56	48	M	37	neg	Limítrofe	neg	A
	59	21	M	6	neg	Banff II	neg	A
	63	54	M	10	neg	Limítrofe	neg	A
	68	26	F	340	neg	Banff II	neg	A
	74	47	M	28	neg	Limítrofe	neg	A
	76	48	M	7	neg	Limítrofe	neg	A
	107	57	M	6	neg	Limítrofe	neg	A
	109	48	F	142	neg	Banff I	neg	C
Mediada por anticorpos	4	56	F	148	pos	Glomerulite	difuso	D
	8	51	F	98	pos	Banff I	difuso	B
	9	43	F	6	pos	Banff III	necrótico	B
	36	60	F	6	pos	Limítrofe	difuso	D
	61	35	M	20	pos	Banff III	necrótico	D
	66	33	M	13	pos	Banff III	necrótico	C
	89	39	M	6	pos	Banff II	focal	E
	99	42	F	5	pos	Banff III	necrótico	C
	100	53	F	6	pos	Banff III	necrótico	D
	105	66	M	5	pos	Banff III	focal	A
	111	52	M	248	neg	Banff II	focal	B

Acs: anticorpos; PO: pós-operatório; Ac específico: anticorpo doador-específico; M: masculino; F: feminino

O tempo transcorrido entre o transplante e o diagnóstico de rejeição foi semelhante entre os pacientes com rejeição aguda mediada por células (7 a 141 dias, mediana de 18 dias) e por anticorpos (6 a 98 dias, mediana de 6 dias), $p=0,202$.

A incidência de rejeição aguda mediada por anticorpos foi de 10% (11/111) nesta casuística e ocorreu mais freqüentemente entre os pacientes dos Grupos B, C, D e E do que entre os pacientes do Grupo A, $p<0,001$, conforme ilustrado na Figura 11.

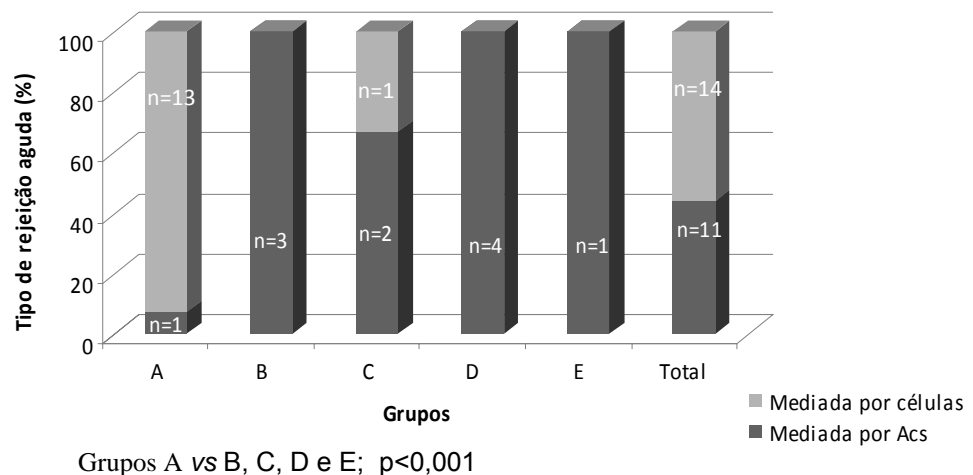


Figura 11 - Tipos de rejeição aguda entre os Grupos.

Entre os 10 pacientes com anticorpos anti-HLA doador-específicos, em 3 deles as provas-cruzadas foram realizadas por CF, pois os pacientes haviam recebido indução com Timoglobulina; em 1, foi por CDC. Nos outros 6 pacientes, foram realizadas provas-cruzadas por CDC e por CF: em 3, os resultados de CDC e CF foram positivos e em outros 3, o CDC foi negativo, porém a CF foi positiva. Na Tabela 4 encontram-se as características dos pacientes com rejeição aguda mediada por células e por anticorpos, e na Tabela 5 pode-se visualizar as características imunológicas dos pacientes com rejeição aguda mediada por anticorpos.

A marcação positiva/necrótica para C4d nesta casuística mostrou sensibilidade de 100% e especificidade de 93%, considerando-se a presença de anticorpos anti-HLA doador-específico como padrão-ouro para o diagnóstico de rejeição aguda mediada por anticorpos.

Tabela 5 - Características imunológicas dos pacientes com rejeição aguda mediada por anticorpos

Paciente	PRA-ELISA (%)		Prova-Cruzada		Incompatibilidades HLA	Especificidade dos Acs (<i>Single Antigen</i> ®)
	pré-TX	rejeição	CDC	CF		
	Classe I / II	Classe I / II	T / B	T / B		
4	25 / 0	75 / 67	pos / pos	pos / pos	B58	B58
8	0 / 0	85 / 50	pos / pos	pos / pos	A23 , B78; DR9; DR16	A23; A31; DR16
10	0 / 0	0 / 100	pos / pos	NR	A31 ; B60	A31
36	7 / 0	82 / 17	pos / pos	pos / pos	B61; DR4	DR4
61*	42 / 100	82 / 100	NR	pos / pos	A1,A68; B7 ;B57; DR13 ; DR14	B7; DR13; DR14
66*	78 / 0	90 / 100	NR	pos / pos	A1; A66 ; B73; DR1 ;DR15	A66; B37; DR1
89	0 / 67	0 / 42	neg / pos	neg / pos	DR11 ; DR14	DR11; DR14
99*	80 / 90	90 / 100	NR	pos / pos	A2 ; DR4	A2
100	0 / 16	10 / 58	pos / pos	pos / pos	A32; B8; B44; DR7; DR15	B8; B44; DR7; DR15
104	0 / 0	0 / 0	neg / neg	pos / pos	A26; B38; DR4	DR4

PRA-ELISA: reatividade contra painel por ELISA; CDC: Citotoxicidade Dependente de Complemento; CF: Citometria de Fluxo; T: linfócitos T; B: linfócitos B; TX: transplante; Single Antigen: teste com microesferas marcadas com antígenos HLA do doador; pos: positivo; neg: negativo; NR: não realizado; Acs: anticorpos; (*): pacientes que receberam indução com Timoglobulina.

4.9 Evolução clínica

4.9.1 Tratamento e reversibilidade das rejeições agudas

Todas as rejeições agudas mediadas por células foram tratadas com pulsos de Metilprednisolona. Três pacientes receberam também tratamento com Timoglobulina. Uma paciente com rejeição mediada por células evoluiu com perda do enxerto conseqüente à imunossupressão insuficiente.

Entre os pacientes com rejeição aguda mediada por anticorpos, os esquemas terapêuticos variaram conforme demonstrado na Tabela 6, mas todos os pacientes receberam tratamento com IVIg. Os pacientes submetidos à plasmaferese realizaram em média 7 sessões cada um. Quatro de 11 pacientes (36,5%) recuperaram a função renal.

Tabela 6 - Tratamento e reversibilidade das rejeições agudas mediadas por anticorpos

Paciente	PO da rejeição (dias)	Tratamento	Reversão	Creatinina de 1 ano (mg/dL)
4	148	Timo; IVIg; PF	não	...
8	98	Timo; IVIg	sim	0,73
10	6	IVIg	não	...
36	6	MP; Timo; IVIg	sim	1,15
61*	20	MP; IVIg; PF	não	...
66*	13	MP; IVIg	não	...
89	6	Timo; IVIg	sim	1,1
99*	5	IVIg	não	...
100	6	MP; Timo; IVIg; PF	não	...
104	5	Timo; IVIg	não	...
111	248	Timo; IVIg	sim	2,64

PO da rejeição: dias pós-transplante que ocorreu a rejeição; Timo: Timoglobulina; MP: metilprednisolona; PF: plasmaferese; IVIg: imunoglobulina polivalente humana; (*): pacientes que receberam indução com Timoglobulina

4.9.2 Sobrevida do paciente

No decorrer do estudo, ocorreram 11 óbitos, todos eles com enxerto funcionante (10%). As principais causas foram complicações cardiovasculares (64%) e infecciosas (36%). Os óbitos ocorreram entre 8 e 181 dias, mediana de 121 dias pós-transplante.

A sobrevida global dos pacientes foi de 89% em 1 ano. Não houve diferença na sobrevida dos pacientes entre os Grupos ($p=0,590$), a despeito de os pacientes dos Grupos C, D e E terem recebido mais freqüentemente indução com Timoglobulina.

As Figuras 12A e 12B mostram, respectivamente, a sobrevida global de todos os pacientes e a sobrevida nos diferentes Grupos.

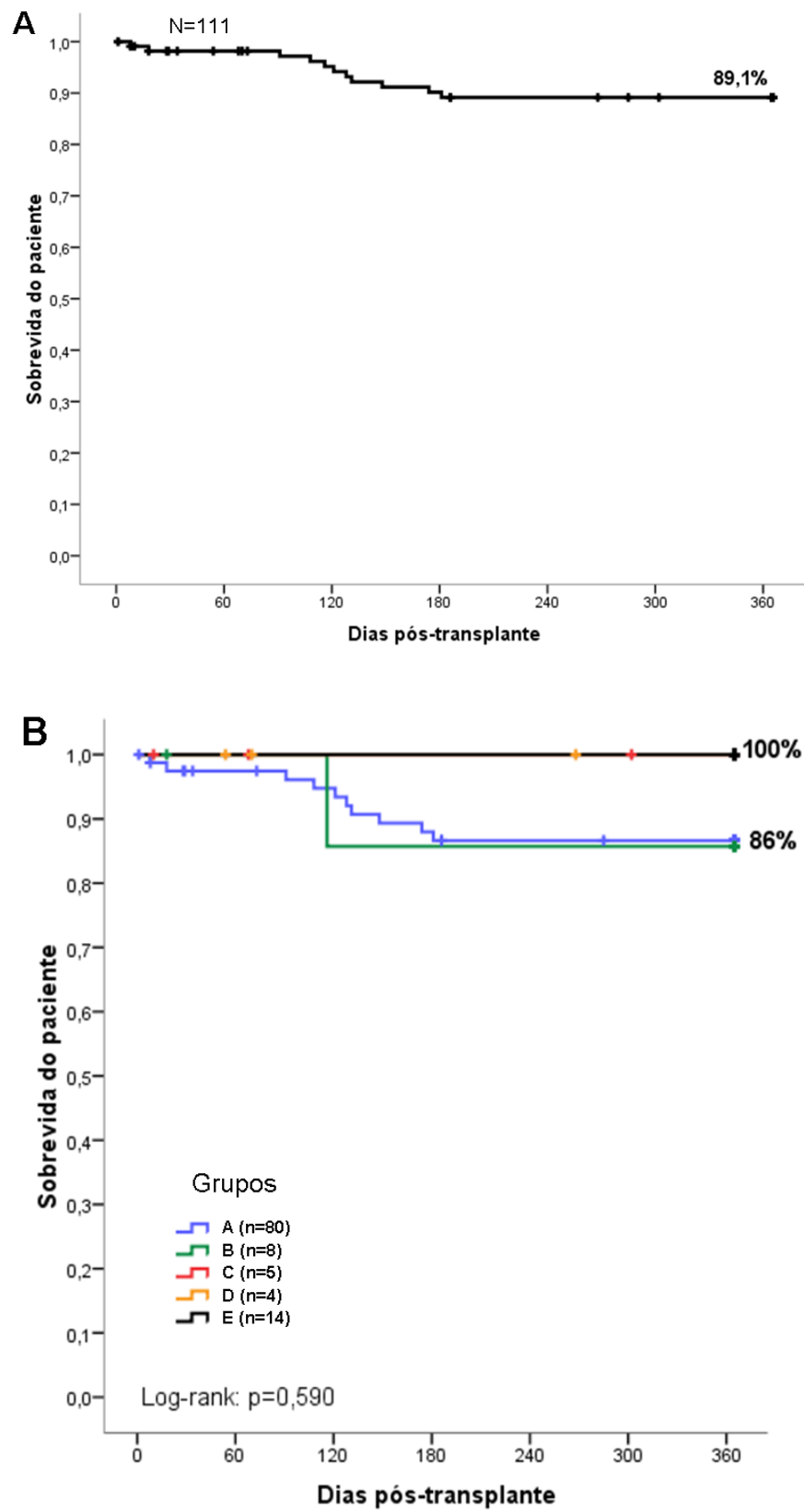


Figura 12 - Sobrevida dos pacientes Global (A) e por Grupos (B).

4.9.3 Sobrevida do enxerto

No decorrer do estudo, 10 pacientes (9%) evoluíram com perda do enxerto. Em 8 deles (80%), a causa da perda foi rejeição aguda, sendo mais freqüente entre as rejeições mediadas por anticorpos do que nas mediadas por células (respectivamente, 64% vs 7%, $p < 0,001$). Nos outros 2 casos, as perdas foram devidas à recidiva de doença de base e trombose da artéria renal.

Seis pacientes (5,4%) desistiram de participar do estudo.

A sobrevida global do enxerto em 1 ano, censurada para óbito, foi de 90,4%. A sobrevida do enxerto foi semelhante nos Grupos A, B e E, sendo significativamente maior que nos Grupos C e D ($p < 0,001$), conforme pode ser visualizado nas Figuras 13A e 13B.

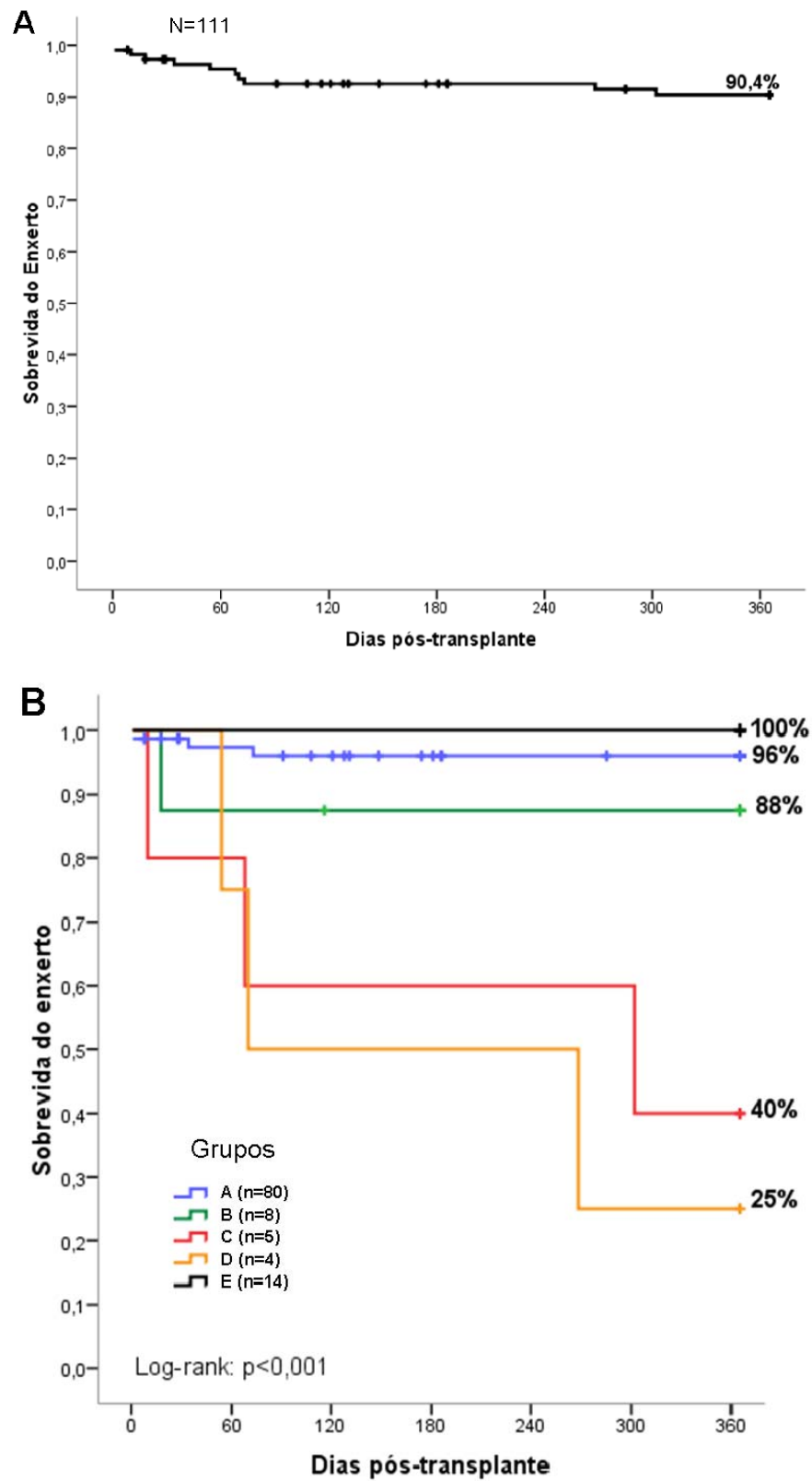


Figura 13 - Sobrevida do enxerto Global (A) e por Grupos (B).

Sobrevida do enxerto censurada para óbito foi menor em pacientes com anticorpos anti-HLA doador-específicos que naqueles sem anticorpos ou com anticorpos não doador-específicos ($p < 0,001$), conforme mostrado na Figura 14.

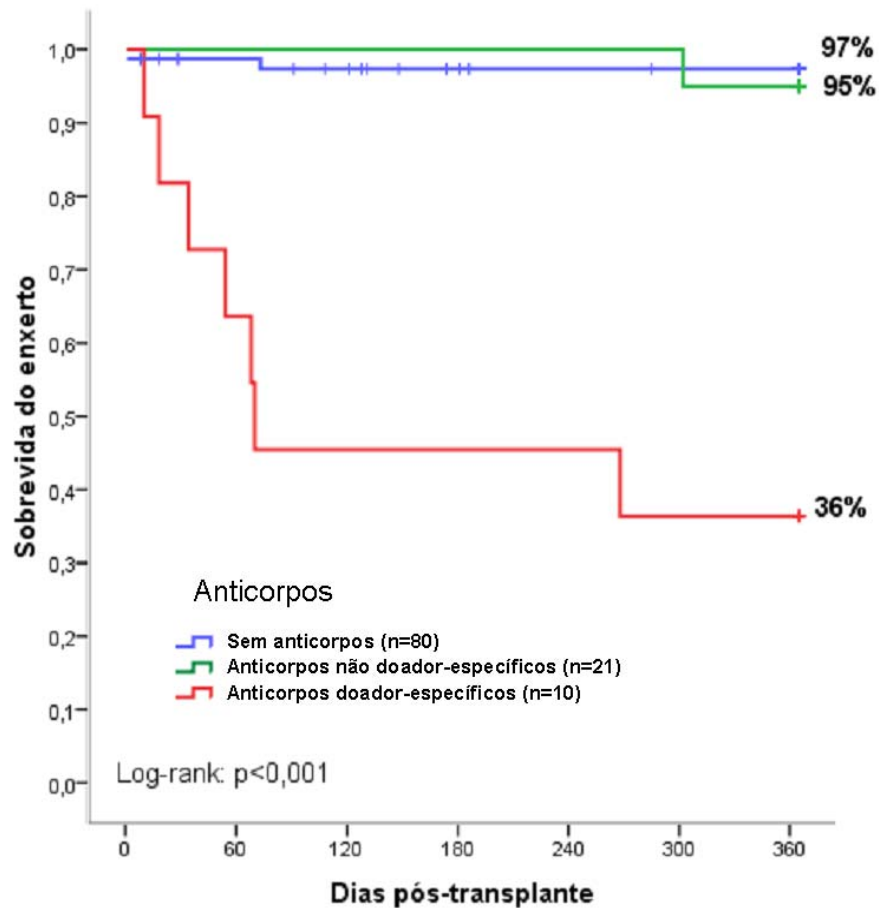


Figura 14 - Sobrevida do enxerto conforme presença ou ausência de anticorpos anti-HLA.

Pacientes com rejeição aguda evoluíram com menor sobrevida do enxerto em 1 ano, em comparação com os pacientes sem rejeição aguda (66% vs 98%, $p < 0,001$). A sobrevida do enxerto em 1 ano nos pacientes com rejeição mediada por anticorpos foi menor que a sobrevida entre os pacientes com rejeição mediada por células ($p = 0,003$; 36 vs 90%), conforme ilustrado nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

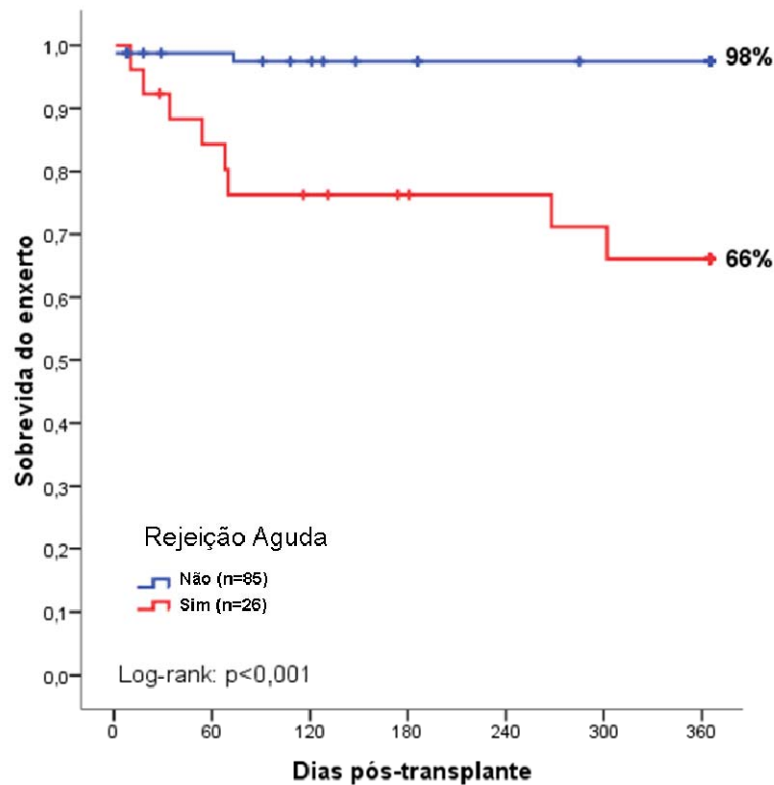


Figura 15 - Sobrevida do enxerto em 1 ano conforme ocorrência de rejeição aguda

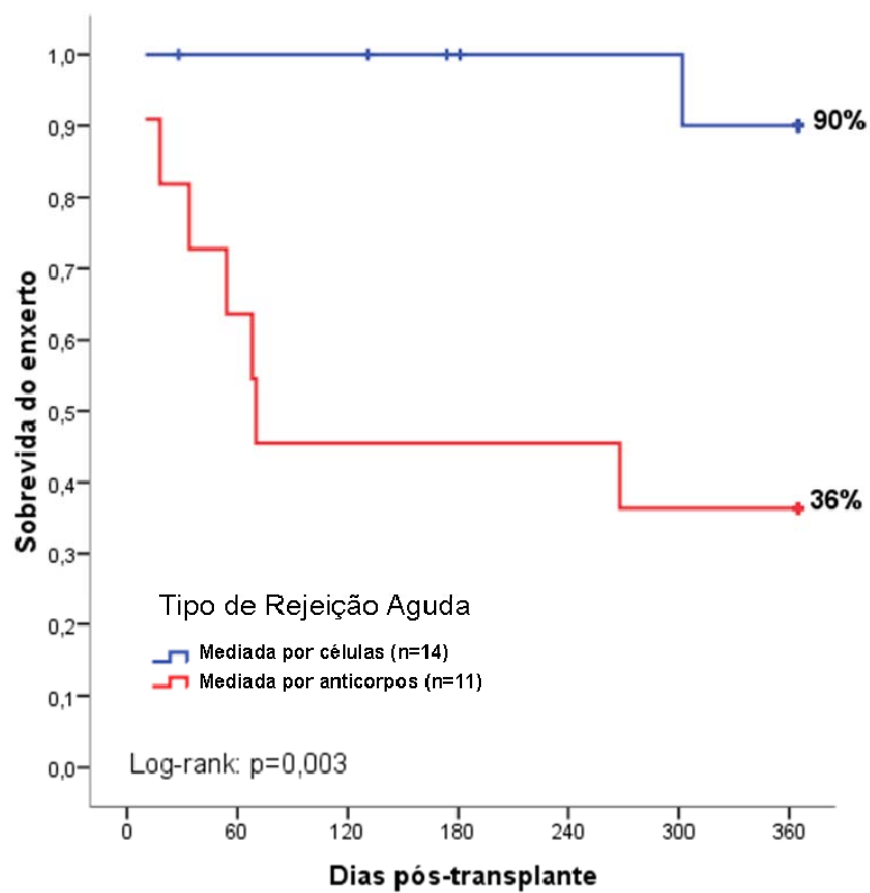


Figura 16 - Sobrevivência do enxerto em 1 ano conforme o tipo de rejeição aguda

De forma análoga, pacientes com rejeição aguda e marcação positiva para C4d em biópsias renais tiveram menor sobrevida do enxerto, quando comparado aos pacientes com rejeição e marcação negativa para C4d ($p=0,003$; 36 vs 90%), Figura 17.

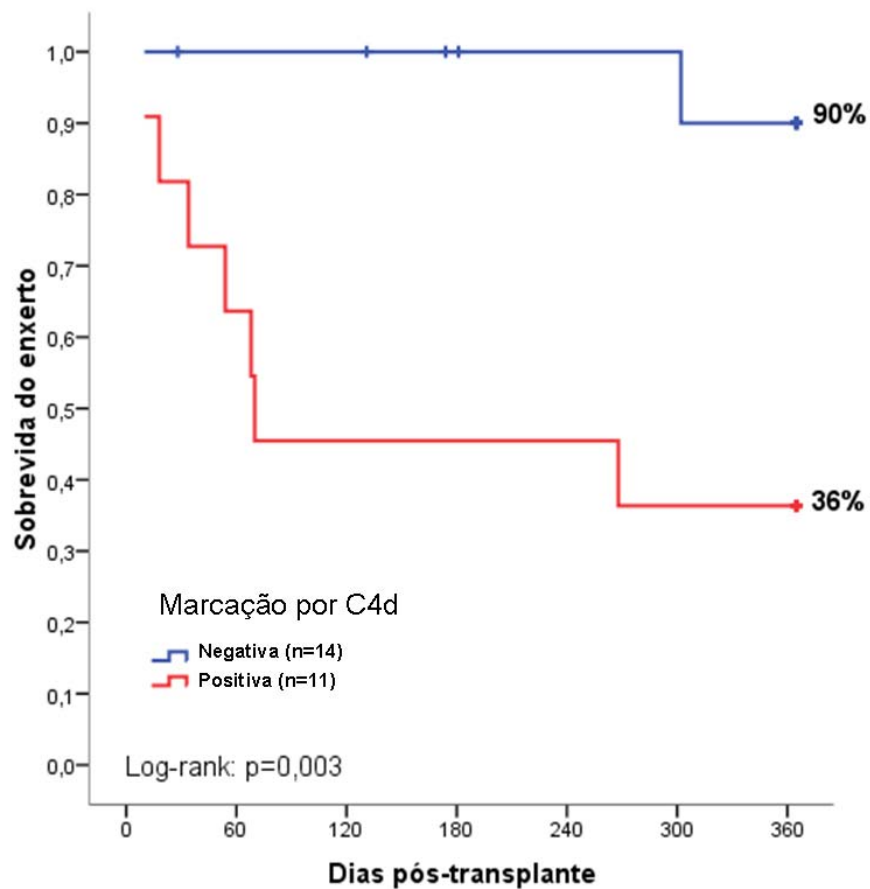


Figura 17 - Sobrevida do enxerto em 1 ano conforme marcação pelo C4d na biópsia renal

4.9.4 Função renal

Oitenta e quatro pacientes completaram 12 meses de seguimento. No fim desse período, não houve diferença estatisticamente significativa na função renal avaliada pela mediana da Creatinina sérica ($p=0,455$) e pela mediana da Depuração de Creatinina ($p=0,239$) entre os pacientes dos 5 Grupos avaliados, conforme demonstrado nas Figuras 18A e 18B.

A comparação das medianas das creatininas no momento da biópsia renal nos pacientes com rejeição aguda mediada por anticorpos e por células também não foi diferente: 6,3 mg/dL (3,7 a 9,2 mg/dL) vs 4,7 mg/dL (2,2 a 6,6 mg/dL), $p=0,183$. Outras análises utilizando o inverso da creatinina e a análise de variância com medidas repetidas também não mostraram diferenças nas dosagens de creatinina sérica e na depuração de creatinina.

Ao final de 1 ano de seguimento, não detectamos diferença nas médias das creatininas entre os pacientes com e sem rejeição aguda ($1,27\pm 0,5$ mg/dL vs $1,18\pm 0,5$ mg/dL; $p=0,532$). O mesmo pôde ser observado ao se avaliar pacientes com rejeições agudas revertidas, sejam elas mediadas por anticorpos ou por células (respectivamente, $1,08\pm 0,3$ mg/dL vs $1,35\pm 0,5$ mg/dL; $p=0,361$).

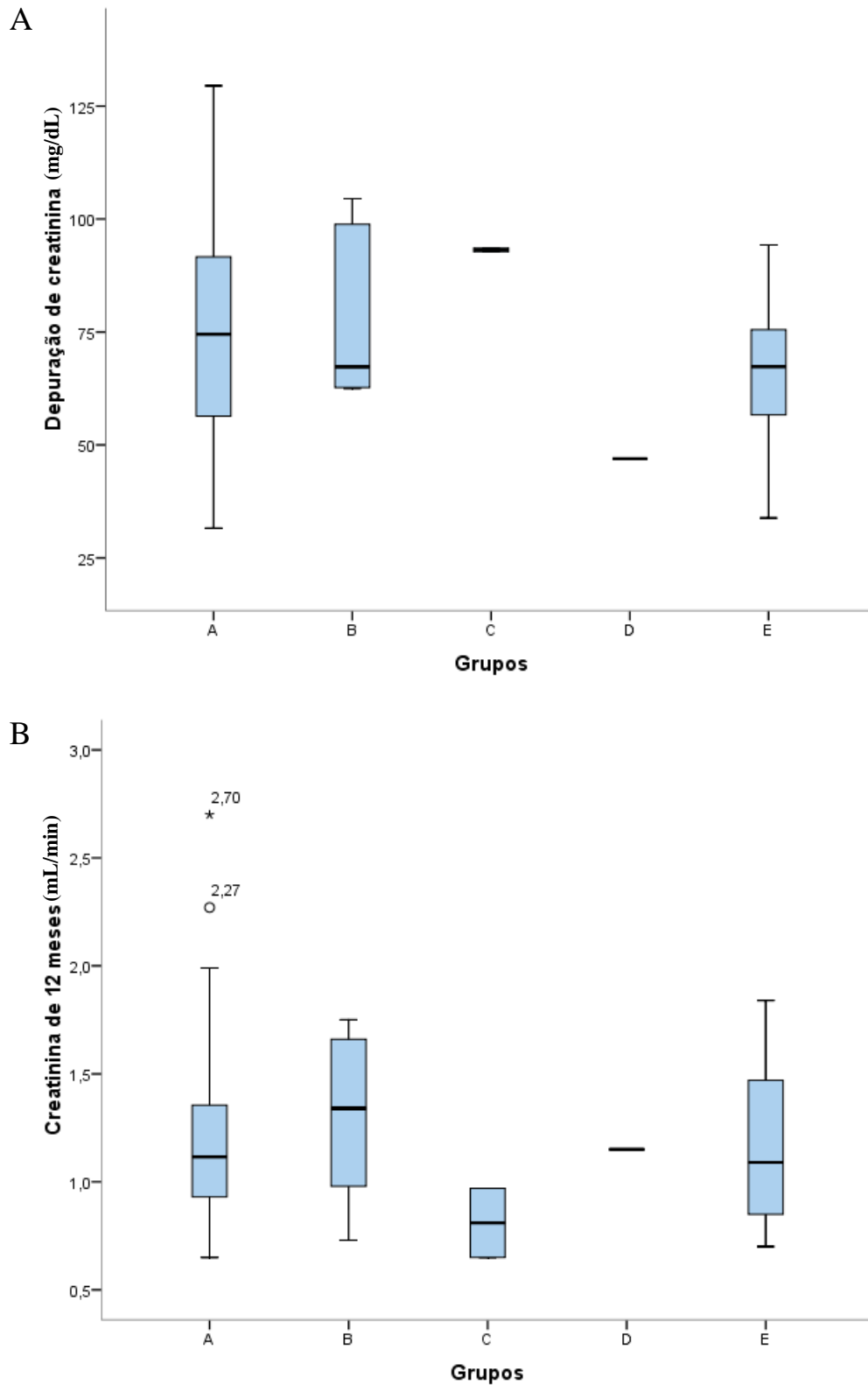


Figura 18 - Box-Plot da mediana (A) da Creatinina sérica (mg/dL) e (B) da Depuração de Creatinina (mL/min) entre os Grupos.

5. DISCUSSÃO

A rejeição de transplantes de órgãos sólidos tem sido associada à presença de anticorpos anti-HLA (40, 62). No âmbito dos transplantes renais, as rejeições mediadas por anticorpos podem ser agudas (54, 55) ou crônicas (63, 65), e sua ocorrência reflete na sobrevida do enxerto. Devido às suas implicações diagnósticas e terapêuticas, alguns autores alertam que tais anticorpos podem ser detectados no soro dos receptores de transplantes de rim antes da falência do enxerto (24, 40, 55) e, por isso, preconizam a monitorização dos anticorpos anti-HLA após o transplante renal.

No presente estudo, com a monitorização prospectiva e seriada dos anticorpos anti-HLA pós-transplante, pudemos detectar 5 Grupos de pacientes com diferentes padrões de comportamento dos anticorpos.

Grande parte dos pacientes (72%) permaneceu sem anticorpos anti-HLA detectáveis após o transplante renal. A maioria deles teve boa evolução clínica com sobrevida do enxerto de 96% ao fim do primeiro ano pós-transplante (Grupo A). Rejeições agudas ocorreram nesse subgrupo de pacientes, mas estas foram habitualmente mediadas por células e revertidas após tratamento com Metilprednisolona ou Timoglobulina.

A ausência de anticorpos anti-HLA no primeiro ano de transplante também foi indicador para a sobrevida do enxerto a longo prazo em um estudo prospectivo que avaliou 1.329 pacientes no 1º ano e após o 4º ano

de transplante (83). Pacientes sem anticorpos apresentaram sobrevida do enxerto de 96% no primeiro ano e de 81% no 4º ano pós-transplante.

Nosso estudo observou que 28% dos pacientes apresentaram anticorpos anti-HLA no pós-transplante renal. Embora possa variar amplamente (84), essa incidência foi maior que a descrita em outros estudos (57, 59, 62). As explicações para essa variabilidade de resultados incluem a sensibilidade da técnica empregada, a população estudada que pode ser composta por pacientes com rejeição aguda ou crônica e a época pós-transplante em que as amostras foram colhidas (coletas tardias, por exemplo, podem excluir pacientes com perda precoce do enxerto).

O impacto clínico dos anticorpos anti-HLA classe I na rejeição aguda e na perda do enxerto já é conhecido (49, 52). No entanto, a importância clínica dos anticorpos classe II ainda gera controvérsias, pois muitos pacientes desenvolvem simultaneamente anticorpos classe I e classe II; isso sem mencionar que até recentemente havia dificuldade na distinção entre eles, o que pôde ser solucionado com o uso de técnicas mais sensíveis como o *Single Antigen*®. Alguns autores acreditam que os anticorpos classe II têm impacto na sobrevida do enxerto a longo prazo (58, 59). Outros ainda sugerem que somente a ocorrência simultânea de anticorpos anti-HLA classe I e classe II seria deletéria para o enxerto (85). Observamos que na maioria dos nossos casos (13,5%), os anticorpos anti-HLA classe I e classe II foram detectados simultaneamente. Constatamos que ambas as classes de anticorpos podem exercer efeito deletério sobre o enxerto renal, pois tanto anticorpos anti-HLA doador-específicos classe I quanto classe II,

isolados ou simultaneamente, foram implicados na rejeição aguda mediada por anticorpos.

Detectamos anticorpos anti-HLA *de novo* em 7,2% dos pacientes (Grupo B). Esses anticorpos foram tanto de classe I quanto de classe II e associaram-se a episódios de rejeição aguda, sendo estas mediadas por anticorpos em 50% dos casos. Esses dados estão em acordo com dados da literatura que preconizam que o aparecimento de anticorpos anti-HLA *de novo* associa-se à rejeição aguda ou crônica e à diminuição da sobrevida do enxerto (33, 40, 62, 86). Em 3 pacientes pudemos detectar a presença transitória de anticorpos anti-HLA não doador-específicos *de novo* na ausência de rejeição clínica (Figura 8 - Pacientes 05, 51 e 90); entretanto, o tempo de seguimento de 12 meses não foi suficiente para estabelecer o risco de rejeição crônica e falência do enxerto associados a esses anticorpos. Outro ponto a ser avaliado nesses casos seria a falta de biópsias protocolares, que deixariam de diagnosticar rejeições subclínicas. Estudos prévios indicam que anticorpos anti-HLA *de novo*, doador-específicos ou não, podem ser detectados antes da falência do enxerto e em qualquer ocasião após o transplante (24, 61).

Um paciente com anticorpo anti-HLA *de novo* cursou com rejeição crônica confirmada por biópsia. Essa rejeição foi associada à deposição difusa de C4d e à presença de anticorpos anti-HLA doador-específicos. Embora este seja um caso de rejeição crônica mediada por anticorpos, todas as rejeições crônicas foram excluídas da análise.

Pacientes com anticorpos anti-HLA pré-transplante e que mantiveram ou elevaram os níveis desses anticorpos apresentaram maior risco de rejeição aguda, de marcação positiva para C4d e de perda do enxerto (Grupos C e D). Nesses pacientes, anticorpos anti-HLA doador-específicos foram detectados no momento da rejeição e, em 2 casos, foram detectados antes da mesma. Esses resultados são coincidentes com os de outros autores que detectaram anticorpos anti-HLA doador-específicos no momento da rejeição (54, 55, 67, 82). Nesse subgrupo de pacientes, os episódios de rejeição foram freqüentemente precoces (40% na primeira semana), o que pode ser explicado pela eventual presença de anticorpos em baixos títulos não detectados no momento do transplante ou por recrudescimento da memória imunológica em pacientes com sensibilização anti-HLA prévia. Em tais casos, uma abordagem alternativa seria a pesquisa precoce e mais freqüente dos anticorpos anti-HLA nos primeiros dias após o transplante, ou ainda o emprego de técnicas mais sensíveis para detecção de anticorpos anti-HLA doador-específicos antes do transplante (87). Um possível mecanismo para a produção dos anticorpos seria a estimulação crônica dos linfócitos B, que poderiam proliferar e se diferenciar em plasmócitos de longa duração (do inglês, *long-lived plasma cell*) na medula óssea (88). A proliferação plasmocitária contínua e em baixo ritmo, mesmo na ausência de estímulo antigênico, pode perpetuar a produção de anticorpos que se segue à exposição inicial aos antígenos após o transplante de órgãos (89, 90).

Um achado interessante neste estudo foi a diminuição progressiva dos níveis de anticorpos nos 14 pacientes do Grupo E. Nesse Grupo, ocorreram 2 episódios de rejeição aguda em um mesmo paciente que evoluiu com boa resposta à terapia anti-rejeição e recuperação da função renal. Os outros pacientes desse Grupo mantiveram boa função renal no decorrer do estudo e não apresentaram episódios de rejeição. É possível que a diminuição dos níveis de anticorpos anti-HLA tenha sido conseqüente à supressão ou à inibição da resposta clonal dos plasmócitos aos antígenos HLA do doador expressos no enxerto e pode ter sido induzida pela imunossupressão (91).

Quando avaliamos todos os pacientes, detectamos que 9% deles apresentaram anticorpos anti-HLA doador-específicos no primeiro ano após o transplante renal. Entre os pacientes com rejeição aguda, estes anticorpos foram detectados em 40% dos casos. Nenhum paciente sem rejeição aguda teve anticorpos anti-HLA doador-específicos. Todos os pacientes com anticorpos anti-HLA doador-específicos apresentaram simultaneamente anticorpos não doador-específicos e sua presença pode ser atribuída à reatividade cruzada com epitopos das moléculas HLA classe I e classe II do doador (92-94) ou ainda, pela imunização anti-HLA prévia do receptor devido a transplantes, gestações e transfusões.

Os resultados deste estudo sugerem que a pesquisa dos anticorpos anti-HLA deva ser realizada já nos primeiros dias pós-transplante, entre o 3º e 7º dia, mensalmente nos primeiros 3 meses, e depois no 6º e no 12º mês pós-transplante, pois rejeição aguda mediada por anticorpos ocorre com maior

freqüência nas primeiras semanas pós-transplante, mas também pode ocorrer após o 6º mês.

Com relação aos critérios utilizados para a interpretação da marcação por C4d, consideramos como positiva a marcação tanto difusa como focal, visto que a rejeição aguda ocorrida em tais pacientes teve evolução semelhante com relação à sobrevida do enxerto e com a lesão histológica subjacente. Em alguns estudos, pacientes com marcação focal e difusa são analisados em conjunto (19, 64, 69) enquanto em outros, somente pacientes com marcação difusa são assim considerados (54, 65, 82). A sobrevida do enxerto é menor nos pacientes com rejeições agudas C4d positivas. Resultados similares foram constatados em outros estudos, sendo a sobrevida do enxerto semelhante entre aqueles com positividade focal ou difusa, seja na rejeição aguda (95) ou crônica (96).

No presente estudo, o C4d foi positivo em 30% das rejeições agudas. Esses dados são semelhantes aos descritos na literatura onde 25% a 50% das rejeições agudas comprovadas por biópsia têm marcação positiva para C4d (20, 64-66, 68-70). Detectamos C4d positivo em biópsias com NTA e lesões Banff limítrofe e Banff I. No entanto, a positividade para este marcador foi mais comum nas lesões histologicamente mais severas como Banff II, Banff III e nas com glomerulite e nos pacientes com anticorpos anti-HLA pós-transplante, especialmente com anticorpos anti-HLA doador-específicos.

Observamos que cerca da metade das rejeições mediadas por anticorpos apresentaram rim necrótico à histologia (5 de 11 pacientes).

Segundo os Critérios de Banff (22), áreas necróticas ou cicatriciais não devem ser avaliadas para a presença de C4d, pois o resultado desta análise pode ser falso-negativo, a despeito de sua positividade em área não necrótica da mesma amostra (65). Diante disso, e pelo fato de que todas as rejeições com rim necrótico nesta casuística terem sido acompanhadas de anticorpos anti-HLA doador-específicos, lesões Banff III e má resposta ao tratamento, inferimos que em algum momento durante a rejeição aguda possa ter havido marcação positiva para C4d embora esta não tenha sido detectada na amostra estudada.

A marcação para C4d foi positiva em 5% das biópsias com NTA isolada e em nenhum caso de recidiva de doença de base. Esses dados diferem dos de outros autores (69) que detectaram C4d positivo em até 60% dos casos de NTA e de recidiva de glomerulopatia.

Embora o C4d seja um marcador sensível e específico para o diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos, em alguns pacientes a sua realização é difícil e até mesmo contra-indicada por questões clínicas e nesses casos a monitorização dos anticorpos anti-HLA pode ser de grande utilidade.

Estudos prévios mostraram que a prevalência de rejeição aguda mediada por anticorpos ocorre em torno de 5% a 10% dos pacientes transplantados (54, 65, 97). Baseados na presença de disfunção do enxerto associado à detecção de anticorpos anti-HLA doador-específicos e à marcação por C4d (24), observamos incidência de 10% de rejeição aguda

mediada por anticorpos (11 de 111 pacientes). Essas rejeições ocorreram em pacientes com ou sem anticorpos anti-HLA no pré-transplante e corroboram a indicação de monitorização dos anticorpos anti-HLA no pós-transplante.

Para a detecção de anticorpos anti-HLA doador-específicos, utilizamos provas-cruzadas por CDC e/ou CF. Diante da positividade de uma delas, procuramos definir a especificidade do anticorpo detectado por técnica de *Single Antigen*®. Vale ressaltar ainda que a rejeição aguda mediada por anticorpos ocorreu independentemente do nível de PRA-ELISA no pré-transplante, bem como ocorreu em todos os Grupos de pacientes avaliados neste estudo, apesar de ter sido mais freqüente entre os pacientes com anticorpos anti-HLA pré-transplante.

Habitualmente, o tratamento para rejeição aguda mediada por anticorpos baseia-se no uso de plasmaferese e IVIg associada ao uso de Tacrolimo e Micofenolato (73). O uso dessas drogas é empírico, uma vez que até o momento não existem estudos prospectivos, controlados e aleatorizados (73, 98) que comprovem o benefício de uma terapia em detrimento da outra. Outros tratamentos propostos são o uso de Timoglobulina, de anticorpo monoclonal anti-CD20 (Rituximab®) e da esplenectomia. Neste estudo, o tratamento das rejeições mediadas por anticorpos variou de acordo com o tempo entre o transplante e o diagnóstico de rejeição, com o diagnóstico histológico, com a história de sensibilização prévia do receptor, com a terapia de indução e de manutenção. Quatro pacientes responderam ao tratamento, enquanto que 7 evoluíram para perda do enxerto. Esses achados não nos permitem atribuir sucesso ou falência a

nenhum dos esquemas terapêuticos empregados, mas corroboram a importância do trabalho conjunto entre a equipe de transplante, do patologista e do imunologista para o diagnóstico e tratamento precoces das rejeições mediadas por anticorpos.

Dados atuais sugerem que a incidência de anticorpos pode ser diminuída pelo uso de Micofenolato, especialmente se associado à Tacrolimo (99, 100). A maioria dos pacientes neste estudo recebeu terapia de manutenção com essas drogas e, mesmo assim alguns desenvolveram anticorpos anti-HLA e rejeição.

Quatro pacientes com prova-cruzada histórica positiva receberam IVIg no momento do transplante. Três deles participaram de um protocolo de dessensibilização anti-HLA com essa medicação e foram transplantados com prova-cruzada negativa por CF. Apesar de serem pacientes com alto risco imunológico para rejeição aguda e perda do enxerto, cursaram com boa evolução clínica e com função renal estável. As provas-cruzadas realizadas no pós-transplante, com a finalidade de monitorar a presença de anticorpos doador-específicos, foram todas negativas até o presente momento. Com relação à monitorização do PRA-ELISA, esses pacientes permaneceram com anticorpos anti-HLA não doador-específicos no pós-transplante. Uma possível explicação para a boa evolução nesses casos é a ação imunomoduladora da IVIg e o transplante realizado em vigência de baixos títulos de anticorpos (43, 44, 101).

Verificamos que a sobrevida dos pacientes foi 89% no primeiro ano. Todos os óbitos ocorreram precocemente e em pacientes que não

apresentaram rejeição aguda sendo a doença cardiovascular a principal causa de óbito, seguida de infecção. Esses dados são corroborados por outros estudos (102). Não atribuímos os óbitos por causas infecciosas como decorrentes do uso de drogas anti-linfocitárias ou ao tratamento das rejeições mediadas por anticorpos, uma vez que ocorreram de forma estatisticamente semelhante em todos os Grupos.

Pacientes com rejeição mediada por anticorpos e que foram tratadas e revertidas, evoluem com a mesma função renal que pacientes que cursaram com rejeição mediada por células ou que não apresentaram nenhum episódio de rejeição ao final de 1 ano de seguimento.

A sobrevida do enxerto ao longo de 1 ano foi maior entre pacientes sem anticorpos ou quando houve diminuição dos mesmos quando comparados aos pacientes com elevação ou que mantiveram níveis elevados de tais anticorpos. Nestes casos, as perdas dos enxertos foram associadas à rejeição aguda, especialmente aquelas com marcação positiva para C4d e com anticorpos anti-HLA doador-específicos, mostrando que as rejeições mediadas por anticorpos apresentam grande impacto negativo na sobrevida do enxerto em 1 ano.

6. CONCLUSÕES

- A maior parte dos pacientes submetidos a transplante renal não desenvolve anticorpos anti-HLA após a cirurgia;
- Alguns pacientes não sensibilizados desenvolvem anticorpos anti-HLA doador-específicos *de novo* e cursam com rejeição mediada por anticorpos e perda do enxerto;
- Pacientes sensibilizados pré-transplante podem evoluir com manutenção, aumento ou diminuição dos níveis de anticorpos pós-transplante. Os que mantêm ou aumentam esses níveis, apresentam anticorpos anti-HLA doador-específicos e desenvolvem rejeição mediada por anticorpos com impacto na sobrevida do enxerto.
- A monitorização prospectiva e seriada de anticorpos anti-HLA ao longo do primeiro ano após o transplante renal, seja em pacientes com ou sem anticorpos no pré-transplante, pôde identificar pacientes com maior risco de rejeição aguda mediada por anticorpos e de perda do enxerto.

7. REFERÊNCIAS

1. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Sobrevida atuarial dos enxertos renais, Estado de São Paulo, no período de julho 1997 a dezembro de 2003. <http://www.saude.sp.gov.br/>
2. Cecka JM. The UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl.* 2002;1-20.
3. Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002; 11: 609-18.
4. Valujskikh A, Heeger PS. Emerging roles of endothelial cells in transplant rejection. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:493-8.
5. Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol Rev.* 2003;196:51-64.
6. Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. Immunologic monitoring. *Immunol Rev.* 2003;196:247-64.
7. Moraes JR, Stastny P. A new antigen system expressed in human endothelial cells. *J Clin Invest.* 1977; 60(2):449-54.
8. Glotz D, Lucchiari N, Pegaz-Fiornet B, Suberbielle-Boissel C. Endothelial cells as targets of allograft rejection. *Transplantation.* 2006;82(1 Suppl):S19-21.
9. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(14):6259-63.
10. Zwirner NW, Marcos CY, Mirbaha F, Zou Y, Stastny P. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Hum Immunol.* 2000; 61(9):917-24.
11. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med.* 1998;338(25):1813-21.
12. Coelho V, Spadafora-Ferreira M, Marrero I, Fonseca JA, Portugal K, Kalil J. Evidence of indirect allorecognition in long-term human renal transplantation. *Clin Immunol.* 1999; 90(2):220-9.

13. Spadafora-Ferreira M, Granja C, Fonseca JA, Marrero I, Kalil J, Coelho V. Indirect alloreactivity and cytokine production to HLA-DR peptides in human renal transplantation. *Transplant Proc.* 2001; 33(1-2):435-6.
14. Sayegh MH, Watschinger B, Carpenter CB. Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides. *Transplantation.* 1994; 57(9):1295-302.
15. Afzali B, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens.* 2007; 69(6):545-56.
16. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986; 136(7):2348-57.
17. Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Burke B, *et al.* Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol.* 1997 ;8(12):1930-41.
18. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, *et al.* The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999; 55(2):713-23.
19. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmuller G, *et al.* Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int.* 1993;43(6):1333-8.
20. Nicleleit V, Zeiler M, Gudat F, Thiel G, Mihatsch MJ. Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts: diagnostic and therapeutic implications. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(1):242-51.
21. Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant.* 2004;4(10):1562-6.
22. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, *et al.* Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant.* 2003;3(6):708-14.
23. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, *et al.* Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant.* 2007;7(3):518-26.

24. Takemoto SK, Zeevi A, Feng S, Colvin RB, Jordan S, Kobashigawa J, *et al.* National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2004;4(7):1033-41.
25. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet.* 1966;2(7465):662-5.
26. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med.* 1969;280(14):735-9.
27. Amos DB, Bashir H, Boyle W, MacQueen M, Tiilikainen A. A simple micro cytotoxicity test. *Transplantation.* 1969;7(3):220-3.
28. Johnson AH, Rossen RD, Butler WT. Detection of alloantibodies using a sensitive antiglobulin microcytotoxicity test: identification of low levels of pre-formed antibodies in accelerated allograft rejection. *Tissue Antigens.* 1972;2(3):215-26.
29. Zachary AA, Klingman L, Thorne N, Smerglia AR, Teresi GA. Variations of the lymphocytotoxicity test. An evaluation of sensitivity and specificity. *Transplantation.* 1995;60(5):498-503.
30. Bray RA. Flow cytometry crossmatching for solid organ transplantation. *Methods Cell Biol.* 1994;41:103-19.
31. Susskind B. Methods for histocompatibility testing in the early 21st century. *Curr Opin Organ Transpl.* 2007;12:393-401.
32. Gebel HM, Bray RA. Sensitization and sensitivity: defining the unsensitized patient. *Transplantation.* 2000;69(7):1370-4.
33. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant.* 2003;3(12):1488-500.
34. Kao KJ, Scornik JC, Small SJ. Enzyme-linked immunoassay for anti-HLA antibodies--an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. *Transplantation.* 1993;55(1):192-6.
35. Gloor JM, Moore SB, Schneider BA, DeGoey SR, Stegall MD. The effect of antithymocyte globulin on anti-human leukocyte antigen antibody detection assays. *Transplantation.* 2007;84(2):258-64.
36. Scornik JC, Salomon DR, Lim PB, Howard RJ, Pfaff WW. Posttransplant antidonor antibodies and graft rejection. Evaluation by two-color flow cytometry. *Transplantation.* 1989;47(2):287-90.

37. Sumitran-Karuppan S, Moller E. The use of magnetic beads coated with soluble HLA class I or class II proteins in antibody screening and for specificity determinations of donor-reactive antibodies. *Transplantation*. 1996;61(10):1539-45.
38. Scornik JC, Ireland JE, Howard RJ, Pfaff WW. Assessment of the risk for broad sensitization by blood transfusions. *Transplantation*. 1984;37(3):249-53.
39. Shenton BK. The detection and relevance of pretransplant antibodies. *Transpl Immunol*. 1994;2(2):135-7.
40. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant*. 2003;3(6):665-73.
41. Susal C, Opelz G. Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. *Transplantation*. 2002;73(8):1269-73.
42. Castro MC, Araujo LM, Nahas WC, Arap S, David-Neto E, Ianhez LE. Induction versus noninduction therapy in kidney transplantation: considering different PRA levels and different induction therapies. *Transplant Proc*. 2004;36(4):874-6.
43. Glotz D, Antoine C, Julia P, Suberbielle-Boissel C, Boudjeltia S, Fraoui R, *et al*. Desensitization and subsequent kidney transplantation of patients using intravenous immunoglobulins (IVIg). *Am J Transplant*. 2002;2(8):758-60.
44. Castro MCR, Panajotopoulos N, Araújo LM, Rodrigues H, Maciel R, Ronda C, Viggiani CS, Nahas WC, David-Neto E, Ianhez LE, Kalil JE, Glotz D. Renal transplantation using living donors with a positive crossmatch: can we predict efficacy of desensitization with IVIG by an "in vitro" test? *Transplantation* 2004;78(2):258.
45. Jordan SC, Pescovitz MD. Presensitization: the problem and its management. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1(3):421-32.
46. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Hanson JA, Cibrik DM, Punch JD, Leichtman AB, *et al*. Increased impact of acute rejection on chronic allograft failure in recent era. *Transplantation*. 2000;70(7):1098-100.
47. Bradley JA, Mowat AM, Bolton EM. Processed MHC class I alloantigen as the stimulus for CD4+ T-cell dependent antibody-mediated graft rejection. *Immunol Today*. 1992;13(11):434-8.
48. Paul LC. Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney Int*. 1999;56(3):783-93.

49. Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation*. 1992;53(3):550-5.
50. Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody, Analysis using the Banff grading schema. *Transplantation*. 1996 Jun 15;61(11):1586-92.
51. Castro MC, David DS, Saldanha LB, Sabbaga E, Arap S, Ianhez LE. Acute vascular rejection: a clinical and morphological study. *Transpl Int*. 1998;11 Suppl 1:S15-8.
52. Monteiro F, Buelow R, Mineiro C, Rodrigues H, Kalil J. Identification of patients at high risk of graft loss by pre- and posttransplant monitoring of anti-HLA class I IgG antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *Transplantation*. 1997;63(4):542-6.
53. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation*. 2003;75(7):1034-40.
54. Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Mauiyyedi S, Collins AB, Fitzpatrick D, *et al*. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation*. 2001;71(5):652-8.
55. Zhang Q, Liang LW, Gjertson DW, Lassman C, Wilkinson AH, Kendrick E, *et al*. Development of posttransplant antidonor HLA antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction. *Transplantation*. 2005;79(5):591-8.
56. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, Mizutani K, Moreau A, Meurette A, *et al*. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(9):2804-12.
57. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant*. 2004;4(3):438-43.
58. Pelletier RP, Hennessy PK, Adams PW, VanBuskirk AM, Ferguson RM, Orosz CG. Clinical significance of MHC-reactive alloantibodies that develop after kidney or kidney-pancreas transplantation. *Am J Transplant*. 2002;2(2):134-41.

59. Campos EF, Tedesco-Silva H, Machado PG, Franco M, Medina-Pestana JO, Gerbase-DeLima M. Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *Am J Transplant.* 2006;6(10):2316-20.
60. Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Servetti S, Monaco PI, Buonomo O, *et al.* Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation.* 2001;71(8):1106-12.
61. Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, *et al.* All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation.* 2002;74(8):1192-4.
62. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation.* 2000;69(3):319-26.
63. Cardarelli F, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Delmonico FL, Wong W, Schoenfeld DA, *et al.* Prevalence and significance of anti-HLA and donor-specific antibodies long-term after renal transplantation. *Transpl Int.* 2005;18(5):532-40.
64. Herzenberg AM, Gill JS, Djurdjev O, Magil AB. C4d deposition in acute rejection: an independent long-term prognostic factor. *J Am Soc Nephrol.* 2002 ;13(1):234-41.
65. Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, *et al.* Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(3):779-87.
66. Nicleleit V, Mihatsch MJ. Kidney transplants, antibodies and rejection: is C4d a magic marker? *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(11):2232-9.
67. Bohmig GA, Exner M, Habicht A, Schillinger M, Lang U, Kletzmayer J, *et al.* Capillary C4d deposition in kidney allografts: a specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(4):1091-9.
68. Feucht HE. Complement C4d in graft capillaries -- the missing link in the recognition of humoral alloreactivity. *Am J Transplant.* 2003;3(6):646-52.
69. Lederer SR, Kluth-Pepper B, Schneeberger H, Albert E, Land W, Feucht HE. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long-term survival of renal allografts. *Kidney Int.* 2001;59(1):334-41.
70. Worthington JE, McEwen A, McWilliam LJ, Picton ML, Martin S. Association between C4d staining in renal transplant biopsies, production of donor-specific HLA antibodies, and graft outcome. *Transplantation.* 2007;83(4):398-403.

71. Haas M, Rahman MH, Racusen LC, Kraus ES, Bagnasco SM, Segev DL, *et al.* C4d and C3d staining in biopsies of ABO- and HLA-incompatible renal allografts: correlation with histologic findings. *Am J Transplant.* 2006;6(8):1829-40.
72. Martin L, Guignier F, Bocié O, D'Athis P, Rageot D, Rife G, *et al.* Detection of anti-HLA antibodies with flow cytometry in needle core biopsies of renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation.* 2005;79(10):1459-61.
73. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(4):1046-56.
74. Sumitran-Holgersson S, Holgersson J. Clinical importance of non-HLA antibodies in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transpl.* 2006(11):425-32.
75. Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. *Am J Transplant.* 2005;5(11):2611-8.
76. Sun Q, Liu Z, Yin G, Chen H, Chen J, Li L. Detectable circulating antiendothelial cell antibodies in renal allograft recipients with C4d-positive acute rejection: a report of three cases. *Transplantation.* 2005;79(12):1759-62.
77. Montgomery RA, Hardy MA, Jordan SC, Racusen LC, Ratner LE, Tyan DB, *et al.* Consensus opinion from the antibody working group on the diagnosis, reporting, and risk assessment for antibody-mediated rejection and desensitization protocols. *Transplantation.* 2004;78(2):181-5.
78. Boyum A. Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens.* 1974;4(4):269-74.
79. Danilovs JA, Ayoub R, Terasaki PI. *Hitocompatibility testing.* Los Angeles: In Terasaki PI; 1980.
80. Amos, DB; Pool, P. *HLA typing* In: Manual of clinical immunology. Eds NR Rose, H Friedma. American Society of Microbiology, 1976, p 759-804.
81. Pei R, Lee J, Chen T, Rojo S, Terasaki PI. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Hum Immunol.* 1999;60(12):1293-302.
82. Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Williams WW, Tolkoﬀ-Rubin N, *et al.* Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(10):2208-14.

83. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant.* 2007 ;7(2):408-15.
84. Akalin E, Pascual M. Sensitization after kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1(3):433-40.
85. Susal C, Pelzl S, Simon T, Opelz G. Advances in pre- and posttransplant immunologic testing in kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2004;36(1):29-34.
86. Girnita AL, Webber SA, Zeevi A. Anti-HLA alloantibodies in pediatric solid organ transplantation. *Pediatr Transplant.* 2006;10(2):146-53.
87. Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Nochy D, Andrade J, Antoine C, *et al.* Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2008;8(2):324-31.
88. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(3):230-42.
89. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science.* 2002 ;298(5601):2199-202.
90. Traggiai E, Puzone R, Lanzavecchia A. Antigen dependent and independent mechanisms that sustain serum antibody levels. *Vaccine.* 2003;21 Suppl 2:S35-7.
91. van den Berg-Loonen EM, Terasaki P, Kohanof S, Christiaans MH. Longitudinal testing of seventy-six renal allograft patients for HLA antibodies: Maastricht experience. *Clin Transpl.* 2006:305-22.
92. Fernandez-Fresnedo G, Pastor JM, Ruiz JC, Cotorruelo JG, Setien MA, Lopez-Hoyos M, *et al.* Differences in anti-CREG antibody formation between transplanted and nontransplanted renal patients. *Transplantation.* 1999;67(8):1188-90.
93. Laux G, Opelz G. Immunological relevance of CREG matching in cadaver kidney transplantation. *Transplantation.* 2004;78(3):442-6.
94. El-Awar N, Lee JH, Tarsitani C, Terasaki PI. HLA class I epitopes: recognition of binding sites by mAbs or eluted alloantibody confirmed with single recombinant antigens. *Hum Immunol.* 2007;68(3):170-80.
95. Magil AB, Tinckam KJ. Focal peritubular capillary C4d deposition in acute rejection. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(5):1382-8.

96. David-Neto E, Prado E, Beutel A, Ventura CG, Siqueira SA, Hung J, *et al.* C4d-positive chronic rejection: a frequent entity with a poor outcome. *Transplantation*. 2007;84(11):1391-8.
97. Lefaucheur C, Nochy D, Hill GS, Suberbielle-Boissel C, Antoine C, Charron D, *et al.* Determinants of poor graft outcome in patients with antibody-mediated acute rejection. *Am J Transplant*. 2007;7(4):832-41.
98. Nickleit V, Andreoni K. The classification and treatment of antibody-mediated renal allograft injury: where do we stand? *Kidney Int*. 2007;71(1):7-11.
99. Theruvath TP, Saidman SL, Mauiyyedi S, Delmonico FL, Williams WW, Tolckoff-Rubin N, *et al.* Control of antidonor antibody production with tacrolimus and mycophenolate mofetil in renal allograft recipients with chronic rejection. *Transplantation*. 2001;72(1):77-83.
100. Sun Q, Liu ZH, Cheng Z, Chen J, Ji S, Zeng C, *et al.* Treatment of early mixed cellular and humoral renal allograft rejection with tacrolimus and mycophenolate mofetil. *Kidney Int*. 2007;71(1):24-30.
101. Jordan SC, Vo AA, Toyoda M, Tyan D, Nast CC. Post-transplant therapy with high-dose intravenous gammaglobulin: Applications to treatment of antibody-mediated rejection. *Pediatr Transplant*. 2005;9(2):155-61.
102. Djamali A, Samaniego M, Muth B, Muehrer R, Hofmann RM, Pirsch J, *et al.* Medical care of kidney transplant recipients after the first posttransplant year. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1(4):623-40.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)