

**DETECÇÃO DE LINFÓCITOS B EM
REJEIÇÃO MEDIADA POR LINFÓCITOS
T AGUDA EM ALOENXERTOS RENAIIS
DE DOADOR FALECIDO**

Autor: Rafael Nazário Bringhenti

Orientadora: Profa. Dra. Elizete Keitel

Co-Orientadoras: Profa. Dra. Marcia Silveira Graudenz

Dra. Tatiana Ferreira Michelin

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como
requisito para a obtenção do grau de Mestre**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

DETECÇÃO DE LINFÓCITOS B EM REJEIÇÃO MEDIADA POR LINFÓCITOS T AGUDA EM ALOENXERTOS RENAIIS DE DOADOR FALECIDO

Autor: Rafael Nazário Bringhenti

Orientadora: Profa. Dra. Elizete Keitel

Co-Orientadoras: Profa. Dra. Marcia Silveira Graudenz

Dra. Tatiana Ferreira Michelin

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como
requisito para a obtenção do grau de Mestre**

2009

B858d Bringhenti, Rafael Nazário
Detecção de linfócitos B em rejeição aguda mediada por
linfócitos T em aloenxertos renais de doador falecido /
Rafael Nazário Bringhenti. – 2009.
148 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia,
2009.

“Orientadora: Prof. Dra. Elizete Keitel ; co-orientadoras: Prof.
Dra. Márcia Silveira Graudenz, Dra. Tatiana Ferreira Michelin”.

1. Transplante renal – Doador falecido. 2. Insuficiência renal.
3. Rejeição aguda. 4. Enxerto renal. I. Título

CDD 617.4610592
CDU 616.61-089.84

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Celeste Nazário Bringhenti e Ivanio Antonio Bringhenti, pelo incessante apoio em todas as minhas aspirações.

Aos meus avós, Ana Feltrin Nasario e Antônio Ronolfo Nasario, pelo carinho ao longo de todos estes anos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Elizete Keitel, por todo o apoio ao longo do Mestrado e pela prontidão sempre que surgia qualquer necessidade.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Marcia Silveira Graudenz, pela ajuda na interpretação das lâminas e pelo estímulo.

À minha co-orientadora, Dra. Tatiana Ferreira Michelon, pela fundamental ajuda, sem a qual este trabalho não seria possível.

À Regina Barbosa, pela ajuda na coleta de dados clínicos e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA, pelos ensinamentos ao longo do curso.

Aos colegas mestrandos e doutorandos do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA, pela estimulante troca de idéias e informações.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA, Prof. Dr. Antônio Atalíbio Hartmann, pela preocupação e atenção com tudo o que envolve este Programa.

Às técnicas do Laboratório de Pesquisa em Patologia, Terezinha Stein e Rosalva Tereza Meurer, pela confecção das lâminas de histoquímica e imunoistoquímica, pelo zelo com o material e pelos agradáveis momentos que passamos juntos.

À CAPES, pelo apoio financeiro fornecido ao longo do Mestrado.

À Dra. Liane Golbspan, minha grande mentora em Patologia Cirúrgica.

À Profa. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss, por ter me iniciado na Patologia Renal e me estimulado a envolver-me em atividades de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Francisco José Veríssimo Veronese, por ter avaliado o projeto e ter dado inestimáveis sugestões e contribuições para este trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA, especialmente às secretárias Ivonice Oliveira Santos e Maristela Pasin, pelo constante apoio durante o Mestrado.

Aos professores, colegas e funcionários dos tempos da graduação da então Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA), hoje UFCSPA, fundamentais para a minha formação como Médico.

Aos professores, patologistas contratados, colegas residentes e funcionários do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, essenciais para a minha formação como Médico Patologista.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas - VI

1. Introdução – 1

1.1. Rejeição Mediada por Linfócitos T Aguda – 5

1.1.1. Epidemiologia – 5

1.1.2. Fisiopatologia – 6

1.1.3. Histopatologia – 8

1.1.4. Aspectos Clínicos – 10

1.2. Rejeição Mediada por Anticorpos Aguda – 11

1.2.1. Epidemiologia – 11

1.2.2. Fisiopatologia – 12

1.2.3. Histopatologia – 13

1.2.4. Aspectos Clínicos – 15

1.3. Alterações Crônicas do Enxerto Renal – 16

1.3.1. Definições – 16

1.3.2. Epidemiologia – 16

1.3.3. Fisiopatologia – 17

1.3.4. Classificação – 21

1.4. Impacto da Rejeição Aguda – 26

1.4.1. Impacto Sobre a Função do Enxerto – 26

1.4.2. Associação com Alterações Histopatológicas Crônicas – 27

1.4.3. Impacto na Sobrevida do Enxerto – 29

1.4.4. Impacto Sobre Outros Desfechos – 30

1.4.5. Impacto da Rejeição Mediada por Anticorpos Aguda – 31

1.5. Sistemas de Classificação da Rejeição ao Enxerto Renal – 32
1.5.1. Validação da Classificação de Banff – 33
1.5.2. Reprodutibilidade – 35
1.5.3. O Acréscimo do C4d – 36
1.5.4. Outras Classificações – 37
1.6. Linfócitos B – 38
1.6.1. Generalidades – 38
1.6.2. Relação dos Linfócitos B com o Transplante Renal – 40
1.6.3. Linfócitos B e Rejeição Aguda ao Enxerto Renal – Evidências – 41
1.7. Referências Bibliográficas – 47
2. Objetivos – 65
2.1. Objetivo Geral – 65
2.2. Objetivos Específicos – 65
3. Artigo Científico Redigido em Inglês – 67
4. Artigo Científico Redigido em Português – 90
5. Conclusões Finais – 115
6. Anexos – 116
6.1. Anexo I – 116
6.2. Anexo II – 121
6.3. Anexo III – 123
6.4. Anexo IV – 124
6.5. Anexo V – 127
6.6. Anexo VI – 130

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMR: rejeição mediada por anticorpos (*antibody-mediated rejection*)
- APCs: células apresentadoras de antígenos (*antigen-presenting cells*)
- CADI: Índice do Dano Crônico do Enxerto (*Chronic Allograft Damage Index*)
- CAN: nefropatia crônica do enxerto (*chronic allograft nephropathy*)
- CCL19: ligante de quimiocina 19 (*chemokine ligand 19*)
- CCL21: ligante de quimiocina 21 (*chemokine ligand 21*)
- CCR7: receptor 7 de quimiocina (*chemokine receptor 7*)
- CCTT: Estudos Clínicos Cooperativos em Transplantes (*Cooperative Clinical Trials in Transplantation*)
- CD: agrupamento de designação (*cluster of designation*)
- CTLA4: proteína associada a linfócitos T citotóxicos 4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)
- DAGL: óbito após a perda de enxerto (*death after graft loss*)
- DCs: células dendríticas (*dendritic cells*)
- DSA: anticorpos específicos anti-doador (*donor-specific antibodies*)
- DWGF: óbito com enxerto funcionando (*death with graft function*)
- HLA: antígenos leucocitários humanos (*human leucocyte antigens*)
- ICOS: co-estimulador induzível (*inducible costimulator*)
- ICOSL: ligante de co-estimulador induzível (*inducible costimulator ligand*)
- IL-1: interleucina-1 (*interleukin-1*)
- IL-2: interleucina-2 (*interleukin-2*)
- IL-4: interleucina-4 (*interleukin-4*)
- IL-5: interleucina-5 (*interleukin-5*)

IL-6: interleucina-6 (*interleukin-6*)

IL-10: interleucina-10 (*interleukin-10*)

IL-12: interleucina-12 (*interleukin-12*)

IL-18: interleucina-18 (*interleukin-18*)

INF- γ : interferon-gama (*interferon- gama*)

LT- α : linfotoxina-alfa (*lymphotoxin- alfa*)

MHC: complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)

MMP-2: metaloproteinase-2 (*metaloproteinase-2*)

MMP-9: metaloproteinase-9 (*metaloproteinase-9*)

NIH: Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (*National Institute of Health*)

PTCBMML: multilamação da membrana basal dos capilares peritubulares (*peritubular capillary basement membrane multilayering*)

RAC: rejeição aguda celular

SRTR: Registro Científico de Receptores de Transplantes (*Scientific Registry of Transplant Recipients*)

TCMR: rejeição mediada por linfócitos T (*T-cell-mediated rejection*)

TG: glomerulopatia do transplante (*transplant glomerulopathy*)

TGF- β : fator transformador do crescimento-beta (*transforming growth factor beta*)

Th2: linfócitos T auxiliares-2 (*T lymphocytes helper-2*)

TIMP's: inibidores teciduais de metaloproteinases (*tissue inhibitor of metalloproteinases*)

TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa (*tumoral necrosis factor- alfa*)

TNF- β : fator de necrose tumoral-beta (*tumoral necrosis factor- beta*)

TNFR1: receptor de fator de necrose tumoral-1 (*tumoral necrosis factor receptor-1*)

TNFR2: receptor de fator de necrose tumoral-2 (*tumoral necrosis factor recepto- 1*)

UNOS: Rede Unida Para Compartilhamento de Órgãos (*United Network for Organ Sharing*)

V_{IntFib} : volume de fibrose intersticial cortical fracionado (*cortical interstitial fibrosis fractionated volume*)

1. INTRODUÇÃO

O transplante renal é, atualmente, a terapêutica de escolha para a maior parte dos casos de insuficiência renal em fase terminal (Knoll e cols., 2005). Dados comparando os desfechos de pacientes em lista de espera de transplante renal (pacientes em diálise) com receptores de transplante demonstraram, após acompanhamento de três a quatro anos, uma redução de risco de mortalidade geral de 68% em favor do grupo transplantado (Schnuelle e cols., 1998; Wolfe e cols., 1999; Meier-Kriesche e cols., 2001). O transplante renal permite também melhor qualidade de vida em comparação à diálise (Cameron e cols., 2000) e tem melhor desempenho, ao ser considerada a relação custo-benefício (Laupacis e cols., 1996).

Historicamente, o primeiro transplante renal em humanos foi efetuado por Voronoy em 1936 na Ucrânia. Não houve o funcionamento do enxerto, mas os vasos estavam patentes conforme verificado na necropsia dois dias após a cirurgia. Após esta primeira tentativa, as experiências mais significativas ocorreram nas décadas de 40 e 50 em Boston e Paris. As limitações para o procedimento relacionavam-se aos eventos de rejeição aguda, os quais impediam maior sobrevida dos enxertos (Colvin e Nickleit, 2007). A aplicação efetiva do transplante renal como alternativa terapêutica ocorreu apenas com o advento da imunossupressão. A partir do início da década de 60, foram sucessivamente disponibilizados fármacos e outras modalidades terapêuticas como 6-mercaptopurina (posteriormente substituída pela azatioprina), irradiação corporal total (abandonada pela toxicidade), prednisona, anticorpos policlonais antilinfócitos, ciclosporina, anticorpos monoclonais, tacrolimus, micofenolato mofetil, micofenolato sódico, sirolimus, everolimus, FTY 720A, anticorpos monoclonais anti-CD3 (CD: *Cluster of Designation*) e anticorpos humanizados dirigidos ao receptor de interleucina-

2 ou ao CD52. Este arsenal terapêutico, juntamente com a progressiva melhora na avaliação de doadores e receptores, colaborou para uma significativa melhora na sobrevida dos pacientes transplantados, principalmente nos primeiros anos após o procedimento (Pirsch e cols., 1997; Kahan e cols., 1998; Kahan e cols., 1999; Ekberg e cols., 2000; Ojo e cols., 2000b; Manfro e Gonçalves, 2006).

Os dados acerca da sobrevida do enxerto oriundo de doador falecido colhidos nas últimas décadas mostram esta evolução. De 1988 a 1996, a sobrevida do enxerto no final do primeiro ano após o transplante com doador falecido passou de 75,7% para 87,7%. A meia-vida do enxerto passou de 7,9 para 13,8 anos (Hahiharan e cols. 2000). Os números mais recentes disponíveis no sítio da UNOS (*United Network for Organ Sharing*) demonstram, em relação ao transplante com doador falecido, um incremento de sobrevida do enxerto em um ano pós-transplante de 75,7% em 1987 para 92,0% em 2005, e, em três anos, de 62,4% em 1987 para 81,7% em 2003.

No entanto, considerando os dados relativos à sobrevida do enxerto deste mesmo grupo em acompanhamentos mais longos, o panorama atual não se mostra tão positivo. As taxas médias de sobrevida do enxerto aos dez anos pós-transplante têm se situado entre 36,4% e 43,1% (Sayegh e Carpenter 2004; UNOS). Atribui-se, atualmente, esta significativa queda de desempenho em longo prazo a alterações crônicas do enxerto (Matas e cols., 2002; Ponticelli, 2004; Brennan, 2006). Contudo, a ocorrência de rejeição aguda permanece como um evento que contribui para a perda de enxerto em longos seguimentos (Kaplan, 2006). Dados referentes a transplantes efetuados na década de 1980 já apontavam para maiores taxas de insucesso durante acompanhamentos prolongados nos pacientes com um episódio de rejeição aguda, em comparação aos pacientes que não sofreram este evento imunológico (Humar e cols., 1999). Os resultados colhidos no seguimento dos transplantados durante a década de

1990 continuaram a evidenciar o papel potencialmente deletério da rejeição aguda na sobrevida do enxerto em longo prazo (Meier-Kriesche e cols., 2000).

Evidências colhidas ao longo das últimas duas décadas têm fornecido substrato para os dados que relacionam a rejeição aguda a desempenhos inferiores ao longo dos anos, ao incluí-la como um dos elementos da causação das alterações morfológicas (fibrose e atrofia do parênquima renal) e funcionais crônicas do enxerto (Nankivell e Chapman, 2006). Estudo envolvendo 675 pacientes transplantados entre 1976 e 1991 e acompanhados por, em média, sete anos demonstrou que a ocorrência de um ou mais episódios de rejeição aguda clinicamente manifesta é fator de risco independente para o desenvolvimento de alterações crônicas no enxerto (Massy e cols., 1996). Posteriormente, outro estudo, envolvendo biópsias de indicação clínica e biópsias protocolares, evidenciou que tanto episódios de rejeição aguda clinicamente manifesta quanto episódios de rejeição aguda subclínica (alterações histopatológicas de rejeição aguda sem quadro clínico-laboratorial correspondente) associam-se a alterações histopatológicas crônicas em biópsias após um ano de transplante (Nankivell e cols., 2003). Considerações fisiopatológicas têm sido feitas acerca desta associação. Primeiramente, o dano e o reparo provocados pela rejeição aguda levam à perda da integridade das membranas basais e a dano estrutural e favorecem a ocorrência de fibrose (Bonsib e cols., 2000). Fatores pró-fibróticos como o fator transformador do crescimento beta (TGF- β : *transforming growth factor beta*) e os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP's: *tissue inhibitor of metalloproteinases*) têm expressão aumentada nestes eventos (Nicholson e cols., 2002). A persistência de células e mediadores da inflamação foi também relacionada à ocorrência de fibrose (Nankivell e cols., 2004), à pior função renal e à menor sobrevida do enxerto (Shishido e cols., 2003).

Classicamente atribui-se aos linfócitos T o papel de grande protagonista nos processos de rejeição aguda, recebendo outros grupos celulares, como os linfócitos B e os macrófagos, atenção consideravelmente menor (Wyburn e cols., 2005). Recente evolução na classificação da rejeição aguda possibilitou a divisão da mesma em dois processos fisiopatológicos básicos, com critérios bem estabelecidos: a rejeição mediada por linfócitos T (TCMR: *T-cell-mediated rejection*) aguda, previamente conhecida como rejeição aguda celular (RAC), e a rejeição mediada por anticorpos (AMR: *antibody-mediated rejection*) aguda, anteriormente conhecida como rejeição aguda humoral. (Racusen e cols., 2003; Solez e cols., 2008). Entretanto, algumas evidências têm demonstrado a presença de linfócitos B no infiltrado celular de biópsias classificadas como TCMR aguda, tendo estes casos maior resistência à terapêutica com glicocorticóides e menor sobrevida do enxerto em algumas séries (Zarkhin e cols., 2008).

Será revisada na próxima seção a rejeição aguda ao enxerto renal em seus aspectos clínicos, fisiopatológicos e histopatológicos e sua classificação. Segue revisão acerca das alterações crônicas do enxerto renal, tanto os aspectos da rejeição crônica quanto outras formas de lesão de longo curso. Posteriormente, enfatizar-se-á o impacto da rejeição aguda sobre desfechos do transplante renal. Subseqüentemente, abordar-se-ão as formas de classificação histopatológicas do enxerto renal. Por fim serão abordados aspectos gerais dos linfócitos B e os dados acerca de seu possível papel na rejeição aguda ao enxerto renal, por ser este último aspecto o tema específico do presente estudo.

1.1. Rejeição Mediada por Linfócitos T Aguda

1.1.1. Epidemiologia

A incidência dos episódios de rejeição mediada por linfócitos T (TCMR: *T cell-mediated rejection*) aguda tem diminuído nas últimas décadas. Van Sasse e cols. (1995) acompanharam uma coorte de 482 pacientes submetidos a transplante renal de doador falecido entre janeiro de 1983 e abril de 1991. Nos primeiros três meses do seguimento, ocorreu episódio de rejeição aguda em 49,2% dos pacientes. Outro estudo envolvendo 293 pacientes transplantados em época semelhante (maio de 1985 a dezembro de 1989) e com uma ou mais biópsias disponíveis e efetuadas entre o segundo e o trigésimo quinto dia pós-transplante registrou ocorrência de rejeição aguda em 42,4% dos indivíduos (Bates e cols., 1999). Meier-Kriesche e cols. (2004) analisaram 62.103 pacientes adultos do Registro Científico de Receptores de Transplantes (SRTR: *Scientific Registry of Transplant Recipients*) transplantados entre 1995 e 2000. Dentre os pacientes transplantados em 1995, as incidências de rejeição aguda nos primeiros seis meses, após seis e até doze meses e no segundo ano foram, respectivamente, 35,7%, 21,4% e 22,5%. Os dados referentes aos mesmos períodos colhidos relativos aos transplantes ocorridos em 2000 foram, respectivamente, 14,6%, 6,0% e 2,9. Ensaio clínico avaliando três regimes de indução com anticorpos registrou ocorrência de episódios de rejeição aguda em acompanhamento de um ano pós-transplante em 16,6% dos pacientes. O período dos transplantes foi de 2002 a 2004 e envolveu noventa receptores de um primeiro transplante renal com enxertos de doadores falecidos (Ciancio e cols., 2005). Consideram-se fatores de risco o grau de histocompatibilidade entre o doador e o receptor, exposição antigênica prévia (transplante anterior, transfusão

sangüínea e gestação), idade do receptor, raça, sexo, regime de imunossupressão, adesão ao tratamento e dano isquêmico ao enxerto (Colvin e Nickleit, 2007).

1.1.2. Fisiopatologia

Os componentes básicos da resposta imunológica responsável pela TCMR aguda são os antígenos, as células apresentadoras de antígenos (APCs: *antigen-presenting cells*), os mecanismos de co-estimulação e as células responsáveis pela lesão celular (Cornell e cols., 2008).

As principais moléculas desencadeadoras do processo aloimune são os antígenos das classes I e II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC: *major histocompatibility complex*), denominados antígenos HLA na espécie humana (HLA: *human leucocitary antigens*). Estes antígenos são moléculas de superfície determinadas geneticamente e extremamente polimórficas que se distribuem difusa e variavelmente e são expressas em células do enxerto renal, especialmente as endoteliais e as tubulares. Isto faz com que estas células se tornem alvos da resposta aloimune. Os linfócitos T reconhecem os antígenos do MHC, assim como outros antígenos polimórficos, tais como antígenos do sistema ABO sangüíneo e auto-antígenos (Cornell e cols., 2008).

A apresentação dos antígenos aos linfócitos T ocorre, predominantemente, por APCs conhecidas como células dendríticas (DCs: *dendritic cells*), sendo que, a depleção de DCs do doador pode prolongar a sobrevida do enxerto (Lechler e Batchelor, 1982). Logo após o transplante, as DCs do doador migram para os linfonodos e para o baço do receptor e as DCs do receptor migram para o enxerto, fazendo com que a resposta imunológica contra o enxerto ocorra a partir de antígenos expressos por células do receptor e do doador (Larsen e cols., 1990). A migração das DCs para os tecidos linfóides necessita da presença das quimiocinas CCL19 e CCL21. A ausência destas

quimiocinas ou de seu receptor CCR7 (CCR7: *chemokine receptor 7*) inibe a resposta aloimune aguda (Colvin e Smith, 2005). Em termos básicos, o reconhecimento, pelos linfócitos T, de moléculas do MHC intactas em APCs do doador denomina-se apresentação direta, enquanto o processamento das moléculas do MHC por APCs do receptor e apresentação de peptídeos aos linfócitos T, é conhecido como apresentação indireta (Abbas, 2004). Classicamente, os linfócitos T CD8 positivos reconhecem antígenos de classe I, e os linfócitos T CD4 positivos reconhecem os antígenos de classe II. Outros grupos celulares podem atuar como células apresentadoras de antígenos. Os linfócitos B têm esta capacidade devido à presença, em sua superfície, de moléculas co-estimulatórias, de altos níveis de moléculas de classe II e de imunoglobulinas de superfície (glicoproteínas potencialmente concentradoras de antígenos) (Noorchashm e cols., 2006). Os macrófagos do receptor podem fagocitar e apresentar antígenos derivados de células do enxerto, como as células endoteliais (Xu e cols., 2006). Adicionalmente, células dos túbulos proximais e endoteliais do próprio enxerto podem desempenhar esta função (Hagerty e Allen, 1993; Bagai e cols., 2005).

Além da apresentação dos antígenos, a ativação dos linfócitos T necessita de um segundo processo: a co-estimulação. A co-estimulação ocorre por meio da interação entre moléculas de superfície dos linfócitos T com moléculas de superfície das APCs. Os pares de moléculas mais estudados na superfície dos linfócitos T e das APCs são, respectivamente: CD28 e CD80/CD86 (B7-1 e B7-2), CD28 e CTLA4 (proteína associada a linfócitos T citotóxicos 4: *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), CD40 e CD154 (CD40L), ICOS (co-estimulador induzível: *inducible costimulator*) e ICOSL (ligante de co-estimulador induzível), OX40 (membro da superfamília dos receptores de fator de necrose tumoral) e OX40L (ligante de OX40), e CD27 e CD70 (Cornell e cols., 2008). Evidências oriundas de modelos experimentais de transplantes

cardíacos em camundongos, utilizando bloqueio das moléculas co-estimulatórias com anticorpos ou com deleção genética, têm demonstrado diminuição da ocorrência da rejeição aguda ao induzirem a deficiência de CD28, CD80/CD86, CD40 e CD154 (Shimizu e cols., 2000; Szot e cols., 2000; Bingaman e cols., 2001; Wang e cols., 2005).

As células efetoras mais importantes responsáveis pela lesão celular são os linfócitos T. Sua ação decorre da atividade citotóxica direta em células do parênquima renal (principalmente tubulares e endoteliais) e pela liberação local de citocinas. No primeiro mecanismo, linfócitos T CD8 ativados levam à morte celular por apoptose ao liberarem as proteínas perforina e granzimas A e B ou ao expressarem ligante de Fas (FasL: *Fas Ligand*), que se liga ao receptor Fas na célula-alvo. Ambas as vias levam ao desencadeamento da apoptose (Barry e Bleackley, 2002). No segundo mecanismo, são secretados os fatores de necrose tumoral alfa e beta (TNF: *tumoral necrosis factor*). Estes exercem sua atividade citotóxica ao ligar-se a seus receptores TNFR1 (TNFR1: *tumoral necrosis factor receptor 1*), expresso nas células endoteliais, e TNFR2 (TNFR2: *tumoral necrosis factor receptor 2*), expresso nas células tubulares. A ligação a tais receptores ativa as caspases e leva à apoptose (Al-Lamki e cols., 2001). Há ainda evidência acerca da participação de linfócitos T CD4 como células efetoras com potencial de mediar citotoxicidade restrita à classe II em resposta a antígenos menores (Zorn e cols., 2004).

1.1.3. Histopatologia

A alteração morfológica que define a TCMR aguda é constituída basicamente por infiltração celular contendo linfócitos, predominantemente T, e monócitos (infiltrado inflamatório mononuclear) e pode atingir os quatro componentes histológicos básicos do rim: glomérulos, túbulos, interstício e vasos (Gallon e cols., 2006; Moreso e

cols., 2007). A infiltração dos túbulos e do interstício constitui o quadro mais freqüente: o padrão túbulo-intersticial. O interstício, além de conter as células infiltrantes, comumente exibe edema e, em casos mais severos, pode apresentar hemorragia (Colvin e Nickleleit, 2007). Outros grupos celulares presentes neste compartimento têm sido descritos: plasmócitos, eosinófilos e mastócitos (Meehan e cols., 2001; Danilewicz e Wagrowska-Danilewicz, 2004; Desvaux e cols., 2004; Meleg-Smith e Gauthrier, 2005). A infiltração tubular ocorre quando as células inflamatórias ultrapassam a membrana basal tubular e depositam-se entre esta membrana e as células tubulares ou entre estas células, achado microscópico denominado de tubulite. A graduação da tubulite depende do número de células inflamatórias infiltrantes e da integridade ou da ocorrência de ruptura da membrana basal tubular. O acometimento vascular ocorre em duas formas básicas: a endarterite (infiltração celular da camada íntima da artéria) e a arterite transmural (infiltração celular das camadas íntima e média da artéria, com ou sem necrose fibrinóide). A endarterite é graduada de acordo com o grau de obstrução da luz do vaso ocasionada pelo infiltrado infamatório. Os glomérulos também podem ser acometidos por um espectro que varia desde infiltração mononuclear leve até alterações glomerulares severas, como a glomerulite do transplante ou glomerulopatia aguda do enxerto (Mihatsch e cols. 1995; Racusen e cols., 1999).

Atualmente, os padrões histopatológicos de TCMR aguda encontram-se categorizados de acordo com a classificação de Banff, a qual começou com uma reunião de patologistas, nefrologistas e cirurgiões na cidade de Banff, no Canadá, em 1991 e teve seu encontro mais recente em La Coruña, na Espanha, em 2007, e leva em consideração o setor afetado e a intensidade das alterações (Solez e cols., 1993; Solez e cols., 2008). Basicamente, existem cinco graus: IA, IB, IIA, IIB e III, os quais levam em consideração as alterações observadas no córtex renal. Nos graus IA e IB o

acometimento é somente intersticial e tubular, não podendo ocorrer infiltrado em artérias, devendo o infiltrado inflamatório intersticial comprometer no mínimo 10% do córtex renal examinado. A tubulite que define o grau IA, chamada t2, compreende mínimo de cinco e máximo de dez células inflamatórias por secção transversal de túbulo ou por grupo de dez células tubulares em corte longitudinal ou oblíquo. A tubulite que categoriza a grau IB, denominada t3, caracteriza-se por apresentar mais de dez células por secção transversal de túbulo ou por grupo de dez células tubulares em corte longitudinal ou oblíquo ou por exibir ruptura da membrana basal tubular. O diagnóstico dos graus IIA e IIB requer a presença de endarterite. Na endarterite do grau IIA, denominada v1, o infiltrado determina uma obstrução da luz da artéria acometida menor do que 25% do estimado. Já a endarterite do grau IIB, denominada v2, esta obstrução atinge ou ultrapassa os 25% da luz vascular. O grau III caracteriza-se por acometimento arterial no qual o infiltrado mononuclear ultrapassa a camada íntima e atinge a camada muscular e/ou determina necrose fibrinóide da parede do vaso. As alterações glomerulares, embora registradas, não entram na composição histopatológica que constitui a graduação da TCMR aguda. Nos casos nos quais não há arterite e as alterações intersticiais e tubulares estão presentes, mas não em intensidade suficiente para o diagnóstico de TCMR aguda IA, atribui-se o diagnóstico de “suspeito de rejeição” ou rejeição *borderline* (Racusen e cols., 1999; Solez e cols., 2008).

1.1.4. Aspectos Clínicos

O período de ocorrência da TCMR aguda situa-se, predominantemente, entre a primeira semana e o terceiro mês após o transplante, mas pode ocorrer a qualquer tempo. Clinicamente, manifesta-se por febre, hipertensão arterial, ganho de peso, aumento de volume do enxerto, dor local, diminuição do débito urinário e aumento da

creatinina sérica. Raramente, pode ocasionar síndrome nefrótica. Quando detectada apenas em biópsias protocolares, desacompanhada de quadro clínico correspondente, é denominada TCMR aguda subclínica. No primeiro episódio, emprega-se pulso de metilprednisolona ou, em quadros histopatológicos mais graves, anticorpo policlonal anti-CD3 ou anti-linfocítico (quadros histológicos mais graves), além de troca de imunossupressores (episódios repetidos de rejeição na vigência de níveis séricos adequados de fármacos) (Ahmad e cols., 2000; Gonçalves e cols., 2006).

1.2. Rejeição Mediada por Anticorpos Aguda

1.2.1. Epidemiologia

A recente definição sólida dos critérios da rejeição mediada por anticorpos (AMR: *acute antibody-mediated rejection*) aguda viabilizada pelas análises envolvendo o marcador C4d (fração do sistema complemento) limita o número de estudos acerca da real incidência deste tipo de rejeição aguda. Crespo e cols. (2001) relataram incidência de 7,7% nos três primeiros meses após o transplante em coorte de 232 indivíduos. Publicação dois anos posterior envolvendo 620 pacientes, em intervalo semelhante, registra incidência de 6,4% (Abe e cols., 2003). Rocha e cols. (2003) acompanharam 286 pacientes por tempo médio de 569 dias. Dezesesseis pacientes tiveram o diagnóstico de AMR aguda (incidência de 5,6%), sendo que em nove destes houve concomitância com TCMR aguda. Dois estudos apresentam dados com certa discrepância em relação a estes dados. Lorenz e cols. (2004), analisando 388 pacientes submetidos a biópsia renal por indicação clínica nos seis primeiros meses pós-transplante, observaram 17% de incidência. Estudo norte-americano reporta ocorrência em três casos dentre 184 (1,6%) (Bell e Walker, 2005). Os fatores de risco atribuídos a AMR aguda são sensibilização

prévia por transfusão sangüínea, gestação e transplante anterior, e o número de incompatibilidades HLA entre receptor e doador (maior de 2/6) (Takemoto e cols., 2004).

1.2.2. Fisiopatologia

A compreensão do mecanismo da AMR aguda representa um grande progresso no entendimento da fisiopatologia de distúrbios que acometem transplantes de órgãos sólidos. Este processo envolve antígenos específicos do doador, contra os quais são formados anticorpos específicos anti-doador (DSA: *donor-specific antibodies*), levando à constituição de complexos antígeno-anticorpo e culminando com a ativação do complemento e a conseqüente lesão tecidual (Truong e cols., 2007).

Os antígenos desencadeadores do processo podem ser aloantígenos ou auto-antígenos. Dentre os aloantígenos, os mais freqüentemente envolvidos são os pertencentes às classes I e II do MHC. Apesar de serem constitutivamente encontrados no enxerto renal, determinados fatores, como a presença de citocinas, podem determinar sua maior expressão e desencadear a rejeição (Iniotaki-Theodoraki e cols., 2003; Segerer e cols. 2003). Outros aloantígenos implicados são os antígenos do sistema sangüíneo ABO e antígenos endoteliais polimórficos (Montgomery e cols., 2004; Mizutani e cols., 2005). Citam-se, como auto-antígenos, a vimentina e o receptor de tipo I da angiotensina II (Carter e cols., 2005; Dragun e cols. 2005). Postula-se que a formação dos anticorpos ocorreria por duas vias. Em uma delas, os antígenos migrariam independentemente ou seriam carregados por APCs até os órgãos linfóides, sendo lá apresentados a linfócitos B. Os linfócitos B maturariam a plasmócitos, estes com a capacidade de secreção de anticorpos. Em outra via, a apresentação dos antígenos ocorreria no próprio enxerto (Lakkis, 2003).

O mecanismo efetor da lesão celular deve-se à ativação da via clássica do sistema complemento causada pela formação de complexos antígeno-anticorpo. Os efeitos são: quimiotaxia e ativação de neutrófilos e macrófagos, apoptose de células parenquimatosas, fagocitose, ativação de linfócitos B, vasoespasmos, edema, maior expressão de moléculas de adesão no endotélio e trombose intravascular (Truong e cols., 2007).

1.2.3. Histopatologia

Muitos dos estudos que relatam os achados histopatológicos encontrados em biópsias de casos de AMR aguda correlacionaram a morfologia à presença de DSAs séricos e/ou à positividade do C4d na biópsia. À semelhança da TCMR aguda, a AMR aguda pode afetar os quatro compartimentos do parênquima renal (Böhmgig e Regele, 2003). As variáveis histopatológicas correlacionadas com a presença de DSAs contra antígenos da classe I são: glomerulite, arterite (em geral), arterite severa (em particular), áreas de infarto, trombose capilar glomerular e peritubular, dilatação de capilares peritubulares e presença de neutrófilos em capilares peritubulares (Trpkov e cols., 1996; Fahim e cols., 2007).

As dificuldades iniciais da correta identificação dos casos de AMR aguda deviam-se à falta de um marcador imunopatológico específico, o que fez, durante muito tempo, com que não houvesse uma uniformidade no diagnóstico e na classificação dos casos de AMR aguda. O advento da identificação dos depósitos de C4d trouxe grande contribuição para a solução deste problema. O C4d é um produto da degradação do fator C4 ativado do complemento, um componente da via clássica de ativação da cascata do complemento, tipicamente iniciada pela ligação de anticorpos a moléculas específicas. Seguindo a ativação e a degradação da molécula C4, grupos tio-éster são expostos, o

que permite a ligação covalente do C4d à superfície e a vacúolos intracitoplasmáticos das células endoteliais e a membranas basais vasculares. A positividade para o marcador em capilares peritubulares tem se mostrado específica para as alterações observadas no parênquima renal transplantado, sendo pouco detectada em afecções de rim nativo (Böhmgig e cols., 2002; Nickeleit e Mihatsch, 2003). A positividade difusa de C4d em capilares peritubulares, utilizando microscopia com imunofluorescência, tem sido associada a: detecção de DSAs, glomerulite, arterite (podendo ser acompanhada por necrose fibrinóide arterial), presença de neutrófilos em capilares peritubulares, tubulite neutrofílica, dano tubular agudo (adelgaçamento citoplasmático, dilatação tubular, perda da “borda em escova”, ruptura da membrana basal, apoptose e proliferação aumentada) e necrose glomerular, além de ser mais freqüente em biópsias motivadas por disfunção do enxerto, em comparação às taxas observadas em biópsias protocolares (Mauiyyedi e cols. 2002; Nickeleit e cols., 2002; Mengel e cols., 2005). O interstício pode exibir edema, infiltrado inflamatório mononuclear, infiltração neutrofílica, plasmócitos e macrófagos (Desvaux e cols., 2004). As artérias podem ainda exibir espessamento intimal fibromixóide. Adicionalmente, podem ser observadas, concomitantemente, alterações diagnósticas de TCMR aguda e manifestações morfológicas de dano crônico (Truong e cols., 2007).

Estudos clínico-patológicos como os acima referidos forneceram a base para o estabelecimento recente dos critérios para o diagnóstico desta variedade de rejeição aguda. A tríade diagnóstica inclui os achados histopatológicos observados na biópsia, a evidência imunopatológica e a presença de anticorpos anti-doador séricos (contra HLA ou contra outros antígenos endoteliais do doador). As alterações histopatológicas incluem dano tubular agudo, presença de neutrófilos e/ou células mononucleares em capilares peritubulares, trombose capilar e arterite (arterite transmural e/ou arterite com

necrose fibrinóide). O principal critério imunopatológico consiste na positividade do C4d em capilares peritubulares, utilizando-se imunofluorescência ou imunoistoquímica. Alternativamente, consideram-se a deposição de imunoglobulina em capilares peritubulares e a presença de imunoglobulina(s) e fração(ões) do complemento em necrose fibrinóide arterial. Nos casos nos quais a biópsia contempla padrão histopatológico requerido, mas um dos outros dois critérios não é preenchido, recomenda-se o diagnóstico de “suspeito” de AMR aguda. Adicionalmente, classifica-se a rejeição de acordo com o padrão histopatológico nos graus I, caracterizado por dano tubular agudo; II, definido por glomerulite e/ou pela presença de leucócitos e/ou trombos em capilares peritubulares e/ou glomerulares; e III, com arterite transmural e/ou arterite com necrose fibrinóide (Racusen e cols., 2003).

1.2.4 Aspectos Clínicos

As manifestações clínicas são inespecíficas e não-diagnósticas, constituindo-se de características de lesão aguda do enxerto como oligúria, deterioração rápida da função renal sem proteinúria ou com proteinúria leve, freqüentemente resistente a alternativas terapêuticas tradicionais. Tipicamente ocorre pouco tempo após o transplante, mas pode ser identificada posteriormente, particularmente em contextos de imunossupressão diminuída ou de falta de adesão ao tratamento (Takemoto e cols., 2004; Truong e cols., 2007). A AMR aguda também pode ser subclínica. Koo e cols. (2004) identificaram quatro pacientes (8,5%) preenchendo os critérios sorológico, histopatológico e imunopatológico, dentre 48 transplantados por meio de biópsias protocolares e amostragens séricas efetuadas aos sete dias pós-transplante. O tratamento da AMR aguda contempla aspectos do evento imunológico como a concomitância com TCMR aguda, dessensibilização, inibição de DSAs, depleção de linfócitos B e redução

de plasmócitos e seus precursores. As possibilidades terapêuticas incluem imunoglobulina intravenosa, plasmaferese, globulina hiper-imune de citomegalovírus de baixa dose, anticorpo anti-CD20 e esplenectomia (Montgomery e cols., 2004; Takemoto e cols., 2004).

1.3. Alterações Crônicas do Enxerto Renal

1.3.1. Definições

As alterações crônicas que acometem o rim transplantado constituem a segunda maior causa de perda de enxerto renal, sendo superada apenas pelo óbito do paciente (Paul, 1995). Clinicamente, estas alterações crônicas manifestam-se como disfunção crônica do enxerto renal, que se caracteriza pela diminuição progressiva da taxa de filtração glomerular, podendo ou não ser acompanhada de hipertensão e proteinúria (Chapman e cols., 2005). Os achados histopatológicos mais frequentemente associados a este quadro são a atrofia tubular e a fibrose intersticial, acompanhados ou não de espessamento fibrointimal de artérias e de glomeruloesclerose (Joosten e cols., 2003). Até recentemente, convencionava-se denominar estes comemorativos histológicos como “nefropatia crônica do enxerto” (“CAN”: “*chronic allograft nephropathy*”), mas este termo está sendo removido das classificações clínico-patológicas mais recentes (Solez e cols., 2007, Solez e cols., 2008). Os graus mais acentuados destas alterações morfológicas crônicas associam-se à menor sobrevida do enxerto (Freese e cols., 2001).

1.3.2. Epidemiologia

A prevalência de alterações histopatológicas características de dano crônico ao enxerto renal (para as quais muitos autores utilizaram o termo “CAN”) varia entre os

estudos, mas é caracteristicamente alta em longos seguimentos. Levantamento realizado em Hannover (Alemanha) detectou a presença de “CAN” em aproximadamente 30% dos pacientes aos seis meses pós-transplante (Schwartz e cols., 2005). Em trabalho francês a taxa ficou em 25% aos três meses e em 50% aos dois anos, em pacientes transplantados com rim de doador falecido (Legendre e cols., 1998). Em ensaio clínico norte-americano, as taxas, aos dois anos após o transplante, ficaram em 72,3% no grupo utilizando ciclosporina e 62,0% no grupo utilizando tacrolimus (Solez e cols., 1998). Em seguimento mais prolongado, estudo de grupo australiano acompanhando prospectivamente 120 pacientes e analisando 959 biópsias (808 protocolares e 151 por indicação clínica) demonstrou uma prevalência de “CAN” de 58,4% ao final de dez anos pós-transplante (Nankivell e cols., 2003).

Os fatores de risco associados ao dano crônico ao enxerto renal incluem preditores imunológicos e não imunológicos. No primeiro grupo, encontram-se grau de incompatibilidade HLA, ocorrência de episódios de rejeição aguda, rejeição crônica, imunossupressão inadequada e presença de DSAs pré-transplante ou formados após o transplante. No segundo grupo, são incluídos tempos de isquemia fria e quente, infecções virais, idade e sexo do doador e do receptor, causa do óbito do doador, etnia, doença renal recorrente e toxicidade farmacológica (Bellos e cols., 2005).

1.3.3. Fisiopatologia

O dano crônico ao enxerto renal é mediado por uma série de fatores agressores como rejeição crônica, inflamação persistente, desequilíbrios estruturais, isquemia, senescência replicativa, transição epitélio-mesenquimal e outros agentes causadores de lesão. Estes fatores lesivos levam a dano histológico e funcional cumulativo aos quatro

grandes compartimentos do rim transplantado (interstício, túbulos, glomérulos e vasos) (Nankivell e Chapman, 2006).

Processos independentes de reconhecimento imunológico de aloantígenos, os quais colaboram para a ocorrência de rejeição crônica, podem envolver fatores presentes antes e logo após o transplante. A morte encefálica e a isquemia-reperfusão induzem e ampliam a resposta imunológica por meio de produção de espécies reativas de oxigênio, mediadores pró-inflamatórios, fatores de crescimento e expressão aumentada de moléculas de adesão e de antígenos HLA das classes I e II (Szabo e Heeman, 1998; Takada e cols., 1998; Pratschke e cols., 2001). A morte encefálica causa maior expressão de selectinas no endotélio, com subsequente adesão leucocitária (Gasser e cols., 2002). O processo de isquemia-reperfusão decorrente da anastomose do enxerto leva à produção das interleucinas 12 e 18 (IL-12 e IL-18), as quais estimulam a secreção de interferon-gama (INF- γ), que, por sua vez, induz maior expressão de antígenos HLA das classes I e II (Daemen e cols., 1999). O endotélio torna-se reativo e há ativação de moléculas co-estimulatórias, o que facilita a ativação de linfócitos T (Szabo e cols., 1998; Pratschke e cols., 2001). As células tubulares podem sofrer apoptose desencadeada pela presença das espécies reativas do oxigênio (Chien e cols., 2001; Daemen e cols., 2002). Todo este processo resulta em recrutamento de células inflamatórias e amplificação da resposta imunológica não exclusivamente dependente de aloantígenos, colaborando para a gênese do dano crônico do enxerto renal e suas alterações histopatológicas correspondentes (Azuma e cols., 1996; Penfield e cols., 1999; Dragun e cols., 2000).

A resposta imunológica celular desencadeada por aloantígenos tem participação ativa na fisiopatologia da rejeição crônica. Após o transplante, o mecanismo de apresentação de antígenos mais relevante é o indireto, o que resulta na ativação de

linfócitos CD4, principalmente a população Th2 (Th2: *T-helper 2*) (Sayegh, 1999; Womer e cols., 2001; Allan e Madsen, 2002). As vias co-estimulatórias CD28-B7 e CD40-CD154 também colaboram nesta ativação de linfócitos envolvidos na rejeição crônica (Laskowski e cols., 2002; Yamada e Sayegh, 2002). Esta derivação para o ramo Th2 é influenciada por fatores como as propriedades dos antígenos, o tipo de APC, o compartimento histológico e as citocinas presentes (Le Moine e cols., 2002). A interleucina-4 (IL-4), quando presente, induz a maior diferenciação em Th2 (Leitenberg e cols., 1999). Enxertos acometidos por rejeição crônica expressam predominantemente citocinas relacionadas a linfócitos T CD4 Th2, como TGF- β , interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e a própria IL-4 (Suthanthiran, 1997; Hamar e cols., 2001). A resposta Th2 leva à fibrose no enxerto renal, devido à deposição de matriz extracelular, decorrente deste perfil de citocinas, pois o TGF- β e a IL-4 levam à maior produção de matriz extracelular (Ruger e cols., 2000). Estes dois mediadores juntamente com a IL-10 inibem a síntese de metaloproteinases e estimulam a produção dos inibidores destas enzimas, favorecendo ainda mais a ocorrência de fibrose (Vaillant e cols., 2001).

A formação de aloanticorpos está claramente associada à rejeição crônica (Terasaki, 2003 e 2008). A presença de anticorpos anti-HLA confere risco cinco ou seis vezes maior de rejeição crônica (Abe e cols., 1997; Piazza e cols., 2001). A ligação destes anticorpos a células endoteliais e a células musculares lisas pode levar à expressão aumentada de fatores de crescimento e seus receptores e à maior taxa de proliferação. Isto resulta em alterações histopatológicas características da rejeição crônica como a arteriopatia do transplante (Harris e cols., 1997; Bian e cols., 1998).

Os episódios sucessivos de dano agudo ao enxerto renal podem ser seguidos por resolução incompleta do processo inflamatório. A persistência de infiltrado inflamatório crônico em áreas de fibrose (“fibrose ativada”) acompanhada de rejeição subclínica

associa-se a perda funcional e a diminuição da sobrevida do enxerto (Croker e cols., 1996; Nankivell e cols., 2004a e b).

A lesão inflamatória tubular leva à perda da integridade da membrana basal tubular, fibrose obliterativa local, alterações de permeabilidade e dano estrutural (Bonsib e cols., 2000). A lesão tubular pode causar desequilíbrios estruturais significativos no enxerto renal. Alterações tubulares resultantes de dano tubular agudo, apoptose, atrofia tubular ou obstrução podem levar à formação de glomérulos atubulares devido à desconexão entre glomérulos e túbulos e entre os túbulos em seus diferentes níveis, o que leva ao funcionamento inadequado (Kriz e cols., 2001).

A isquemia cortical resulta de obstrução vascular causada por diferentes agentes, como eventos imunológicos e tóxicos. Alterações vasculares relacionadas à rejeição crônica mediada por anticorpos, como oclusão de capilares peritubulares, espessamento fibrointimal de artérias e alterações glomerulares crônicas relacionam-se à severidade do dano túbulo-intersticial (Ishii e cols., 2005). Imunossupressores como a ciclosporina podem levar tanto a dano estrutural de vasos (hialinose arteriolar) quanto a distúrbio funcional (vasoconstrição) (Nankivell e cols., 2004d).

A senescência replicativa (envelhecimento e exaustão celulares acelerados induzidos por estresse) tem sido implicada na causação do dano crônico ao enxerto renal. As células somáticas em cultura cessam de entrar no ciclo celular após um determinado número de divisões (o limite Hayflick). Na espécie humana este controle é efetuado pelos telômeros, os quais são repetições de DNA nas terminações dos cromossomos que se tornam mais curtos após cada divisão. A perda dos telômeros leva a instabilidade genômica, senescência replicativa e morte celular. Esta seqüência pode ser impedida pela enzima telomerase. Telômeros encurtados (os quais tornam as populações celulares mais suscetíveis à senescência replicativa) têm sido observados em

rins nativos e transplantados mais velhos e em enxertos com “CAN” (Ferlicot e cols., 2003).

O fenômeno da transição epitélio-mesenquimal também colabora para o estabelecimento da fibrose no enxerto. A lesão tubular acarreta perda da adesão intercelular e desencadeia uma seqüência de alterações na composição das células tubulares. A perda de zônulas de oclusão, zônulas de adesão, desmossomos e moléculas de E-caderina dos túbulos é seguida por formação de fibras de F-actina, actina-alfa de músculo liso, filopódios e lamelopódios. O processo culmina na transformação das células epiteliais tubulares em miofibroblastos, influenciados por TGF- β 1, dano hipóxico e interleucina-1 (IL-1). Ocorre a ruptura da membrana basal mediada por metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e as células modificadas migram para o interstício, onde produzem e depositam matriz extracelular (Nicholson e cols., 2002; Liu, 2004; Djamali e cols., 2005; Vongwiwatana e cols., 2005).

Outros agentes associados com lesão têm sido implicados na gênese do dano crônico. Dentre estes se citam hiperfiltração, proteinúria, hipertensão, tabagismo, hiperlipidemia, espécies reativas do oxigênio, citocinas e infecção por poliomavírus (Fernandez-Miranda e cols., 1997; Lipman e cols., 1998; Opelz e cols., 1998; Albrecht e cols., 2002; Fernandez-Fresnedo e cols., 2004; Mannon, 2004; Nankivell e cols., 2004b).

1.3.4. Classificação

A classificação das alterações crônicas do enxerto renal é efetuada tendo como base o quadro histopatológico, associado a dados clínicos e laboratoriais. Esta classificação, assim como os termos que a compõe, tem sofrido modificações bastante significativas nos últimos anos. O termo “nefropatia crônica do enxerto” foi cunhado

em 1991 em reuniões científicas da primeira classificação de Banff. A intenção foi criar uma expressão mais genérica, como tentativa de debelar a tendência da época de atribuir aos processos de rejeição crônica todos os casos nos quais a biópsia revelava achados de cronicidade. O diagnóstico baseava-se na ocorrência de fibrose intersticial e atrofia tubular, acompanhadas ou não por alterações vasculares e glomerulares. A sua graduação tinha um caráter totalmente semiquantitativo, atribuindo os graus I (leve), II (moderado) e III (severo), tomando-se como referência a intensidade dos achados intersticiais e tubulares (Solez e cols., 1993; Solez e cols., 1996). Posteriormente, nas reuniões ocorridas em 1997, lançaram-se bases mais objetivas para a graduação da “CAN” e convencionou-se dividi-la em duas categorias qualitativas de acordo com a presença ou não de achados morfológicos sugestivos de rejeição crônica. A “CAN” grau I compreendia comprometimento de até 25% do córtex renal; o grau II, acometimento de 26% a 50% do córtex renal; e o grau III, envolvimento de mais de 50% do córtex renal. Qualitativamente, a “CAN” poderia ser classificada em “a” (sem alterações morfológicas sugestivas de rejeição crônica) ou “b” (com alterações morfológicas sugestivas de rejeição crônica). As alterações morfológicas sugestivas de rejeição crônica eram a glomerulopatia do transplante (vide adiante) e o espessamento fibroso intimal de artérias (Racusen e cols., 1999; Chapman e cols., 2005).

No entanto, evidências mais recentes associaram características histopatológicas e a positividade do C4d (detectada por imunofluorescência e/ou imunistoquímica) entre si e à presença de DSAs. Estes dados possibilitaram a classificação de casos com alterações crônicas como rejeição mediada por anticorpos crônica, rejeição mediada por linfócitos T crônica e outras formas de agressão ao enxerto, não resultantes de rejeição. Além da arteriopatia do transplante (já há mais tempo estudada), outros dois achados histopatológicos têm sido mais intensamente estudados: a glomerulopatia do transplante

(TG: *transplant glomerulopathy*) e a multilaminação da membrana basal dos capilares peritubulares (PTCBMML: *peritubular capillary basement membrane multilayering*) (Solez e cols., 2007).

A TG, também denominada glomerulopatia do enxerto ou glomerulopatia crônica do enxerto, caracteriza-se pela reduplicação da membrana basal glomerular devida a um alargamento do espaço subendotelial associado a aumento da matriz mesangial e de células mesangiais, tendo, portanto, grande similaridade com a glomerulonefrite membranoproliferativa. A TG diferencia-se deste padrão de glomerulopatia por não apresentar deposição de C3 à imunofluorescência e por exibir depósitos elétron-lucentes à microscopia eletrônica (Habib e cols., 1993; Andresdotirr e cols., 1998). Epidemiologicamente, a TG tem como fatores de risco a presença de aloanticorpos pós-transplante e episódio de rejeição aguda três meses após o transplante (Sijpkens e cols., 2004). É detectada em 4,0% dos transplantes em um ano pós-transplante e atinge 20,2% a 41,1% após cinco anos (Nankivell e cols., 2004c; Gloor e cols., 2007; Cosio e cols., 2008). Clinicamente, caracteriza-se por hipertensão, perda de função renal e proteinúria. A proteinúria pode atingir níveis nefróticos e levar à síndrome nefrótica. Poucos casos manifestam hematúria microscópica (Vongwiwatana e cols., 2004). Mauiyyedi e cols. (2001), analisando grupo 38 pacientes transplantados, identificaram TG em 61% dos casos com C4d positivo e em 50% dos casos C4d negativo. No entanto esta diferença percentual de 11% não atingiu significado estatístico. Houve forte associação entre a positividade de C4d e a presença de anticorpos séricos anti-HLA do doador. Estudo austríaco posterior alocando 213 biópsias de 213 pacientes colhidas após um ano de transplante (média de 4,9 anos pós-transplante), detectou TG em 53% dos casos C4d positivos e em 14% dos casos C4d negativos, dado que alcançou significado estatístico ($P < 0,0001$). No mesmo estudo,

observou-se a evolução para TG em biópsias posteriores em 82% dos casos com biópsias iniciais C4d positivas, porém sem este achado histopatológico. Nos casos com biópsias iniciais C4d negativas, 27% destes evoluíram para TG. Este dado foi estatisticamente significativo e demonstrou associação entre biópsia C4d positiva e TG posterior (Regele e cols., 2002). Em pacientes pediátricos a TG também tem sido associada à positividade de C4d e de DSAs (Herman e cols., 2005). A TG relaciona-se ainda com a presença de anticorpos anti-HLA de classe II, com a elevação destes anticorpos e com menor sobrevida do enxerto (Issa e cols., 2008).

A PTCBMML é definida, com a utilização da microscopia eletrônica, pelo acúmulo de camadas na membrana basal dos capilares peritubulares, com rupturas freqüentes e geralmente sem fibras de colágeno e tem sido associada à rejeição crônica e à “CAN”, em comparação a outros grupos de pacientes (Iványi e cols., 2000, Kiyici e cols., 2003). Estudo efetuado no Japão detectou associação significativa entre a maior espessura dos capilares peritubulares com “CAN” com alterações morfológicas sugestivas de rejeição crônica (“CAN” b) (Aita e cols., 2007). Regele e cols. (2002) relataram forte associação da PTCBMML não somente com positividade para C4d, mas também com a presença de TG.

Este acúmulo de evidências levou a uma mudança na classificação do dano crônico do enxerto renal e uma proposição de eliminação do termo “CAN”. Foram definidos os critérios para a rejeição mediada por anticorpos crônica ativa e da rejeição mediada por linfócitos T crônica ativa. Para a primeira categoria diagnóstica, devem estar presentes achados histopatológicos (arteriopatia do transplante e/ou TG e/ou PTCBMML e/ou atrofia tubular com fibrose intersticial), positividade de C4d e de DSAs séricos. Se os achados morfológicos forem acompanhados da positividade de C4d, sem a detecção de DSAs séricos ou, forem acompanhados de DSAs, sem a

positividade de C4d, recomenda-se o diagnóstico de “sugestivo de rejeição mediada por anticorpos crônica ativa”. A rejeição mediada por linfócitos T crônica ativa tem sua definição na presença do critério histopatológico da denominada “arteriopatia crônica do enxerto”, definida por formação de neointima e fibrose intimal com infiltração inflamatória mononuclear em artéria(s). Houve também o reforço da recomendação do diagnóstico diferencial com outras entidades como toxicidade por imunossupressores, infecção por poliomavírus, alterações induzidas por hipertensão arterial, obstrução crônica, dentre outras. Para os casos com fibrose intersticial e atrofia tubular desacompanhadas de outros critérios morfológicos, imunopatológicos e imunológicos que permitam esta distinção, convencionou-se designá-los como fibrose intersticial e atrofia tubular, sem evidência de etiologia específica (Solez e cols., 2007; Solez e cols., 2008).

Adicionalmente, há esforços para o desenvolvimento de técnicas mais precisas de quantificação do dano crônico, enfatizando a fibrose intersticial. Em análises computadorizadas de imagem medindo o volume de fibrose intersticial cortical fracionado (V_{IntFib}), com a utilização da técnica de picrossírius, maiores índices de fibrose intersticial foram correlacionados com menor tempo para perda de enxerto, ao serem utilizadas biópsias protocolares aos seis meses pós-transplante de pacientes adultos (Grim e cols., 2003). Outro estudo, alocando biópsias de indicação clínica de pacientes pediátricos, também utilizando a técnica de picrossírius e aferindo o V_{IntFib} , demonstrou piora da função renal dois anos após a biópsia em 93% dos pacientes quando o V_{IntFib} foi superior a 10%. Houve melhora da função renal em 82% dos pacientes no mesmo período com V_{IntFib} inferior a 5% (Pape e cols., 2003). Por fim, há a referência de maior percentual da extensão de coloração com método a base de prata (PAMS: *periodic acid methenamine stain*), utilizando-se análise digital de imagem,

associar-se com maiores índices de fibrose intersticial e de atrofia tubular e correlação com maiores níveis de creatinina sérica após três meses (Sarioglu e cols., 2006).

1.4. Impacto da Rejeição Aguda

Apesar do declínio na incidência dos episódios de rejeição aguda em transplantados renais e da melhora da sobrevida observadas nas últimas décadas, a rejeição aguda continua tendo impacto negativo nestes pacientes. Considerável número de estudos tem fornecido evidências acerca deste impacto. Estes estudos enfocam principalmente a TCMR aguda e avaliam a influência do evento imunológico sobre desfechos como função renal em determinados intervalos após o transplante, associação com alterações morfológicas crônicas (notadamente a “CAN” e a rejeição crônica) e sobrevida do enxerto, além de outros dados prognósticos. O estabelecimento recente dos critérios para AMR aguda limita o número de publicações acerca do impacto desta, formalmente diagnosticada, sobre desfechos, apesar da crescente disponibilidade de evidências associando prognóstico desfavorável aos fenômenos imunológicos mediados por anticorpos, principalmente por meio da positividade do C4d. Devido a este fato, rejeição aguda, sem outras especificações, na maior parte dos estudos citados nesta seção, refere-se à TCMR aguda. (Hariharan e cols., 2000; Ponticelli, 2004; Tantravahi e cols., 2007).

1.4.1. Impacto Sobre a Função do Enxerto

Nickerson e cols. (1998) estudando 71 pacientes, dos quais 65 com enxerto de doador falecido, analisaram os fatores determinantes de aumento de creatinina sérica elevada medida aos dois anos após o transplante. Estes pacientes foram monitorizados com biópsias protocolares efetuadas em um, dois, três, seis e doze meses pós-

transplante. Dentre as variáveis associadas a maiores níveis de creatinina sérica aos dois anos após o transplante, destacaram-se a presença de episódio de rejeição aguda, a intensidade histológica da rejeição e o número de episódios.

Outra forma encontrada na literatura para verificar o impacto da rejeição aguda sobre a função do enxerto é a divisão dos pacientes em quartis de acordo com os seus níveis séricos de creatinina. Análise de 1.389 transplantados constatou que o quartil mais alto de creatinina sérica (aquele com a pior função do enxerto) após um e três anos de transplante apresentava associação com rejeição aguda no primeiro ano (Paraskevas e cols., 2006).

1.4.2. Associação com Alterações Histopatológicas Crônicas

Estudo espanhol com biópsias protocolares efetuadas entre dois e cinco meses em 98 transplantados de doador falecido detectou “CAN” em 41 pacientes. A análise retrospectiva nestes casos qualificou rejeição aguda prévia como fator de risco independente para “CAN” (Serón e cols., 1997). No entanto, além da simples ocorrência de rejeição, algumas características da mesma influenciam sobre a sua associação com alterações histopatológicas crônicas. Massy e cols. (1996) associaram episódios de rejeição aguda clinicamente manifesta com rejeição crônica, particularmente os episódios mais severos, de repetição e ocorridos após os três meses de transplante. Episódios ocorridos antes deste período não se associaram, de modo estatisticamente significativo, à rejeição crônica. Eventos ocorridos após os dois anos de transplantes atingiram o maior risco relativo (RR) para rejeição crônica (RR = 10,47). Ashraf e cols. (1998) analisaram a influência do momento de ocorrência da rejeição aguda e a sua resposta à terapêutica sobre a ocorrência CAN, em um seguimento mínimo de cinco anos. Cerca de 53% dos pacientes com rejeição aguda ocorrida dois meses após o

transplante tiveram diagnóstico de “CAN”, em comparação com a taxa de pouco mais de 17% nos pacientes sem esta ocorrência ou com rejeição antes de dois meses (diferença estatisticamente significativa). A “CAN” associou-se aos casos parcialmente responsivos à terapêutica de primeira linha e nos casos com necessidade de terapêutica complementar. Esta associação não ocorreu nos casos totalmente responsivos à terapêutica.

A ocorrência de rejeição aguda também tem demonstrado impacto em algumas situações particulares. Enxertos de doadores com idade mais avançada apresentam maior suscetibilidade de desenvolver “CAN”. Dentre os fatores de risco para “CAN” nestes pacientes, está o risco aumentado para rejeição aguda, além de menor volume de parênquima, maior suscetibilidade à nefrotoxicidade devida a imunossuppressores, incidência aumentada de função retardada do enxerto e hipertensão arterial (Arns e cols., 2007). A relação entre rejeição aguda e alterações morfológicas crônicas tem sido observada no contexto da falta de adequada adesão ao tratamento. Trabalho belga comparando características de biópsias detectou maior incidência de rejeição aguda entre pacientes considerados não-aderentes. Comparando biópsias com rejeição aguda nos grupos com adesão adequada ao tratamento e sem adesão adequada ao tratamento quanto ao grau de atrofia tubular e à avaliação histomorfométrica da fibrose intersticial, verificaram-se níveis significativamente mais elevados de ambos achados no segundo grupo (Lerut e cols., 2007).

Outras publicações têm abordado o impacto da rejeição subclínica sobre o enxerto. Nankivell e cols. (2003) observaram a associação da progressão e da severidade das alterações histopatológicas crônicas com a presença de rejeição subclínica. Nesta coorte, 114 pacientes tiveram duas biópsias disponíveis entre um mês e doze meses após o transplante. Dentre estes, 44,4% dos que tiveram uma biópsia

inicial de rejeição aguda apresentaram graus de lesão crônica sucessivamente mais altos. Esta taxa foi de 34,1% para os indivíduos “suspeitos de rejeição” (ou rejeição *borderline*) e 29,6% para os transplantados sem estes achados histopatológicos. Ao final do primeiro ano, “CAN” moderada (grau II) foi encontrada em 25,6% das biópsias com rejeição subclínica e em 7,5% das biópsias sem este achado ($P < 0,05$).

A indução de maior expressão de mediadores pró-fibróticos, destacadamente o TGF- β , durante eventos imunológicos agudos tem sido considerada fator essencial para esta relação entre rejeição aguda e o dano crônico ao enxerto renal (Shihab e cols. 1995). No entanto, há evidências do papel causal da rejeição aguda no desenvolvimento do dano crônico do enxerto renal mesmo sem a expressão destes mediadores. Baboolal e cols. (2002) demonstraram a associação entre a ocorrência de fibrose intersticial em biópsias protocolares aos três, seis e doze meses após o transplante com rejeição aguda prévia e com a expressão aumentada de fatores pró-fibróticos (TGF- β , trombospondina-1 e fibronectina). Entretanto, não houve relação entre a ocorrência de rejeição aguda e a expressão aumentada destes fatores pró-fibróticos. Os autores aventaram a possibilidade da existência de uma via alternativa que pudesse explicar tal achado.

1.4.3. Impacto na Sobrevida do Enxerto

Análise de fatores associados com menor sobrevida do enxerto em 729 transplantes de doadores falecidos entre 1985 e 1997 elencou a ocorrência de rejeição aguda como um dos fatores relacionados à menor sobrevida do enxerto (Cantarovich e cols., 2001). Estudo envolvendo tanto transplantados de doadores falecidos quanto de doadores vivos avaliou o papel da presença de episódios de rejeição aguda na sobrevida do enxerto aos cinco anos pós-transplante. No primeiro grupo, a sobrevida foi de 88% para os casos sem história de rejeição aguda e de 40% com história de rejeição aguda.

No segundo grupo, estas taxas foram, respectivamente, de 90% e 73%. Houve diferença estatística em ambos os grupos (Knight e cols., 2001).

Apesar da diminuição contínua da incidência de rejeição aguda ao longo dos anos, ainda há associação desta com a falência do rim transplantado. Levantamento feito na Espanha alocando 3.365 pacientes transplantados nos anos de 1990, 1994 e 1998 registrou significativa redução na incidência de rejeição aguda. Entretanto, a ocorrência de rejeição aguda continuou fortemente associada à falência do enxerto, representando um risco de magnitude equivalente nos três anos estudados (Pallardó e cols., 2004).

Mesmo ocorrências consideradas de menor risco, como episódios responsivos a corticosteróides e os ocorridos em curtos intervalos após o transplante, podem ter influência na sobrevida do enxerto. Estudo analisando rejeição aguda com estas características não demonstrou impacto destes eventos nos dois primeiros anos. No entanto, a partir do terceiro ano, estas ocorrências mostraram influência significativa e as taxas de sobrevida do enxerto também entraram em declínio (Kyllönen e cols., 2000).

Por fim, esta influência também foi detectada por Sezer e cols. (2003) em casos com “CAN” já estabelecida. Foram observadas maior perda de enxerto quando estes pacientes portadores de “CAN” foram acometidos por rejeição aguda diagnosticada após um ano de transplante.

1.4.4. Impacto Sobre Outros Desfechos

Além destes desfechos mais difundidos e estudados, há associação de rejeição aguda com outros dois tipos de desfechos. O óbito com enxerto funcionante (DWGF: *death with graft function*) é importante causa de perda de enxerto e ocorre em 9% a 30% dos pacientes em diferentes séries. Suas principais causas são eventos cardiovasculares, infecções, acidentes vasculares encefálicos e neoplasias malignas, além de causas

desconhecidas. Estudo de 7.040 casos de DWGF em pacientes transplantados entre 1988 e 1997, identificou rejeição aguda como fator de risco independente para este tipo de evento. Outros fatores relacionados foram receptor caucasiano, idade ao transplante, hipertensão ou *diabetes mellitus* como causa da insuficiência renal terminal, duração da diálise pré-transplante, disfunção prolongada do enxerto, reatividade contra painel superior a 30% e algumas características do doador (afro-descendência, idade superior a 45 anos e doença cérebro-vascular como causa do óbito) (Ojo e cols., 2000a). Outro desfecho importante é o óbito após a perda de enxerto (DAGL: *death after graft loss*), pois a taxa de mortalidade é cerca de três vezes superior nos pacientes transplantados sem enxerto funcional, em comparação aos pacientes com enxerto funcional. Análise da base de dados referente a transplantes efetuados entre 1988 e 1998, com seguimento de um ano, associou este evento à ocorrência de rejeição aguda, bem como de infecção, trombose e duração da diálise pré-transplante superior a dois anos (Kaplan e Meier-Kriesche, 2002).

1.4.5. Impacto da Rejeição Mediada por Anticorpos Aguda

À semelhança da TCMR aguda, a AMR aguda também tem mostrado impacto negativo sobre os desfechos no transplante renal. Um dos primeiros estudos englobando a tríade diagnóstica da AMR aguda (positividade de DSAs, achados histopatológicos compatíveis e positividade do C4d) constatou maior resistência à terapêutica empregada e menor sobrevida do enxerto aos seis meses pós-transplante (Crespo e cols., 2001). Lefaucheur e cols. (2007), examinando casos de TCMR aguda e casos de AMR aguda, observaram, no segundo grupo, maiores níveis de creatinina sérica e menor sobrevida do enxerto em acompanhamento médio de trinta meses.

1.5. Sistemas de Classificação da Rejeição ao Enxerto Renal

Dentre os sistemas de avaliação referentes à patologia do transplante renal existentes, o mais utilizado e internacionalmente difundido é a Classificação de Banff. Este sistema é mantido por um grupo que define e padroniza a interpretação das biópsias dos órgãos transplantados (não apenas o rim), tendo como objetivo a uniformidade no diagnóstico histopatológico dos acometimentos dos enxertos, o que é necessário para a assistência aos transplantados, a ocorrência de pesquisas consistentes e a realização de ensaios clínicos. O grupo é formado por patologistas, clínicos e cientistas da área básica, que se reúnem a cada dois anos e revisam as diretrizes da classificação baseando-se nas evidências disponíveis. Os critérios enfocam não só a rejeição, mas também outros eventos que potencialmente afetam os enxertos. O primeiro encontro ocorreu em agosto de 1991 na cidade de Banff (Alberta, Canadá) liderado por Kim Solez, Lorraine Racusen e Philip Halloran, tendo caráter multidisciplinar e congregando patologistas, nefrologistas, cirurgiões e especialistas em histocompatibilidade dos Estados Unidos, Canadá, Dinamarca, Finlândia e Austrália. O último ocorreu em La Coruña, na Espanha, em junho de 2007, ao qual compareceram estudiosos de várias nações. Após cada reunião, um relatório é preparado e publicado. Os princípios básicos deste sistema são a validação através da relevância clínica das categorias diagnósticas com seus respectivos critérios individuais e graus, a reprodutibilidade dos diagnósticos entre diferentes avaliadores e a padronização dos diagnósticos histopatológicos, além dos requisitos mínimos necessários para a amostra da biópsia ser considerada satisfatória. As categorias diagnósticas fundamentam-se nos parâmetros agudos e crônicos afetando os quatro compartimentos do parênquima renal (túbulos, interstício, vasos e glomérulos). Os parâmetros e as categorias diagnósticas

das diferentes edições estão presentes nos anexos (Mazzucci e cols., 1999; Mengel e cols., 2007; Sementilli e cols., 2008; Solez e cols., 2008).

1.5.1. Validação da Classificação de Banff

A validação clínica da Classificação de Banff começou após a publicação da sua primeira edição, averiguando-se a relevância das categorias diagnósticas de rejeição aguda e dos critérios individuais por meio de estudos clínico-patológicos (Dooper e cols., 1995). Estes estudos abordaram a principalmente TCMR aguda, na época denominada rejeição aguda celular, pela ausência prévia de parâmetros sólidos para o diagnóstico da AMR aguda. A sobrevida do enxerto foi analisada em 743 biópsias colhidas entre o segundo e o trigésimo quinto dia pós-transplante em 293 pacientes. Este desfecho foi aferido aos três meses e aos cinco anos pós-transplante. Nos casos classificados como I e IIA, as taxas foram de 95% e 78%, respectivamente. No grupo com os graus IIB e III, 78% e 61%, respectivamente. Por fim, no grupo alocado como grau IIIC e com necrose parenquimatosa, 18% e 6%, respectivamente (Bates e cols., 1999). A reversibilidade da rejeição aguda ao tratamento foi avaliada em 44 pacientes, sendo 30 com enxertos oriundos de doadores falecidos, em relação às suas três diferentes classes. Observou-se consistente associação da classe com a reversão do quadro de rejeição ($P < 0,001$). As taxas de reversão completa foram de 93% nos casos classificados como classe I, 79% para classe II e 47% para classe III (Gaber e cols., 1996). Adicionalmente, a análise de biópsias sucessivas demonstra a associação de classes mais severas em biópsias subseqüentes com primeiras biópsias revelando também acentuados graus de rejeição (Gaber e cols., 1999).

O acometimento agudo dos vasos arteriais foi um dos parâmetros inicialmente mais estudados, e foi incluído nas classes mais altas de rejeição, principalmente devido

às evidências relacionando-o a pior prognóstico (Nickelait e cols., 1998). Uma coorte de 482 transplantados entre 1983 e 1991 com enxertos oriundos de doadores falecidos demonstrou diferenças significativas na sobrevida do enxerto após o primeiro e quinto anos de transplante em pacientes com episódio(s) de rejeição aguda com acometimento arterial e em pacientes com episódio(s) de rejeição aguda sem acometimento arterial. No primeiro grupo, estas taxas foram de 50,0% e 34,3%, enquanto no, segundo grupo, foram de 87,0% e 71,4%, fazendo com que a este critério fosse atribuído um risco relativo de 4,92 para perda de enxerto (van Sasse e cols., 1995). A arterite em graus mais severos também se associa a menor responsividade ao tratamento com corticosteróides (Gaber e cols., 1995).

Embora não tendo o mesmo destaque da arterite, a tubulite também influencia os parâmetros de sucesso do transplante renal, particularmente quando mais intensa. Trabalho aferindo a relevância prognóstica da tubulite observou que as taxas de perda de enxerto e os níveis séricos de creatinina em um ano foram equivalentes, comparando-se um grupo de pacientes com arterite leve (v1) a um grupo com tubulite severa (t3), embora os níveis séricos de creatinina aos seis meses tivessem sido superiores no primeiro grupo. Ambos os grupos tiveram desfechos desfavoráveis quando comparados a grupos com graus menores de tubulite (t1 e t2) e desfechos favoráveis em comparação a grupos com graus mais altos de arterite (v2 e v3) (Minervini e cols., 2000).

Outra maneira de verificar o valor da classificação é através do escore de Banff (soma dos valores atribuídos a tubulite, infiltrado inflamatório intersticial, arterite e glomerulite). Kaminska e cols. (2006) associaram valores mais altos deste escore a maior perda e pior função do enxerto em um ano de acompanhamento.

1.5.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade dos sistemas patológicos de graduação costuma ser aferida por meio da estatística Kappa. Este método estatístico mede a magnitude da concordância entre diferentes observadores, atribuindo-se um valor kappa (κ) para cada parâmetro morfológico observado, classe atribuída ou diagnóstico considerado. Valores kappa inferiores a 0,20 indicam baixa reprodutibilidade; entre 0,21 e 0,40, razoável reprodutibilidade; entre 0,41 e 0,60, moderada reprodutibilidade; entre 0,61 e 0,80, boa reprodutibilidade; e, acima de 0,80, excelente reprodutibilidade. Os estudos avaliando a reprodutibilidade geralmente abordam os parâmetros individuais e a presença ou não de rejeição (Mengel e cols., 2007).

Os dados publicados revelam valores kappa melhores quando se avalia a presença ou a ausência de rejeição, em comparação aos valores obtidos acerca dos parâmetros individuais. Os principais estudos que abordaram os valores kappa para a presença ou não de rejeição aguda registram números variando entre 0,46 e 0,77. A avaliação dos achados histopatológicos de acometimento agudo revelam variação de valores entre 0,17 e 0,53 para tubulite, 0,33 e 0,42 para o infiltrado inflamatório intersticial, 0,35 e 0,58 para a arterite e 0,19 e 0,50 para a glomerulite (Solez e cols., 1995; Marcussen e cols., 1995; Furness e Taub, 2001; Gough e cols., 2002; Furness e cols., 2003; Veronese e cols., 2005).

Mais recentemente, adicionou-se um novo parâmetro das alterações agudas do enxerto renal, o infiltrado inflamatório em capilares peritubulares (ptc). A reprodutibilidade deste parâmetro foi avaliada e atingiu um valor kappa de 0,62 (Gibson e cols., 2008).

Os valores kappa para os parâmetros histopatológicos de cronicidade não atingiram níveis destacados em estudo de Furness e cols. (2001), envolvendo vinte e

dois centros europeus de transplante. Os valores para glomerulopatia crônica do transplante, fibrose intersticial, atrofia tubular e arteriopatia crônica do enxerto foram, respectivamente, 0,11, 0,30, 0,29 e 0,36. Trabalho japonês, embora não atribuindo valores kappa, registrou baixa reprodutibilidade para alterações e parâmetros de cronicidade (Joh e cols., 2006).

1.5.3. O Acréscimo do C4d

O estudo pioneiro de Feucht e cols. (1991) demonstrando a positividade do C4d em capilares peritubulares e glomerulares em biópsias de transplantados com rins de doadores falecidos abriu caminho para os estudos posteriores que definiram este marcador como importante critério para o diagnóstico da AMR, conforme descrito em seções anteriores. Foi detectada associação desta positividade a alto risco imunológico e acentuada reatividade contra painel.

Além da importância diagnóstica, a relevância prognóstica da positividade desta subfração do complemento, levou à sua inclusão na Classificação de Banff. O mesmo grupo da descrição inicial do C4d em transplantes renais demonstrou associação entre a positividade deste marcador em pacientes com função retardada do enxerto a menores taxas de sobrevida do enxerto em um ano de seguimento nos casos com positividade difusa (57% de perda) em comparação aos casos negativos (90%) (Feucht e cols. 1993). A importância prognóstica do marcador foi também demonstrada ao serem avaliados os níveis séricos de creatinina aos seis, doze e dezoito meses. Pacientes com C4d positivo tiveram níveis significativamente maiores nos três intervalos, mesmo na ausência de evidências morfológicas de rejeição (Regele e cols., 2001). Adicionalmente, já foi demonstrado impacto da positividade focal do C4d sobre a função renal. Magil e Tinckam demonstraram equivalência na proporção de pacientes com taxa de filtração

glomerular abaixo de 30 mL/min em um, dois e quatro anos após o transplante, comparando-se grupos de pacientes com C4d positivo difusamente distribuído em pacientes com positividade focal. Esta proporção de pacientes com má função renal foi significativamente inferior no grupo negativo.

Em nosso país, David-Neto e cols. (2007) estudaram oitenta pacientes com diagnóstico de “CAN” registrado em arquivo referente aos anos de 1997 a 2003, verificando o papel prognóstico do C4d. Os casos considerados positivos foram aqueles nos quais mais de 10% dos capilares peritubulares apresentaram marcação. As taxas de mortalidade e de perda de enxerto foram significativamente maiores no grupo positivo.

A detecção do C4d pode ser efetuada por meio de imunofluorescência e imunoistoquímica. Para a confecção das lâminas de imunofluorescência, é utilizado material de biópsias renais com tecido congelado e anticorpo anti-C4d monoclonal. Já quando se lança mão da imunoistoquímica, o tecido utilizado provém de biópsias renais embebidas e armazenadas em blocos de parafina e o anticorpo anti-C4d é policlonal. Comparação entre estas duas técnicas demonstrou superioridade da imunofluorescência sobre a imunoistoquímica, quando são avaliados os critérios de sensibilidade e concordância entre diferentes observadores (Seemayer e cols., 2007). Outros autores, no entanto, alegam equivalência entre as técnicas (Nadasdy e cols., 2005).

1.5.4. Outras Classificações

Anteriormente à Classificação de Banff, segundo Gaber e cols. (1996), Finkelstein e cols. elaboraram um sistema de avaliação de rejeição aguda, o qual se baseava na soma de nove critérios histopatológicos. Este sistema mostrou-se útil para a previsão de resposta terapêutica. No entanto, apresentava-se suscetível à impressão geral do patologista avaliador. Parfrey e cols. idealizaram um sistema combinando

dados morfológicos e clínicos, que mostrou relação com desfechos do transplante (Gaber e cols., 1996).

Alternativamente à Classificação de Banff, surgiu o Sistema CCTT (*Cooperative Clinical Trials in Transplantation*), apoiado pelo NIH (*National Institute of Health*). Este novo sistema mostrou-se reprodutível e com boa validação clínica (Colvin e cols., 1997). Posteriormente, acabou sendo incorporado à Classificação de Banff, participando muitos de seus idealizadores das reuniões periódicas que definem as diretrizes da classificação (Mengel e cols., 2007). O escore CADI (*Chronic Allograft Damage Index*: Índice do Dano Crônico do Enxerto) persiste como uma alternativa, no que tange às alterações crônicas do enxerto. Este escore baseia-se na avaliação de seis parâmetros histopatológicos de cronicidade: infiltrado inflamatório crônico intersticial, fibrose intersticial, aumento da matriz mesangial glomerular, esclerose glomerular, proliferação vascular intimal e atrofia tubular. Cada um destes achados histopatológicos é graduado de 0 a 3, sendo o escore final uma soma destes seis valores (Isoniemi e cols., 1994). O CADI demonstrou adequada concordância entre avaliadores e relação com perda de enxerto e com variáveis clínicas como idade do doador, ocorrência prévia de rejeição aguda, idade do receptor e tempo de isquemia fria (Yilmaz e cols., 2003; Yilmaz e cols., 2007).

1.6. Linfócitos B

1.6.1. Generalidades

Conceitualmente, os linfócitos B são células que expressam imunoglobulinas de superfície que atravessam a membrana plasmática e servem como receptores de reconhecimento para epítopos antigênicos específicos. Estes receptores caracterizam-se

por grande diversidade e distribuição clonal. O seu desenvolvimento ocorre por uma sucessão de eventos que começa com a transformação de células-tronco hematopoéticas no tecido linfóide primário (fígado fetal e medula óssea fetal e adulta), passa por maturação no tecido linfóide secundário (linfonodos e baço, principalmente) e termina na transformação final em plasmócitos. Os plasmócitos são os responsáveis pela produção de anticorpos. A identificação precisa dos linfócitos B foi possível graças à descoberta de moléculas específicas de sua superfície e ao desenvolvimento de anticorpos monoclonais que reagem contra as mesmas. A primeira molécula deste grupo identificada foi o CD20, inicialmente denominada B1. O CD20 é uma molécula específica de linfócitos B que funciona como canal de cálcio na membrana plasmática da célula. Outras moléculas preferencialmente expressas por linfócitos B são CD19, CD21, CD22, CD23, CD24, CD40, CD72, CD79a e CD79b (Sigal, 2006; LeBien e Tedder, 2008).

Além da produção de anticorpos efetuada pelos plasmócitos, que são as células terminais na evolução da linhagem dos linfócitos B, outras funções têm sido atribuídas a este grupo de linfócitos. Estas funções são o desencadeamento da cascata do sistema complemento, a apresentação de antígenos, o auxílio na maturação dos linfócitos T, a produção de citocinas e o desenvolvimento dos órgãos linfóides secundários. A ativação do complemento decorre da produção de anticorpos, a qual pode ser seguida pela formação de complexos antígeno-anticorpo, o que desencadeia a via clássica do complemento, com todas as suas potenciais conseqüências. A apresentação de antígenos aos linfócitos T é mais eficientemente efetuada pelas DCs, mas os linfócitos B também têm esta capacidade. Esta atividade é facilitada pelas imunoglobulinas de superfície, que podem ligar-se ao antígeno, internalizá-lo, processá-lo e apresentá-lo ao linfócito T. O desenvolvimento e a maturação dos linfócitos T no timo lançam mão dos linfócitos B,

podendo estes atuar na promoção da sobrevivência de grupos de timócitos (precursores de linfócitos T) e na eliminação de timócitos auto-reativos. Citocinas como IL-10, IL-6, linfotóxina-alfa (LT- α), TNF- α , IL-2, IL-4, IL-12 e INF- γ podem ser produzidas por linfócitos B, além de outros grupos celulares. Esta produção de citocinas pode induzir respostas imunológicas dependentes de linfócitos T. Por fim, os linfócitos B promovem o desenvolvimento de órgãos linfóides secundários como linfonodos, baço e tecido linfóide associado às mucosas (Cascalho e Platt, 2007; Heller e cols., 2007).

1.6.2. Relação dos Linfócitos B com o Transplante Renal

A influência exercida pelos linfócitos B sobre os transplantes assenta-se sobre quatro linhas gerais: a produção de anticorpos, as outras funções exercidas por estas células além da produção de anticorpos, a analogia com doenças auto-imunes e os estudos relacionando diretamente linfócitos B a eventos do transplante. A produção de anticorpos, com a conseqüente AMR juntamente com sua detecção e impacto já foram discutidos em outras seções. As funções adicionais desempenhadas pelos linfócitos B e seu papel na ativação dos linfócitos T e em outros fenômenos imunológicos foram apresentados na seção anterior. A terceira linha (analogia com doenças auto-imunes) assenta-se no papel desempenhado pelos linfócitos B em doenças as quais eram consideradas “mediadas por linfócitos T”. Um claro exemplo é o *diabetes mellitus* tipo 1. Sabe-se que nesta doença os linfócitos T CD8 citotóxicos são importantes na destruição das ilhotas de Langerhans e que os linfócitos T CD4 também têm sua relevância. No entanto, recentemente, verificou-se que 60% a 70% dos linfócitos infiltrando as ilhotas de Langerhans acometidas por *diabetes mellitus* tipo 1 têm imunofenótipo B. Em modelos experimentais utilizando camundongos, observou-se que a presença de linfócitos B é necessária para a atividade integral dos linfócitos T

(Tarlington e cols, 2008). A presença e as implicações de linfócitos B foram estudadas principalmente abordando-se a rejeição aguda e encontram-se detalhadas na seção seguinte (Zarkhin e cols., 2008).

1.6.3. Linfócitos B e Rejeição Aguda ao Enxerto Renal - Evidências

Apesar dos esforços para a compreensão da fisiopatologia da TCMR aguda terem enfatizado o papel dos linfócitos T e a Classificação de Banff ter denominado desta maneira o que, anteriormente, era chamado de rejeição aguda celular, alguns dados novos surgem na literatura acerca da possível importância dos linfócitos B presentes no interstício renal em alguns casos de rejeição aguda com prognóstico desfavorável. A distinção entre linfócitos B e T deve ser feita através de método imunohistoquímico, pois não existe critério morfológico à microscopia óptica que permita a discriminação correta entre estes dois grupos de linfócitos. A detecção de linfócitos B foi descrita em estudos recentes, os quais utilizaram o marcador imunohistoquímico anti-CD20. Este marcador encontra-se na superfície celular de linfócitos B, não mais sendo expresso quando estas células diferenciam-se em plasmócitos. Sarwal e cols. (2003) demonstraram a presença de agregados de linfócitos B no interstício de biópsias de enxertos renais de pacientes pediátricos com rejeição aguda celular (denominação anterior da TCMR aguda) por meio de identificação imunohistoquímica utilizando anti-CD20. Os pacientes que apresentaram estes agregados de linfócitos B apresentaram maior resistência ao tratamento com corticosteróides e menor sobrevida do enxerto. Adicionalmente, foram encontradas evidências de diferenciação de linfócitos B por meio de análises de microarranjos de DNA. A principal limitação do estudo refere-se ao limitado seguimento dos casos.

Agregados de linfócitos B, dentre outros grupos celulares, foram demonstrados em focos de angiogênese linfática em enxertos renais (Kerjaschki e cols., 2004; Stuhlt e cols., 2007). Em estudo retrospectivo, Hippen e cols. (2005) compararam pacientes com TCMR aguda graus IA e IB, dividindo-os em um grupo de seis casos em cujas biópsias renais houve a positividade imunoistoquímica para anti-CD20 e em outro grupo 21 casos sem esta positividade, com quatro anos de seguimento mínimo. O primeiro grupo (positivos para anti-CD20) apresentou menor resposta ao tratamento com corticosteróides e menor sobrevida do enxerto na comparação com o grupo negativo para o anti-CD20. As limitações desta publicação referem-se ao pequeno número de pacientes, à restrição de casos de rejeição aguda celular padrões IA e IB e ao fato de poucos casos positivos para o anti-C4d, sendo todos estes negativos para anti-CD20. Em trabalho utilizando um critério de positividade de anti-CD20 pouco restritivo (duas ou mais células por campo de grande aumento) em 45 biópsias de 31 pacientes pediátricos, foi observada associação desta positividade com perda do enxerto, pior função do enxerto e com TCMR aguda. Não houve associação com a positividade de C4d (Tsai e cols., 2006). Martins e cols. (2007) analisaram a positividade para anti-CD20 em três grupos distintos: tecido renal normal, biópsias com TCMR aguda e biópsias com nefropatia crônica do enxerto. Não foram encontradas células positivas para anti-CD20 no primeiro grupo. Por outro lado em todos os casos dos dois outros grupos foram identificadas células com esta marcação, sendo que a positividade foi expressa em número superior estatisticamente significativo no grupo com TCMR aguda. Adicionalmente, neste último grupo, quando foram analisados dois padrões de positividade (linfócitos B formando nódulos e linfócitos B esparsos), encontrou-se nível médio de creatinina sérica superior no grupo com formação de nódulos em comparação ao grupo com positividade esparsa, porém sem significado à análise estatística.

Adicionalmente, agregados de linfócitos B foram detectados em biópsias protocolares (Mengel e cols., 2007).

Além dos trabalhos associando a presença de linfócitos B com prognóstico adverso e das hipóteses lançadas pela pesquisa básica, a literatura fornece séries de casos abordando a utilização do rituximab como medicamento capaz de induzir uma melhora em casos de TCMR aguda refratária ao tratamento. O rituximab é um anticorpo IgG1 monoclonal quimérico composto por cadeias leve kappa e pesada humanas em suas porções constantes e cadeias leve e pesada murinas em suas porções variáveis. Este anticorpo atua diretamente na inibição da proliferação de linfócitos B e induz a apoptose e a citotoxicidade mediada por anticorpos e pela ativação do sistema complemento (Reff e cols., 1994; Cheson e Leonard, 2008). Becker e cols. (2004) descrevem uma série de 27 casos de AMR aguda refratários ao tratamento inicial que foram submetidos a uma nova sessão terapêutica convencional, porém com o acréscimo de rituximab. Nestes casos os níveis médios de creatinina e o débito urinário atingiram considerável melhora. Em longo prazo, apenas três pacientes apresentaram perda do enxerto não relacionada com morte (seis outros pacientes morreram por causas não relacionadas à função do enxerto). Uma limitação que pode ser atribuída ao estudo é a ausência, embora compreensível pela gravidade dos casos, de um grupo controle sem o rituximab. Estudo semelhante, porém com menor casuística (oito adultos), alocando casos de AMR aguda com C4d e DSA positivos, observou 75% de sobrevida do enxerto e de melhora da função do enxerto, em seguimento de dez meses (Faguer e cols., 2007). Genberg e cols. (2006), em série com maior número de pacientes (43 adultos e seis crianças) envolvendo casos com rejeição “borderline” e AMR aguda resistentes a corticosteróides, constataram sobrevida do enxerto de 85% em seguimento de 43 meses.

O rituximab foi administrado como terapêutica de indução em 36 pacientes e como tratamento contra rejeição nos treze restantes.

Adicionalmente, há relatos de casos abordando o uso do rituximab. Alausa e cols. (2005) relatam caso de paciente de 49 anos que apresentou um episódio de TCMR aguda classe IIA com níveis séricos de creatinina de 4,7 mg/dL quatro dias após o transplante, o qual foi refratário ao uso da globulina anti-timócito. A biópsia pós-tratamento evidenciou a persistência do infiltrado e revelou a presença de linfócitos B (o que não foi encontrado na primeira biópsia) e os níveis de creatinina atingiram 8,7 mg/dL. Foram então administrados anticorpo monoclonal anti-CD3 (muronomab) e rituximab. Nos quatro dias subseqüentes, a função renal teve melhora gradual e a creatinina sérica estabilizou-se em 2,0 mg/dL no vigésimo terceiro dia após o transplante. Lehnhardt e cols. (2006) descrevem um caso de um paciente de doze anos que, no décimo segundo dia pós-transplante apresentou aumento dos níveis de creatinina sérica e a biópsia do mesmo dia foi classificada como “*borderline*”, não sendo efetuada modificação na terapêutica. Em biópsia subseqüente, houve progressão para rejeição TCMR aguda classe IA, refratária ao tratamento empreendido (pulsoterapia com metilprednisolona e troca de ciclosporina por tacrolimus) e progressão posterior para classe IIA. A tentativa com globulina anti-timócito resultou em melhora apenas transitória com posterior aumento dos níveis de creatinina sérica. Foi administrado rituximab com completa resolução histológica. Seqüencialmente, o paciente foi acometido por distúrbio linfoproliferativo pós-transplante, tratado com sucesso também com rituximab. Aos treze meses pós-transplante, a função renal encontrava-se estável (2006).

No entanto, outros estudos publicados não chegaram às mesmas conclusões. Doria e cols. (2006) não encontraram diferenças nos níveis de creatinina anteriores e

posteriores ao tratamento entre um grupo de pacientes com presença de linfócitos B em suas biópsias e um grupo de pacientes sem estes linfócitos em casos de TCMR aguda grau IA. Algumas considerações que podem ser feitas acerca deste estudo são a limitação a uma única categoria de TCMR aguda (IA), a ausência de pacientes com rejeição humoral e o pequeno número de casos com nódulos de linfócitos B (apenas quatro). Estudo envolvendo um grupo de cento e vinte pacientes com diagnóstico de TCMR aguda não encontrou significado prognóstico para a presença ou a ausência de linfócitos B. Contudo, a quantificação dos linfócitos B não adotou critérios suficientemente restritivos e muitos dos pacientes alocados foram submetidos a protocolos particulares (pré-tratamento com globulina anti-timócito ou com alemtuzumab) (Kayler e cols., 2007). Bagnasco e cols. (2007) também não encontraram valor prognóstico da positividade de anti-CD20 em 56 pacientes analisados. O critério de positividade foi a presença de pelo menos um agregado com 100 ou mais células marcadas por campo de grande aumento. Foram alocados conjuntamente pacientes transplantados com enxertos provenientes de doadores vivos e falecidos. Por fim, recente estudo dividiu a positividade de anti-CD20 em agregados de células positivas e em células positivas esparsamente distribuídas, sendo este último padrão subdividido em cinco escores. Foram analisadas 54 biópsias com diagnóstico de rejeição aguda referentes a 50 pacientes (40 transplantados com enxertos de doadores falecidos). Não houve relação de qualquer um dos padrões de positividade com perda do enxerto, resposta à terapêutica, positividade de C4d e creatinina sérica aos seis e aos doze meses após a biópsia (Scheepstra e cols., 2008).

Em síntese, os dados até agora disponíveis na literatura não nos permitem conclusões seguras sobre a possível influência dos linfócitos B na rejeição aguda ao enxerto renal, particularmente em seus casos refratários. No entanto, os estudos até o

momento publicados apresentam limitações significativas, principalmente em termos de tamanho de amostra, tempo de seguimento, restrição a padrões de rejeição aguda, aplicação de protocolos específicos de tratamento e alocação conjunta de pacientes transplantados com enxertos oriundos de doadores falecidos e vivos em cada um destes trabalhos. Percebe-se, portanto, a importância de um estudo com amostra satisfatória, tempo de seguimento adequado e inclusão dos diferentes padrões de rejeição aguda, para fornecer um substrato teórico consistente visando a futuros estudos prospectivos sólidos e, posteriormente, de acordo com a evidência consistente que venha a ser obtida, ensaio(s) clínico(s) metodologicamente projetado(s) que avalie(m) a eficácia de fármacos (como o rituximab, por exemplo) nos casos de rejeição aguda com componente de linfócitos B (Sarwal e cols., 2003; Hippen e cols., 2005; Martins e cols., 2007).

1.7. Referências Bibliográficas

- Abbas AK. Diseases of immunity. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. 7th, editors. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia (USA): Elsevier Saunders c2004. p. 193-267.
- Abe M, Kawai T, Futatsuyama K, Tanabe K, Fuchinoue S, Teraoka S, et al. Postoperative production of anti-donor antibody and chronic rejection in renal transplantation. *Transplantation*. 1997 Jun;63(11):1616-1619.
- Abe M, Sawada T, Horita S, Toma H, Yamaguchi Y, Teraoka S. C4d deposition in peritubular capillary and alloantibody in the allografted kidney suffering severe acute rejection. *Clin Transplant*. 2003 Jun;17(Suppl.10):14-19.
- Ahmad I, Abull-Ezz SR, Walker PD, Bonsib SM, Ketel B, Barri YM. Acute rejection presenting as nephrotic syndrome. *Transplantation*. 2000 Jun;69(12):2663-2665.
- Aita K, Yamaguchi Y, Horita S, Ohno M, Tanabe K, Fuchinoue S, et al. Thickening of the peritubular capillary basement membrane is a useful diagnostic marker of chronic rejection in renal allografts. *Am J Transplant*. 2007 Apr;7(4):923-929.
- Al-Lamki RS, Wang J, Skepper JN, Thiru S, Pober JS, Bradley JR. Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants. *Lab Invest*. 2001 Nov;81(11):1503-1515.
- Alausa M, Almagro U, Siddiqi N, Zuiderweg R, Medipalli R, Hariharan S. Refractory acute kidney transplant rejection with CD20 graft infiltrates and successful therapy with rituximab. *Clin Transplant*. 2005 Feb;19(1):137-140.
- Albrecht EW, Stegeman CA, Tiebosch ATMG, Togzess AM, van Goor H. Expression of inducible and endothelial nitric oxide synthases, formation of peroxynitrite and reactive oxygen species in human chronic renal transplant failure. *Am J Transplant*. 2002 May;2(5):448-453.
- Allan JS, Madsen JC. Recent advances in the immunology of chronic rejection. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002 May;11(3):315-321.
- Andresdotirr MB, Assmann KJ, Koene RA, Wetzels JF. Immunohistological and ultrastructural differences between recurrent type I membranoproliferative glomerulonephritis and chronic transplant glomerulopathy. *Am J Kidney Dis*. 1998 Oct;32(4):582-584.
- Arns W, Citterio F, Campistol JM. "Old for old" – new strategies for renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Feb;22(2):336-341.
- Ashraf S, Parrot NR, Dyer P, Roberts I, Johnson RWG. Clinical response and temporal patterns of acute cellular rejection: relationship to chronic transplant nephropathy. *Transpl Int*. 1998 Jun;11(Suppl.1):S5-S9.

Azuma H, Chandraker A, Nadeau K, Hancock WW, Carpenter CB, Tilney NL, et al. Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 93:12439-12444.

Baboolal K, Jones GA, Janezic A, Griffiths DR, Jurewicz W. Molecular and structural consequences of early renal allograft injury. *Kidney Int*. 2002 Feb;61(2):686-696.

Bagai R, Valujskikh A, Canaday DH, Bailey E, Lalli PN, Harding CV, et al. Mouse endothelial cell cross-present lymphocyte-derived antigen on class I MHC via TAP1- and proteasome-dependent pathway. *J Immunol*. 2005 Jun;174(12):7711-7715.

Bagnasco SM, Tsai W, Rahman MH, Kraus ES, Barisoni L, Vega R, et al. CD20 positive infiltrates in renal allograft biopsies with acute cellular rejection are not associated with worse graft survival. *Am J Transpl*. 2007 Aug;7(8):1968-1973.

Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*. 2002 Jun;2(6):401-409.

Bates WD, Davies DR, Welsh K, Gray DWR, Fuggle SV, Morris PJ. An evaluation of the Banff classification of early renal allograft biopsies and correlation with outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 Oct;14(10):2364-2369.

Becker YT, Becker BN, Pirsch JD, Sollinger HW. Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. *Am J Transplant*. 2004 Jun;4(6):996-1001.

Bell JM, Walker PD. C4d and the renal allograft biopsy: a different perspective. *Mod Pathol*. 2005 Feb;18(1):265A.

Bellos JK, Perrea DN, Vlachakos D, Kostakis AI. Chronic allograft nephropathy: the major problem in long-term survival: review of etiology and interpretation. *Transplant Rev*. 2005 Jun;19(3):138-144.

Bian H, Harris PE, Redd EF. Ligation of HLA class I molecules on smooth muscle cells with anti-HLA antibodies induces tyrosine phosphorylation, fibroblast growth factor receptor expression and cell proliferation. *Int Immunol*. 1998 Sep;10(9):1315-1323.

Bingaman AW, Ha J, Durham MM, Waitze SY, Tucker-Burden C, Cowan SR, et al. Analysis of the CD40 and CD28 pathways on alloimmune responses by CD4+ T cells in vivo. *Transplantation*. 2001 Oct;72(7):1286-1292.

Böhmig GA, Exner M, Habicht A, Schilinger 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 Apr;13(4):1091-1099

Böhmig G, Regele H. Diagnosis and treatment of antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transpl Int*. 2003. Nov;16(11):773-787.

Bonsib SM, Abul-Ezz SR, Ahmad I, Young SM, Ellis EN, Schneider DL, et al. Acute rejection-associated tubular basement membrane defects and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int*. 2000 Nov;58(5):2206-2214.

Brennan DC. Long-term trends in allograft survival. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2006 Jan;13(1):11-17.

Cameron JL, Whiteside C, Katz J, Devins GM. Differences in quality of life across renal replacement therapies: a meta-analytic comparison. *Am J Kidney Dis.* 2000 Apr;35(4):629-637.

Cantarovich F, Carbajal R, Medioni J, Marmol A, Morelon E, Landais P. Clinical evaluation of early predictors of renal transplantation results. *Transplant Proc.* 2001 Feb-Mar;33(1-2):1192-1193.

Carter V, Shenton BK, Jaques D, Turner D, Talbot D, Gupta A, et al. Vimentin antibodies: a non-HLA antibody as a potential risk factor in renal transplantation. *Transplant Proc.* 2005 Mar;37(3):654-657.

Cascalho M, Platt JL. Novel functions of B cells. *Crit Rev Immunol.* 2007 27(2):141-151.

Chapman JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ. Chronic allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Oct;16(10):3015-3026.

Cheson BD, Leonard JP. Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2008 Aug;359(6):613-626.

Chien CT, Lee PH, Chen CF, Ma MC, Lai MK, Hsu SM. De novo demonstration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol.* 2001 May;12(5):973-982.

Ciancio G, Burke GW, Gaynor JJ, Carreno MR, Cirocco RE, Mathew JM, et al. A randomized trial of three renal transplant induction antibodies: early comparison of tacrolimus, mycophenolate mofetil, and steroid dosing, and newer immune-monitoring. *Transplantation.* 2005 Aug;80(4):457-465.

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 Dec;8(12):1930-1941.

Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol.* 2005 Oct;5(10):805-817.

Colvin RB, Nickleit V. Renal transplant pathology. In: Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG, 6th, editors. *Heptistall's Pathology of the Kidney.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1347-1490.

Cornell LD, Smith N, Colvin RB. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2008;3:189-220.

Cosio FG, Gloor JM, Sethi S, Stegall MD. Transplant glomerulopathy. *Am J Transplant.* 2008 Mar;8(3):492-496.

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 Mar;71(5):652-658.

Crocker BP, Clapp WL, Shamat ARFA, Kone BC, Peterson JC. Macrophages and chronic renal allograft nephropathy. *Kidney Int*. 1996 50(Suppl. 57):S-42-S-49.

Daemen MA, Van't Veer C, Wolfs TG, Buurman WA. Ischemia/reperfusion-induced INF-gamma up-regulation: involvement of IL-12 and IL-18. *J Immunol*. 1999 May;162(9):5506-5510.

Daemen MA, De Vries B, Buurman WA. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation*. 2002 Jun;73(11):1693-1700.

Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M. Immunohistochemical analysis of the interstitial mast cells in acute rejection of human renal allografts. *Med Sci Monit* 2004 May;10(5):151-6.

David-Neto E, Prado E, Beutel A, Ventura CG, Siqueira SAC, Hung J, et al. C4d-positive chronic rejection: a frequent entity with a poor outcome. *Transplantation*. 2007 Dec;84(11):1391-1398.

Desvaux D, Le Gouvello S, Pastural M, Abtahi M, Suberbille C, Boen N, et al. Acute renal allograft rejection with major interstitial oedema and plasma-cell rich infiltrates: high gamma-interferon expression and poor clinical outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Apr;19(4):933-939.

Djamali A, Reese S, Yracheta J, Oberley T, Hullett D, Becker B. Epithelial-to-mesenchymal transition and oxidative stress in chronic allograft nephropathy. *Am J Transplant*. 2005 Mar;5(3):500-509.

Dooper PMM, Hoistma AJ, Koene RAP, Bogman MJJT. Evaluation of the Banff criteria for the histological diagnosis of rejection in renal allograft biopsies. *Transplant Proc*. 1995 Feb;27(1):1005-1006.

Doria C, di Francesco F, Ramirez CB, Frank A, Iaria M, Francos G, et al. The presence of B-cell nodules does not necessarily portend a less favorable outcome to therapy in patients with acute cellular rejection of a renal allograft. *Transplant Proc*. 2006 Dec;38(10):3441-3444.

Dragun D, Holf U, Park JK, Qun Y, Schneider W, Luft FC, et al. Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background. *Kidney Int*. 2000 Nov;58(5):2166-2177.

Dragun D, Müller DN, Bräser JH, Fritsche L, Nieminen-Kelha M, Dechen R. Angiotensin II type 1 receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2005 Feb;352(6):558-569.

Ekberg H, Backman L, Tufvesson G, Tydén B, Nashan B, Vincent F. Daclizumab prevents acute rejection and improves patient survival post-transplantation: 1-year pooled analysis. *Transplant Int.* 2000 Apr;13(2):151-159.

Faguer S, Kamar N, Guilbeaud-Frugier C, Fort M, Modesto A, Mari A, et al. Rituximab therapy for acute humoral rejection after kidney transplantation. *Transplantation.* 2007 May;83(9):1277-1280.

Fahim T, Böhmig GA, Exner M, Huttary N, Kerschner H, Kandutsch S, et al. The cellular lesion of humoral rejection: predominant recruitment of monocytes to peritubular and glomerular capillaries. *Am J Transplant.* 2007. Feb;7(2):385-393.

Ferlicot S, Durrbach A, Bâ N, Desvaux D, Bedossa P, Paradis V. The role of replicative senescence in chronic allograft nephropathy. *Human Pathol.* 2003 Sep;34(9):924.

Fernandez-Fresnedo G, Plaza JJ, Sanchez-Plumed J, Sanz-Guajard A, Palomar-Fontanet R, Arias M. Proteinuria: a new marker of long-term graft and patient survival in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 Jun;19(Suppl. 3):iii47-iii51.

Fernandez-Miranda C, Morales JM, Porres A, Gomez-Gerique J, Guijarro C, Aranda JL, et al. Increased lipoproteins and fibrinogen in chronic renal allograft dysfunction. *Am J Nephrol.* 1997 17(5):445-449.

Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol.* 1991 Dec;86(3):464-470.

Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmüller G, et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int.* 1993 Jun;43(6):1333-1338.

Freese P, Svalander CT, Mölne J, Nordén G, Nyberg G. Chronic allograft nephropathy – biopsy findings and outcome. *Nephrol Dial Transplant.* 2001 Dec;16(12):2401-2406.

Furness PN, Taub N. International variation in the interpretation of renal transplant biopsies: Report of the CERTPAP Project. *Kidney Int.* 2001. Nov;60(5):1998-2011.

Furness PN, Taub N, Assmann KJ. International variation in histologic grading is large and persistent feedback does not improve reproducibility. *Am J Surg Pathol.* 2003 27:805-810.

Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, Flax S, Gaber AO. Correlation between Banff Classification, acute renal rejection scores, and reversal of rejection. *Transplant Proc.* 1995 Feb;27(1):1009.

Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, Flax SD, Shokouh-Amri MH, Schroder T, et al. Correlation between Banff Classification, acute renal rejection scores and reversal of rejection. *Kidney Int.* 1996 Feb;49(2):481-487.

Gaber LW, Moore LW, Gaber O, Tesi RJ, Meyer J, Schroeder TJ. Correlation of histology to clinical rejection reversal: a Thymoglobulin Multicenter Trial report. *Kidney Int.* 1999 Jun;55(6):2415-2422.

Gallon L, Gagliardini E, Benigni A, Kaufman D, Waheed A, Noris M, et al. Immunophenotypic analysis of cellular infiltrate of renal allograft biopsies in patients with acute rejection after induction with alemtuzumab (Campath-1H). *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006 May;1(3):539-545.

Gasser M, Waaga AM, Kist-Van Holte JE, Lenhard SM, Laskowski I, Shaw GD, et al. Normalization of brain death-induced injury to rat renal allografts by recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Jul;13(7):1937-1945.

Genberg H, Hansson A, Wernerson A, Wennberg L, Tydén G. Pharmacodynamics of rituximab in kidney allotransplantation. *Am J Transplant.* 2006 Oct;6(10):2418-2428.

Gibson IW, Gwinner W, Bröckner V, Sis B, Riopel J, Roberts IS, et al. Peritubular capillaritis in renal allografts: prevalence, scoring system, reproducibility and clinicopathological correlates. *Am J Transplant.* 2008 Apr;8(4):819-825.

Gloor JM, Sethi S, Stegall MD, Park WD, Moore SB, DeGoey S, et al. Transplant glomerulopathy: subclinical incidence and association with alloantibody. *Am J Transplant.* 2007 Sep;7(9):2124-2132.

Gonçalves LFS, Manfro RC, Veronese FJV, Ribeiro AR. Aspectos clínicos, rotinas e complicações do transplante renal. In: Barros E, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LFS. 3ª., editores. *Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento.* Porto Alegre: Artmed c2006. p. 455-485.

Gough J, Rush D, Jeffery J, Nickerson P, McKenna R, Solez K, et al. Reproducibility of the Banff schema in reporting protocol biopsies of stable renal allografts. *Nephrol Dial Transplant.* 2002 Jun;17(6):1081-1084.

Grim PC, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Stern E, Jeffery J, et al. Computerized image analysis of sirius red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jun;14(6):1662-1668.

Habib R, Zurowska A, Hinglais N, Gubler MC, Antignac C, Niaudet P, et al. A specific glomerular lesion of the graft: allograft glomerulopathy. *Kidney Int.* 1993. 44(Suppl. 42):S-104-S-111.

Hagerty DT, Allen PM. Processing and presentation of self- and nonself foreign antigens by the renal proximal tubule. *J Immunol.* 1993 Apr;148(8):2324-2332.

Hamar P, Szabo A, Muller V, Heeman U. Involvement of interleukin-2 and growth factors in chronic kidney allograft rejection in rats. *Transplant Proc.* 2001 May;33(3):2160-2162.

Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000 Mar;342(9):605-612.

Harris PE, Bian H, Reed EF. Induction of high affinity fibroblast growth factor receptor expression and proliferation in human endothelial cells by anti-HLA antibodies: a possible mechanism for transplant atherosclerosis. *J Immunol*. 1997 Dec;159(11):5697-5704.

Heller F, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Brandt U, Draganovici D, Fischereder M, et al. The contribution of B cells to renal interstitial inflammation. *Am J Pathol*. 2007 Feb;170(2):457-468.

Herman J, Lerut E, Van Damme-Lombaerts R, Emonds MP, Van Damme B. Capillary deposition of complement C4d and C3d in pediatric renal allograft biopsies. *Transplantation*. 2005 May;79(10):1435-1440.

Hippen BE, DeMattos A, Cook WJ, Kew II CE, Gaston RS. Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. *Am J Transplant*. 2005 Sep;5(9):2248-2252.

Humar A, Kerr S, Gillingham KJ, Kristen J, Matas AJ. Features of acute rejection that increase risk for chronic rejection. *Transplantation*. 1999 Oct;68(8):1200-1203.

Iniotaki-Theodoraki AG, Boletis JN, Trigas GCH, Kalogerepoulou H, Kostakis A, Stavropoulos-giokas CG. Humoral immune reactivity against human leukocyte antigen (HLA) – DQ graft molecules in the early posttransplantation period. *Transplantation*. 2003 May;75(9):1601-1603.

Ishii Y, Sawada T, Kubota K, Fuchnoue S, Teraoka S, Shimizu A. Injury and progressive loss of peritubular capillaries in the development of chronic allograft nephropathy. *Kidney Int*. 2005 Jan;67(1):321.

Isoniemi H, Taskinen E, Hayry P. Histological chronic allograft damage index accurately predicts chronic allograft rejection. *Transplantation*. 1994 Dec;58(11):1195-1198.

Issa N, Cosio FG, Gloor JM, Sethi S, Dean PG, Moore SB, et al. Transplant glomerulopathy: risk and prognosis related to anti-human leukocyte antigen class II antibody. *Transplantation*. 2008 Sep;86(5):681-685.

Iványi B, Fahmi H, Brown H, Szenohradzky P, Halloran PF, Solez K. Peritubular capillaries in chronic renal allograft rejection: a quantitative ultrastructural study. *Human Pathol*. 2000 Sep;31(9):1129-1138.

Joh K, Morozumi K, Kitamura H. Symposium: evaluating the reproducibility of pathological diagnosis using the 1997 Banff Classification Update. *Clin Transplant*. 2006 Jul;20(Suppl.15): 53-60.

Joosten SA, van Kooten C, Paul LC. Pathogenesis of chronic allograft rejection. *Transplant Int.* 2003 Mar;16(3):137-145.

Kahan BD, Rajagopalan PR, Hall M. Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody. The United States Simulect Renal Study Group. *New Engl J Med.* 1998 Jan;338(3):161-164.

Kahan B, Rajagopalan PR, Hall M. Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody. *Transplantation.* 1999 Jan;67(2):276-284.

Kaminska D, Bernat B, Mazanowska O, Krasnowski R, Polak W, Patrzalek D, et al. Predictive value of Banff score of early kidney allograft biopsies for 1-year graft survival. *Tranplant Proc.* 2006 Jan-Feb;38(1):59-61.

Kaplan B, Meier-Kriesche HU. Death after graft loss: an important late study endpoint in kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2002 Nov;2(10):970-974.

Kaplan B. Overcoming barriers to long-term graft survival. *Am J Kidney Dis.* 2006 Apr;47(4Suppl.2):S52-S64.

Kayler LK, Lakkis FG, Morgan C, Basu A, Blisard D, Tan HP, et al. Acute cellular rejection with CD20-positive lymphoid clusters in kidney transplant patients following lymphocyte depletion. *Am J Transplant.* 2007 Apr;7(4):949-954.

Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, Nagy-Bojarski K, Watschinger B, Soleiman A, et al. Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J Am Soc Nephrol.* 2004 15:603-612.

Kiyici H, Demirhan B, Özdemir BH, Aktaş G, Karabai G, Haberal M. Significance of peritubular capillary basement membrane multilamellation in diagnosis of chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc.* 2003 Nov;35(7):2643-2644.

Knight RJ, Burrows L, Bodian C. The influence of acute rejection on long-term renal allograft survival: a comparison of living and cadaveric donor transplantation. *Transplantation.* 2001 Jul;72(1):69-76.

Knoll G, Cockfield S, Blydt-Hansen T, Baran D, Kiberd B, Landsberg D. Canadian Society of Transplantation: Consensus Guidelines on Eligibility for Kidney Transplantation. 2005 Nov;173(10):S1-S22.

Koo DDH, Roberts ISD, Quiroga I, Procter J, Barnardo MCNM, Sutton M. C4d deposition in early renal allograft protocol biopsies. *Transplantation.* 2004 Aug;78(3):398-403.

Kriz W, Hartmann I, Hosser H, Hähnel B, Kränzlin B, Provoost AB, et al. Tracer studies in the rat demonstrate misdirected filtration and peritubular spreading in nephrons with segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Mar;12(3):496-506.

Kyllönen LE, Salmella KT, Eklund BH, Halme LE, Höckerstedt KA, Isoniemi HM. Long-term results of 1047 cadaveric kidney transplantations with special emphasis on initial graft function and rejection. *Transplant Int.* 2000 Mar;13(2):122-128.

Lakkis FG. Where is the alloimmune response initiated? *Am J Transplant.* 2003 Mar;3(3):241-242.

Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med.* 1990 Dec;171(6):307-314.

Laskowski IA, Pratschke J, Wilhelm MJ, Dong VM, Beato F, Taal M, et al. Anti-CD28 monoclonal antibody therapy prevents chronic rejection of renal allografts in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Feb;13(2):519-527.

Laupacis A, Keown P, Pus N, Krueger H, Ferguson B. A study of the quality of life and cost-utility of renal transplantation. *Kidney Int.* 1996 Jul;50(1):235-242.

Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation.* 2002 May;(9):1373-1381.

LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008 Sep;112(5):1570-1580.

Lechler RJ, Batchelor JR. Immunogenicity of retransplant rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second receptor. *J Exp Med.* 1982 156:1835-1841.

Lefacheur 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 Apr;7(4):832-841.

Legendre C, Thervet E, Skhiri H, Mamzer-Bruneel MF, Cantarovich F, Noël LH, et al. Histologic features of chronic allograft nephropathy revealed by protocol biopsies in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 1998 Jun;65(11):1506-1509.

Lehnhardt A, Mengel M, Pape L, Ehrich JHH, Offner G, Strehlau J. Nodular B-cell aggregates associated with treatment refractory renal transplant rejection resolved by rituximab. *Am J Transplant.* 2006 Apr;6(4):847-851.

Leitenberg D, Bottomly K. Regulation of naïve T cell differentiation by varying the potency of TCR signal transduction. *Semin Immunol.* 1999 Aug;11(4):283-292.

Lerut E, Kuypers DR, Verbeken E, Cleutjens J, Vlaminck H, Vanrenterghem Y, et al. Acute rejection in non-compliant renal allograft recipients: a distinct morphology. *Clin Transplant.* 2007 May/Jun;21(4):344-351.

Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR, Gough J, McKenna RM, Grimm PC, et al. Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation.* 1998 Dec;66(12):1673-1681.

Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Jan;15(1): 1-12.

Lorenz M, Regele H, Schilinger M, Exner M, Rasoul-Rockenschaub S, Wahrmann M, et al. Risk factors for capillary C4d deposition in kidney allografts: evaluation of a large study cohort. *Transplantation*. 2004 Aug;78(3):447-452.

Magil AB, Tinckam KJ. Focal peritubular capillary C4d deposition in acute rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 May;21(5):1382-1388.

Manfro RC, Gonçalves LFS. Transplante renal: imunologia e farmacologia das drogas imunossupressoras. In: Barros E, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LFS. 3ª., editores. *Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento*. Porto Alegre: Artmed c2006. p. 442-454.

Mannon RB. Polyomavirus nephropathy: what have we learned? *Transplantation*. 2004 May;77(9):1313-1318.

Marcussen N, Olsen TS, Benediktsson H, Racusen L, Solez K. Reproducibility of the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation*. 1995 Nov;60(10):1083-1089.

Martins HL, Silva C, Martini D, Noronha IL. Detection of B lymphocytes (CD20+) in renal allograft biopsy specimens. *Transplant Proc*. 2007 Mar;39(2):432-434.

Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, Ma JZ, Kasiske BL. Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int*. 1996 Feb;49(2):518-524.

Matas AJ, Humar A, Gillingham KJ, Payne WD, Gruessner RWG, Kandaswamy R, et al. Five preventable causes of kidney graft loss in the 1990s: a single-center analysis. *Kidney Int*. 2002 Aug;62(2):704-714.

Mauyyedi S, Pelle PD, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolkoff-Rubin NE, et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Mar;12(3):574-582.

Mauyyedi S, Crespo M, Collins B, 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 Mar;13(3):779-787.

Mazzucci E, Lucon AM, Nahas WC, Neto ED, Saldanha LB, Sabbaga E, et al. Histological outcome of acute cellular rejection in kidney transplantation after treatment with methylprednisolone. *Transplantation*. 1999 Feb;67(3):430-434.

Meehan SM, Domer P, Josephson M, Donoghue M, Sadhu A, Ho LT, et al. The clinical and pathological implications of plasmacytic infiltrates in percutaneous renal allograft biopsies. *Hum Pathol* 2001 Feb;32(2): 205-215.

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 a recent era. *Transplantation*. 2000 Oct;70(7):1098-1100.

Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Port FK, Andorfer JA, Cibrik DM, Kaplan B. Survival improvement among patients with end-stage renal disease: trends over time for transplant recipients and waitlisted patients. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Jun;12(6):1293-1296.

Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant*. 2004 Mar;4(3):378-383.

Meleg-Smith S, Gauthier PM. Abundance of interstitial eosinophils in renal allografts is associated with vascular rejection. *Transplantation*. 2005 Feb;79(4): 444-450.

Mengel M, Bogers J, Bosmans JL, Serón D, Moreso F, Carrera M, et al. Incidence of C4d stain in protocol biopsies from renal allografts: results from a multicenter trial. *Am J Transplant*. 2005 May;5(5):1050-1056.

Mengel M, Sis B, Halloran PF. SWOT analysis of Banff: strengths, weaknesses, opportunities and threats of the International Banff Consensus Process and Classification System for Renal Allograft Pathology. *Am J Transplant*. 2007 Oct;7(10):2221-2226.

Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat, F. The differential diagnosis between rejection and cyclosporine toxicity. *Kidney Int*. 1995;48(Suppl.52):S-63-S-69.

Minervini MI, Torbenson M, Scantlebury V, Vivas C, Jordan M, Shapiro R, et al. Acute renal allograft rejection with severe tubulitis (Banff 1997 grade IB). *Am J Surg Pathol*. 2000 Apr;24(4):553-558.

Mizutani K, Terasaki P, Rosen A, et al. Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am J Transplant*. 2005 Sep;5(9):2265-2672.

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 Jul;78(2):181-185.

Moreso F, Seron D, O'Valle F, Ibernón M, Gomà M, Hueso M, et al. Immunophenotype of glomerular and interstitial cells in protocol renal allograft biopsies and histological diagnosis. *Am J Transplant*. 2007 Dec;7(12):2739-2747.

Nadasdy GM, Bott C, Cowden D, Pelletier R, Ferguson R, Nadasdy T. Comparative study for the detection of peritubular capillary C4d deposition in human renal allografts using different methodologies. *Hum Pathol*. 2005 Nov;36(11):1178-1185.

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CLS, O'Connell P, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 2003 Dec;349(24):2326-2333.

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell P, Allen RDM, Chapman JR. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation.* 2004a Jul;78(2):242-249.

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell P, Chapman JR, Allen RDM. Delta analysis of posttransplantation tubulointerstitial damage. *Transplantation.* 2004b Aug;78(3):434-441.

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell P, Allen RDM, Chapman JR. Evolution and pathophysiology of renal-transplant glomerulopathy. *Transplantation.* 2004c Aug;78(3):461-468.

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell P, Chapman JR, Allen RDM. Calcineurin inhibitor nephropathy toxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation.* 2004d Aug;78(4):557-565.

Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation.* 2006 Mar;81(5):643-654.

Nickeleit V, Vamvakes EC, Pascual M, Poletti BJ, Colvin RJ. The prognostic significance of significant arterial lesions in acute allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Jul;9(7):1301-1308.

Nickeleit 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 Jan;13(1):242-251.

Nickeleit V, Mihatsch MJ. Kidney transplants, antibodies and rejection: is C4d a magic marker? *Nephrol Dial Transpl.* 2003 Nov;18(11):2232-2239.

Nickerson P, Jeffery J, Gough J, McKenna R, Grimm P, Cheang M, et al. Identification of clinical and histopathologic risk factors for diminished renal function 2 years posttransplant. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Mar;9(3):482-487.

Nicholson ML, Walter RJ, Bicknell GR. Renal transplant fibrosis correlates with intragraft expression of tissue inhibitor of metalloproteinase messenger RNA. *Br J Surg.* 2002 Jul;89(7):933-937.

Noorchashm H, Reed AJ, Rostami SY, Mozaffari R, Zekavat G, Koeberlein B, et al. B-cell mediated antigen presentation is required for the pathogenesis of acute cardiac allograft rejection. *J Immunol.* 2006 Dec;177(11):7715-7722.

Ojo AO, Hanson JA, Wolfe RA, Leichtman AB, Agodoa LY, Port FK. Long-term survival in renal transplant recipients with graft function. *Kidney Int.* 2000a Jan;57(1):307-313.

Ojo AO, Meier-Kriesche HU, Hanson JA, Leichtman AB, Cibrik D, Magee JC, et al. Mycophenolate mofetil reduces late renal allograft loss independent of acute rejection. *Transplantation*. 2000b Jun;69(11):2405-2409.

Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study. *Kidney Int*. 1998 Jan;53(1):217-222.

Pallardó MLM, Sancho CA, Capdevilla PL, Franco EA. Acute rejection and late renal transplant failure: risk factors and prognosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Jun;19(Suppl.3):38-42.

Pape L, Henne T, Offner G, Strehlau J, Ehrich JHH, Mengel M, et al. Computer-assisted quantification of fibrosis in chronic allograft nephropathy by picrosirius red-staining: a new tool for predicting long-term graft function. *Transplantation*. 2003 Sep;76(6):955-958.

Paraskevas S, Kandaswamy R, Humar A, Gillingham KJ, Gruessner RW, Payne WD, et al. Risk factors for rising creatinine in renal allografts with 1 and 3 years survival. *Clin Transplant*. 2006 Nov-Dec;20(6):667-672.

Paul L. Chronic renal transplant loss. *Kidney Int*. 1995 Jun;47(6):1491-1499.

Penfield JG, Wang Y, Li S, Kielar MA, Sicher SC, Jeyarajah DR, et al. Transplant surgery injury recruits recipient MHC class II-positive leukocytes into the kidney. *Kidney Int*. 1999 Nov;56(5):1759-1769.

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 Apr;7(8):1106-1112.

Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vicente F, Filo RS. The FK506 Kidney Transplant Study Group. A comparison of Tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. *Transplantation*. 1997 Apr;63(7):977-983.

Ponticelli C. Renal transplantation 2004: where do we stand today? *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Dec;19(12):2937-2947.

Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, Kusaka M, Beato F, Tullius SG, et al. Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Nov;12(11):2474-2481.

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 Feb;55(2):713-723.

Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch M, 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 Jun;3(6):708-714.

Reff M, Caner K, Chambers K, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, et al. Depletion of B cells in vivo by chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994 Jan;83(2):435.

Regele H, Exner M, Watschinger B, Wenter C, Wahrmann M, Österreicher C, et al. Endothelial C4d deposition is associated with inferior kidney allograft outcome independently of cellular rejection. *Nephrol Dial Transpl*. 2001. Oct;16(10):2058-2066.

Regele H, Böhmig GA, Habicht A, Gollowitzer D, Schillinger M, Rockenschaub S, et al. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Sep;13(9):2371-2380.

Rocha PN, Butterly DW, Greenberg A, Reddan DN, Tuttle-Newhall J, Collins BH, et al. Beneficial effect of plasmapheresis and intravenous immunoglobulin on renal allograft survival of patients with acute humoral rejection. *Transplantation*. 2003 May;75(9):1490-1495.

Ruger BM, Erb KJ, He Y, Lane JM, Davis PF, Hasan Q. Interleukin-4 transgenic mice develop glomerulosclerosis independent of immunoglobulin deposition. *Eur J Immunol*. 2000 Sep;30(9):2698-2703.

Sarioglu S, Sis B, Celik A, Tekis D, Kavucku S, Bora S, et al. Quantitative digital histochemistry with methenamine silver staining in renal allograft biopsies excluding pure chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc*. 2006 Mar;38(2):490-491.

Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsie SC, Satterwhite T, Masek M. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med*. 2003 Jul;349(2):125-138.

Sayegh MH. Why do we reject a graft? Role of indirect allorecognition in graft rejection. *Kidney Int*. 1999 Nov;56(5):1967-1979.

Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later – progress, challenges and promises. *N Engl J Med*. 2004 Dec;351(26):2761-2766.

Scheepstra C, Bemelman FJ, van der Los C, Rowshani AT, van Donselaar-van der Pant KAMI, Idu MM, et al. B cells in cluster or in scattered pattern do not correlate with clinical outcome of renal allograft rejection. *Transplantation*. 2008 Sep;86(6):772-780.

Schnuelle P, Lorenz D, Trede M, van der Woude FJ. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during follow-up. *J Am Soc Nephrol*. 1998 Nov;9(11):2135-2141.

Schwartz A, Mengel M, Gwinner W, Radermacher J, Hiss M, Kreipe H, et al. Risk factors for chronic allograft nephropathy after renal transplantation: a protocol biopsy study. *Kidney Int*. 2005 Jan;67(1):341-348.

Seemayer CA, Gaspert A, Nickeleit V, Mihatsch M. C4d staining of renal allograft biopsies: a comparative analysis of different staining techniques. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Feb;22(2):568-576.

Segerer S, Böhmig GA, Exner M, Colin Y, Cartron JP, Kerjaschki D, et al. When renal allografts turn DARC. *Transplantation*. 2003 Apr;75(7):1030-1034.

Sementilli A, David DR, Malheiros D, Visona I, Pegas KL, Franco M, et al. Patologia do transplante renal: achados morfológicos principais e como laudar as biópsias. *J Bras Patol Med Lab*. 2008 Ago;44(4):293-304.

Serón D, Moreso F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Cañas C, et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int*. 1997 Jan;51(1):310-316.

Sezer S, Ozdemir FN, Akcay A, Colak T, Kut A, Haberal M. Contribution of late acute rejection to long-term renal allograft survival in patients with chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc*. 2003 Nov; 35(7):2637-2638.

Shihab FS, Yamamoto T, Nast CC, Cohen AH, Noble NA, Gold LI, et al. Transforming growth factor-beta and matrix protein expression in acute and chronic rejection of human renal allografts. *J Am Soc Nephrol*. 1995 Aug;6(2):286-294.

Shimizu K, Schonbeck U, Mach F, Libby P, Mitchell RN. Host CD40 ligand deficiency induces long-term allograft survival and donor-specific tolerance in mouse cardiac transplantation but does not prevent graft arteriosclerosis. *J Immunol*. 2000 Sep;165(6):3506-3518.

Shishido S, Asanuma H, Nakai H, Mori Y, Satoh H, Kamimaki I. The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Apr;14(4):1046-1052.

Sigal LH. B cells, factories, and immunomodulators. *J Clin Rheumatol*. 2006 Jun;12(3):152-157.

Sijpkens YJ, Joosten SA, Wong MC, Dekker FW, Beniktsson H, Bajema IM, et al. Immunologic risk factors and glomerular C4d deposits in chronic transplant glomerulopathy. *Kidney Int*. 2004 Jun;65(6):2409-2418.

Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AC, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*. 1993 Aug;44(2):411-422.

Solez K, Hansen HE, Kornerup HJ, Madsen S, Sørensen AW, Pedersen EB, et al. Clinical validation and reproducibility of the Banff schema for renal allograft pathology. *Transplant Proc*. 1995 Feb;27(1):1009-1011.

Solez K, Cavallo T, Benediktsson H, Croker B, Demetris AJ, Drachenberg C, et al. Report of the Third Banff Conference on Allograft Pathology (July 20-24, 1995) on classification and lesion scoring in renal allograft pathology. *Transplant Proc.* 1996 Feb;28(1):441-444.

Solez K, Vicenti F, Filo R. Histopathological findings from 2-year protocol biopsies from a US multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus versus cyclosporine: a report of the FK506 kidney transplant study group. *Transplantation.* 1998 Dec;66(12):1736-1740.

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 Mar;7(3):518-526.

Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 Classification of Renal Allograft Pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* 2008 Apr;8(4):753-760.

Stuht S, Gwinner W, Franz I, Schwartz A, Jonigk D, Kreipe H, et al. Lymphatic neoangiogenesis in human renal allografts: results from sequential protocol biopsies. *Am J Transplant.* 2007 Feb;7(2):377-384.

Suthanthiran M. Molecular analyses of human renal allografts: differential intragraft gene expression during rejection. *Kidney Int.* 1997 Mar;58(Suppl):S15-S21.

Szabo A, Heeman U. Ischemia reperfusion injury and chronic allograft rejection. *Transplant Proc.* 1998 Dec;30(8):4281-4284.

Szot GL, Zhou P, Sharpe AH, He G, Kim O, Newell KA, et al. Absence of host B7 expression is sufficient for long-term murine vascularized heart allograft survival. *Transplantation.* 2000 Mar;69(5):904-909.

Takada M, Nadeau KC, Hancock WW, Mackenzie HS, Shaw GD, Waaga AM, et al. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation.* 1998 Jun;65(12):1533-1542.

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 Transpl.* 2004 Jul;4(7):1033-1041.

Tantravahi J, Womer KL, Kaplan B. Why hasn't eliminating acute rejection improved graft survival? *Annu Rev Med.* 2007 58:369-385.

Tarlington DM, Batista F, Smith KGC. The B-cell response to protein antigens in immunity and transplantation. *Transplantation.* 2008 Jun;85(12):1698-1704.

Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant.* 2003 Jun;3(6):665-673.

Terasaki PI, Cai J. Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. *Transplantation*. 2008 Aug;86(3):377-383.

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;61(11):1586-1592.

Truong LD, Barrios R, Adrogué HF, Gaber LW. Acute antibody-mediated rejection of renal transplant. *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Aug;131(8):1200-1208.

Tsai EW, Rianthavorn P, Gjertson DW, Wallace WD, Reed EF, Ettenger RB. CD20+ lymphocytes in renal allografts are associated with poor survival in pediatric patients. *Transplantation*. 2006 Dec;82(12):1769-1773.

UNOS: United Network for Organ Sharing [Internet]. St. Richmond (USA): United Network for Organ Sharing (UNOS) / Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN), c2008 [citado 2008 Dec 20]. Disponível em <http://www.unos.org/>.

Vaillant B, Chiaramonte MG, Cheever AW, Soloway PD, Wynn TA. Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the Th response: new insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *J Immunol*. 2001 Dec;167(12):7017-7026.

Van Sasse JLCM, van der Woode FJ, Thorogood J, Hollander AAMJ, van Es LA, Weening JJ, et al. The relation between acute vascular and interstitial renal allograft rejection and subsequent chronic rejection. *Transplantation*. 1995 May;59(9):1280-1285.

Veronese FV, Manfro RC, Roman FR, Edelweiss MI, Rush DN, Dancea S, et al. Reproducibility of the Banff classification in subclinical kidney transplant rejection. *Clin Transplant*. 2005 Aug;19(4):518-521

Vongwiwatana A, Gourishankar S, Campbell PM, Solez K, Halloran PF. Peritubular capillary changes and C4d deposits are associated with transplant glomerulopathy but not IgA nephropathy. *Am J Transplant*. 2004 Jan;4(1):124-129.

Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner DC, Melk A, Halloran PF. Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: the role of tubular cells in fibrogenesis. *Am J Transplant*. 2005 Jun;5(6):1367-1374.

Wang L, Fraser CC, Kikly K, Wells AD, Han R, Coyle AJ, et al. B7-H3 promotes acute and chronic allograft rejection. *Eur J Immunol*. 2005 Feb;35(2):428-438.

Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LYC, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*. 1999 Dec;341(23):1725-1730.

Womer KL, Stone JR, Murphy B, Chandraker A, Sayegh MH. Indirect allorecognition of donor class I and II major histocompatibility complex peptides promotes the development of transplant vasculopathy. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Nov;12(11):2500-2506.

Wyburn KR, Jose MD, Wu H, Atkins RC, Chadban SJ. The role of macrophages in allograft rejection. *Transplantation*. 2005 Dec;80(12):1641-1647.

Xu H, Dhanireddy KK, Kirk AD. Human monocytes as intermediaries between allogeneic endothelial cells and allospecific T cells: a role for direct scavenger receptor-mediated endothelial membrane uptake in the initiation of alloimmunity. *J Immunol*. 2006 Jan;176(2):750-761.

Yamada AA, Sayegh MH. The CD154-CD40 costimulatory pathway in transplantation. *Transplantation*. 2002 Apr;73(1):S36-S39.

Yilmaz S, Tomlanovich S, Mathew T, Taskinen E, Paavonen T, Navarro M, et al. Protocol core needle biopsy and histologic Chronic Allograft Damage Index (CADI) as surrogate end point for long-term graft survival in multicenter studies. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Mar;14(3):773-779.

Yilmaz S, McLaughlin K, Paavonen T, Taskinen E, Monroy M, Aavik E, et al. Clinical predictors of renal allograft histopathology: a comparative study of single-lesion histology versus a composite, quantitative scoring system. *Transplantation*. 2007 Mar;83(6):671-676.

Zarkhin V, Li L, Sarwal M. "To B or not to B?" B-cells and graft rejection. *Transplantation*. 2008 Jun;85(12):1705-1714.

Zorn E, Miklos DB, Floyd BH, Mattes-Ritz A, Guo L, Soiffer RJ. Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation. *J Exp Med*. 2004 Apr;199(8):1133-1142.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar a presença de infiltrado celular rico em linfócitos B em biópsias de aloenxertos renais de doadores falecidos com diagnóstico de rejeição mediada por linfócitos T aguda.

2. Objetivos Específicos

2.1. Avaliar a relação da presença de infiltrado celular rico em linfócitos B em biópsias de aloenxertos renais de doadores falecidos com diagnóstico de rejeição mediada por linfócitos T aguda com características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes.

2.2. Avaliar a relação da presença de infiltrado celular rico em linfócitos B em biópsias de aloenxertos renais de doadores falecidos com diagnóstico de rejeição mediada por linfócitos T aguda com a sobrevida do enxerto.

2.3. Avaliar a relação da presença de infiltrado celular rico em linfócitos B em biópsias de aloenxertos renais de doadores falecidos com diagnóstico de rejeição mediada por linfócitos T aguda com a função do enxerto.

2.4. Avaliar a relação da presença de infiltrado celular rico em linfócitos B em biópsias de aloenxertos renais de doadores falecidos com diagnóstico de rejeição mediada por linfócitos T aguda com o tempo decorrido entre o transplante e o episódio de rejeição aguda.

2.5. Avaliar a relação da presença de infiltrado celular rico em linfócitos B em biópsias de aloenxertos renais de doadores falecidos com diagnóstico de rejeição

mediada por linfócitos T aguda com os parâmetros histopatológicos definidores do grau da rejeição aguda mediada por linfócitos T.

2.6. Avaliar a relação da presença de infiltrado celular rico em linfócitos B em biópsias de aloenxertos renais de doadores falecidos com diagnóstico de rejeição mediada por linfócitos T aguda com a marcação do C4d.

3. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

DETECTION OF B LYMPHOCYTES IN ACUTE T CELL-MEDIATED REJECTION OF RENAL ALLOGRAFTS FROM DECEASED DONORS

Abstract

Background – The presence and the role of B lymphocytes in renal allograft rejection have been investigated during the last few years. Some studies demonstrated association between the presence of cellular infiltrates rich in B lymphocytes and unfavorable outcomes. However other authors did not detect this relation. The objectives of this study are: evaluate the frequency of B lymphocyte-rich cellular infiltrates in biopsies with the histopathological diagnosis of acute T-cell mediated rejection and the impact of this infiltrates over long-term graft survival, renal function, and time interval between the transplantation and the rejection episode, their distribution in different rejection degrees, and their relation with C4d positivity.

Methods – One hundred thirty-three kidney allograft biopsies with the histopathological confirmation of acute T cell-mediated rejection graded according to Banff 07 pertaining to 89 patients who received a renal allograft from deceased donors were analyzed. Immunohistochemistry was used to detect B lymphocytes (anti-CD20) and concomitant antibody-mediated rejection (C4d analysis). The patients and their respective biopsies were divided in two groups: one group with cellular infiltrates rich in B lymphocytes (with 100 or more CD20-positive cells per 400-power field), the CD20-positive group, and another group without an infiltrate that fulfills this criterion, the CD-20 negative group. We evaluated graft survival during a five-year follow-up, graft function in this period, mean time between the transplantation and the acute

rejection episode, histopathological criteria distribution of acute T-cell mediated rejection and the relation with C4d staining.

Results – The positive group encompassed 40.4% of the patients and 31.6% of the biopsies. The analyses of graft survival, renal function, and mean time between the transplantation and the acute rejection episode did not demonstrate statistical difference between the two groups. There was no relation between CD20 and C4d staining. The CD20-positive group biopsies reached statistical significance with the presence of arteritis, severe tubulitis (t3), and intense interstitial inflammatory infiltrate (i3).

Conclusion – The presence of cellular infiltrates rich in B lymphocytes was not associated with lower graft survival, worse renal function, different time interval between transplantation and rejection episode and C4d positivity. However, the histopathological criteria of acute rejection severity and worse prognosis demonstrated statistically significant association with these infiltrates.

Key Words – Acute rejection, B lymphocytes, Graft survival, Renal transplantation.

Introduction

During the last few years, the incidence of acute rejection of kidney allografts episodes has declined. Simultaneously, the graft survival, especially in short terms, has reached substantial increments (1). Nevertheless, the long-term graft survival has not demonstrated similar progress. The main causes of long-term graft losses are the loss with a functioning kidney and the chronic lesions of the allograft (2). Additionally, the acute rejection episodes persist to have negative impact on graft survival (3,4,5).

The advances achieved through intense basic and clinical research have allowed the distinction of acute rejection in acute T cell-mediated rejection (acute TCMR) and acute antibody-mediated rejection (acute AMR). The diagnosis of acute TCMR is based on the observation of specific alterations in the renal biopsy. The diagnosis of acute AMR is based on a triad of findings. This triad is composed of histopathologic, immunopathologic (C4d positivity), and immunologic (presence of serum anti-donor antibodies) criteria (6,7,8,9).

Previously, acute TCMR was designated as acute cellular rejection (ACR) and the majority of the studies that approached it focused on the role of the T lymphocytes. The B lymphocytes received little emphasis. But more recently, evidences indicating a possible relevance of B lymphocytes in cases of acute TCMR have emerged. These new data associated the presence of consistent aggregates of B lymphocytes, mainly detected through immunohistochemistry, with the use of the monoclonal antibody anti-CD20, with different and unfavorable outcomes and variables (10,11,12). There are also therapeutic responses with one anti-B lymphocytes agent (rituximab) in cases of severe acute rejection, refractory to corticosteroids or antibody-mediated (13,14,15). Additionally, besides the traditional property of the transformation into cells with the capacity to produce antibodies (plasma cells), other immunologic functions have been

attributed to B lymphocytes (cytokines production, antigen presentation to T lymphocytes and T lymphocytes activation) (16). However, other studies did not find significant relation between the B cells infiltrates and unfavorable outcomes (17,18,19).

Most of the publications about B lymphocytes and acute rejection have different methodological limitations. These limitations include: small number of patients, simultaneous allocation allografts from deceased and live donors, restriction to pediatric patients, short time of follow-up, lack of C4d evaluation, and different criteria for the positivity of B lymphocytes (20).

This study intends to evaluate the possible association of cellular infiltrates rich in B lymphocytes detected in biopsies of renal allograft from deceased donors with the confirmed diagnosis of acute TCMR with graft survival, renal function, time between the transplantation and the acute rejection episode, histopathological parameters of diagnosis and degree of rejection, and C4d stain.

Material and Methods

Patients

The patients of the study are integrants of the adult individuals that were submitted to renal transplantation with allografts from deceased donors at the Santa Casa Hospital Complex of Porto Alegre (Brazil) from January 1st 1998 to December 31st 2003. Four hundred twenty-three patients were initially included. From this group, 112 patients had at least one episode of acute TCMR, confirmed by histopathologic examination, with a total of 179 biopsies (some patients had more than one episode). The biopsies were indicated by prolonged allograft dysfunction or suspicion of acute

rejection. The paraffin blocks with this material were searched. Six blocks were not available, 25 did not contain enough material and/or were not in safe conditions to be sectioned. After the initial analyses of the biopsies in proper conditions, fifteen biopsies were excluded because the criteria for the diagnosis of acute TCMR were not fulfilled. After these steps, 89 patients (79.4%) were effectively included in this study.

The patients were followed for, at least, five years. The glomerular filtration rate (GFR) was calculated through the Modified Diet in Renal Disease (MDRD) formula in the end of each one of the five years. For the pre-transplantation immunologic risk evaluation, the search for HLA class I was performed through panel-reactive antibodies (PRA), which was mainly (85 patients) consisted of enzyme-linked immunoabsorbent antibody (ELISA), and, in some cases (four patients), of anti-human globulins sensitized lymphotoxicity (AHG-LCT). The HLA compatibility patterns between donor and receptor were performing analyzing the loci A, B, and DR. The baseline immunosuppression of most patients consisted of the combination of cyclosporine, prednisone, and azathyoprine (72.4% of patients); cyclosporine, mycophenolate mofetil, and prednisone (18.3%); tacrolimus, azathyoprine, and prednisone (4.5%); cyclosporine and azathyoprine (1.1%); tacrolimus, mycophenolate mofetil, and prednisone (1.1%); rapamycin, azathyoprine, and prednisone (1.1%); and rapamycin, tacrolimus and prednisone (1.1%). Induction therapy was used in 21 (25.8%) patients: sixteen (18.0%) with basiliximab, five (5.6%) with daclizumab, and two (2.2%) with OKT3. The treatment of acute rejection episodes was a pulse with intravenous methylprednisolone. Thirteen patients (14.6%) had at least one episode that was not responsive to the pulse with intravenous methylprednisolone and were treated with thymoglobulin or OKT3.

This study was approved by the Ethics Committee of the Santa Casa Hospital

Complex of Porto Alegre and the Ethics Committee of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre.

Biopsies – Analysis of Histopathology and Immunohistochemistry

After the initial selection, 148 biopsies were analyzed. Among these, 133 (89.8%) were effectively included, as they presented available and adequate material and morphological criteria of acute TCMR. The fixation was performed in 10% buffered formalin and the tissue was submitted to conventional processing and paraffin embedding. Four-micrometer sections were performed and stained with hematoxylin-eosin (HE), periodic acid-Schiff (PAS), Masson's trichrome (MT), and periodic acid methenamine silver (PASM). The graduation of acute TCMR followed Banff 07 criteria.

The evaluation of C4d was performed only through immunohistochemistry, due to the retrospective character of the study and the unavailability of frozen material for the analysis with immunofluorescence. The antibody used was an anti-human-C4d rabbit polyclonal antibody (Biomedica Gruppe, Vienna, Austria). Sections with thickness of four micrometers were submitted to antigen retrieval with citrate buffer solution with humid heat at 92°C during twenty minutes. The dilution employed was 1:50. Brown-color solution of 3,3-diaminobenzidine and Harris hematoxylin were used to reveal and to counterstain the slides. The analysis followed the recommendations of Banff 07 classification, as the degrees were attributed according to the percentage of stained peritubular capillaries. The total negativity constituted the degree C4d0; staining greater than 0% to 10%, C4d1; greater than 10% to 50%, C4d2; and more than 50%, C4d3. The biopsies considered positive were those graded as C4d2 and C4d3. Figure 1 displays an example of a positive biopsy.

The detection of cellular infiltrates rich in B lymphocytes were also performed through immunohistochemistry. The antibody used was a CD20 monoclonal antibody (Dako, Carpinteria, CA). The dilution employed was 1:200 and the steps were the same described for C4d staining. The analyses consisted in the counting of stained cells with a magnification of 400X in the field with the greatest number of immunolabeled lymphocytes. The biopsies considered CD20-positive were those that achieved a minimum of 100 cells per field. The CD20-positive biopsies were divided in four categories: category 1, with 100 to 149 cells; category 2, with 150 to 199 cells; category 3, with 200 to 249 cells; and category 4, with 250 or more cells. Example of these positive categories and of a negative biopsy are displayed in figures 2 to 6.

In thirty-four patients, more than one biopsy was included, with a maximum of five (mean of 1.48 and a standard-deviation of 0.7). The patients with one or more biopsies C4d-positive and one or more CD20-positive were considered C4d-positive and CD20-positive, respectively. The defining CD20 category of the cases with more than one CD20-positive biopsy was the highest. The evaluation was performed by two pathologists blinded to clinical information.

Statistical Analysis

The data were stored and analyzed with the SPSS software, version 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). The continuous variables were expressed by mean and standard-deviation and analyzed by unpaired, two-tailed Student's t-test. Chi-square was used for categorical variables. Graft survival was analyzed with the Kaplan-Meier method. Significant differences was considered when $P < 0.05$.

Results

Clinical Characteristics

Demographic, clinical, and immunologic characteristics are displayed in table 1. Significant difference was observed only for the donor sex. The patients of the CD20-positive group were transplanted more frequently with graft from female donors ($P = 0,03$). Additionally, no significant difference was observed for the immunosuppression regimen between the two groups.

The graft survival of the CD20-positive group in the end of the first and second years posttransplant was, respectively, 83.3% and 75.0%. In the end of the third, fourth and fifth years, the graft survival kept stable in 72.2%. The graft survival of the CD20-negative group in the end of each of the initial five years posttransplant was, respectively, 86.8%, 81.1%, 81.1%, 77.3%, and 69.81%. No statistically significant difference was observed in any of these periods. The five-year graft survival curve is showed in figure 7. Even when the C4d-positive patients were excluded, no statistical difference was observed for graft survival.

The GFR, calculated through MDRD formula, were lower and the serum creatinine levels were higher in the CD20-positive group in the end of all the five initial years. However, these differences did not reach statistical significance in any of these periods. These data are summarized in table 2.

The mean time interval between the rejection episodes in which the biopsies showed CD20 positivity was 65.4 days (range of seven to 222 days). This mean was 53.4 days (range of five to 1,280 days) for the rejection episodes without CD20 positivity in the biopsies. There was no statistical difference in these data ($P = 0.60$).

Analysis of Histopathology and Immunohistochemistry

Among the 89 patients included in the study, 55 (61.8%) had one biopsy analyzed; 27 (30.3%), two biopsies; six (6.7%), three biopsies; and one (1.1%), five biopsies. The maximal acute TCMR grade of each patient was distributed as follows: grade IA, 48 individuals (53.9%), grade IB, 31 (34.8%); grade IIA, three (3.4%); grade IIB, five (5.6%); and grade III, two (2.2%). The CD20-positive group was constituted of 36 patients (40.4%). According to the CD20 positivity categories their distribution was fifteen (41.6%) in category 1, sixteen (44.4%) in category 2, three (8.3%) in category 3, and two (5.5%) in category 4.

The distribution of acute TCMR grades of the 133 biopsies was 80 (60.2%) grade IA, 41 (30.8%) grade IB, three (2.3%) grade IIA, seven (5.3%) grade IIB, and two (1.5%) grade III. Cellular infiltrates rich in B lymphocytes were found in 42 biopsies (31.6%). Among these positive biopsies, 22 (61.1%) were classified in category 1; seventeen (47.2%), in category 2; three (8.3%), in category 3; two (5.5%), in category 4. The presence of this infiltrate was associated with intense interstitial inflammatory infiltrate (i3) and severe tubulitis (t3) and with the presence of arteritis. Of the CD20-positive biopsies, twenty (47.6%) exhibited interstitial inflammatory infiltrate graded as i3 and 32 (76.2%) the tubulitis was graded as t3. Among the CD20-negative biopsies, the frequency for these grades were 26 (28.5%) and 23 (25.2%), respectively ($P = 0.032$ for interstitial inflammatory infiltrate and $P < 0.001$ for tubulitis). Arteritis was detected in twelve biopsies, and nine (75.0%) of these were CD20-positive ($P = 0.001$). These data are displayed in table 3.

The analysis of C4d stain revealed positivity in 28 biopsies (21,0%), pertaining to 23 patients (25,8%). The distribution of the grades of staining follows: C4d0, 89 (66.9%); C4d1, sixteen (12.0%); C4d2, nine (6.76%); and C4d3, nineteen (14.3%).

There was no association between C4d positivity and the presence of cellular infiltrate rich in B lymphocytes, either when the patients were analyzed ($P = 0.40$) as well when the biopsies were analyzed ($P = 0.70$).

Discussion

This study includes the largest number of adult patients with renal allografts from deceased donors among the publications approaching acute TCMR and B lymphocytes. The criterion for the positivity of B lymphocytes adopted in our study follows what was initially proposed by Bagnasco et al., in which 100 or more stained cells observed in a field of high magnification (400X) are necessary to a biopsy be considered positive (18). There are other adopted criteria. Sarwal et al. proposed a more restrictive count (275 cells per high power field) and Kayler et al. employed a less restrictive (fifteen cells per high power field) (10,17). The utilization of the criterion of 100 positive cells is based on three basic reasons. First, few biopsies reach 275 cells, what makes difficult the comparisons between groups. The adoption of fifteen cells as a minimum would lead to an excess, possibly the majority, of positive biopsies. Finally, the employment of the same criterion in different studies allows comparable results. Using the number of 100 cells, 31.6% of biopsies were positive in our study, what is very similar to the 30% of positivity reported by Bagnasco et al. (18).

Graft survival was shorter in the CD20-positive group during the first four years posttransplant, but without statistical significance. In the end of the fifth year, graft survival was shorter in the CD20-negative group, but also without significance. Serum creatinine levels were higher and GFR was lower in the CD20-positive group in the end of each one of the five years of follow-up, but these data did not reach statistically relevant difference. Additionally, the mean time interval between the transplantation

and the rejection episodes in which the biopsies showed CD20 positivity was higher, but not statistically different.

These results replicate the three publications with the largest number of patients, albeit using distinct CD20 positivity criteria, available. Bagnasco et al., with the same threshold of our study, analyzed the prognosis value of B lymphocytes in 56 patients (34 with renal allografts from deceased donors). Allograft function was evaluated during the rejection episodes and in the four years of follow-up. Graft survival was registered during four years of follow-up. No significant difference was observed in graft survival rate (18). Kayler et al. did not detect any influence of B lymphocytes on rejection posttransplant time, corticosteroid refractoriness, serum creatinine levels, and graft survival. However the quantification of B lymphocytes aggregates was not performed with a sufficiently restrictive criterion and a considerable number of patients were submitted to particular protocols (pretreatment with anti-thymocyte globulin or with alemtuzumab) (17). Scheepstra et al. divided CD20 positivity in aggregates and in scattered cells, and this second pattern was subdivided in five scores according to the mean of positive cells counted in high power fields of the biopsy. Fifty-four biopsies with the diagnosis of acute rejection were analyzed, comprising 50 patients (40 with allografts from deceased donors). There was no association of any pattern of positivity with graft losses, therapeutic responses, and serum creatinine levels after six and twelve months posttransplant (19). Nevertheless, one must notice that the present study and the other publications revised did not include numerous cohorts. This potential limitation can result in type beta error, in which differences that really exist are not detected or do not reach statistical significance.

The histopathological findings of presence of arteritis, severe tubulitis (t3), and intense interstitial inflammatory infiltrate extension (i3) were associated, with statistic

significance, with the presence of B lymphocytes infiltrate. These associations had not been reported in the previous studies. The relevance of these findings is based on the fact that these parameters provide the basis to the diagnosis and the graduation of acute TCMR and on the association of the presence of arteritis and higher grade of tubulitis with unfavorable outcomes. The clinical and prognostic relevance of the presence of arteritis was proved in the first studies of Banff classification validation (21,22). The prognostic importance of severe tubulitis was more recently evaluated by Minervini et al. It was demonstrated that graft losses and serum levels of creatinine after one year posttransplant of the cases with t3 were similar to cases with v1, although serum creatinine of six months were higher in the v1 group. Both groups had more unfavorable outcomes compared to t1 and t2 groups, and outcomes better than those of v2 and v3 groups (23). The present study does not have the objective to provide fisiopathologic explanation to the relation found between higher grades of acute TCMR and cellular infiltrates rich in B lymphocytes. But there are evidences that support the stimulation provided by B lymphocytes to T lymphocytes. These stimuli are derived from the property of B lymphocytes to present antigens to T lymphocytes and from the production of cytokines and chemokynes, what can result in more numerous and more active T cells, leading to more intense inflammatory reaction in the graft with more severe histopathologic alterations (24,25,26). There is also evidence of correlation between B cells and T cells in acute rejection episodes (19). One possible caveat of our finding associating the presence of arteritis to B lymphocytes infiltrates can be the low proportion (9.1%) of biopsies with vascular lesions. However, there is another series with similar arteritis percentage (12.0%) (27).

The C4d positive staining was detected in 21.0% of biopsies, pertaining to 25.8% of the patients. These numbers are comparable to previous studies. The rates of

C4d positivity in biopsies reported by different authors in cases of acute TCMR range between 17.8% and 35.3% (28-32). The patients' C4d positivity frequencies range from 20% to 30% (33). Finally, there was no detected relation between positive staining of CD20 and C4d, as it was initially considered. This absence of association was also registered in the studies of Sarwal et al. and Scheepstra et al. In the series reported by Hippen et al., the three C4d-positive cases were CD20-negative (12).

Conclusion

The association of cellular infiltrates rich in B lymphocytes in biopsies with the criteria of acute TCMR with worse graft survival and worse graft function was not statistically proved by this study. There was association between these infiltrates and the histopathologic findings that define higher grades acute TCMR. However, the necessity of more studies, preferentially with prospective design and with more patients, encompassing more cases with arteritis, must be highlighted to elucidate the role of B lymphocytes in renal transplantation more consistently.

References

1. Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later – progress, challenges and promises. *N Engl J Med.* 2004 Dec;351(26):2761-2766.
2. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant.* 2004 Mar;4(3):378-383.
3. Cantarovich F, Carbajal R, Medioni J, Marmol A, Morelon E, Landais P. Clinical evaluation of early predictors of renal transplantation results. *Transplant Proc.* 2001 Feb-Mar;33(1-2):1192-1193.

4. Knight RJ, Burrows L, Bodian C. The influence of acute rejection on long-term renal allograft survival: a comparison of living and cadaveric donor transplantation. *Transplantation*. 2001 Jul;72(1):69-76.
5. Tantravahi J, Womer KL, Kaplan B. Why hasn't eliminating acute rejection improved graft survival? *Annu Rev Med*. 2007 58:369-385.
6. 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 Feb;55(2):713-723.
7. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch M, 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 Jun;3(6):708-714.
8. 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 Mar;7(3):518-526.
9. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 Classification of Renal Allograft Pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*. 2008 Apr;8(4):753-760.
10. Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Masek M. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 2003 Jul;349(2):125-138.
11. Hippen BE, DeMattos A, Cook WJ, Kew II CE, Gaston RS. Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. *Am J Transplant*. 2005 Sep;5(9):2248-2252.
12. Martins HL, Silva C, Martini D, Noronha IL. Detection of B lymphocytes (CD20+) in renal allograft biopsy specimens. *Transplant Proc*. 2007 Mar;39(2):432-434.
13. Becker YT, Becker BN, Pirsch JD, Sollinger HW. Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. *Am J Transplant*. 2004 Jun;4(6):996-1001.
14. Alausa M, Almagro U, Siddiqi N, Zuiderweg R, Medipalli R, Hariharan S. Refractory acute kidney transplant rejection with CD20 graft infiltrates and successful therapy with rituximab. *Clin Transplant*. 2005 Feb;19(1):137-140.
15. Lehnhardt A, Mengel M, Pape L, Ehrich JHH, Offner G, Strehlau J. Nodular B-cell aggregates associated with treatment refractory renal transplant rejection resolved by rituximab. *Am J Transplant*. 2006 Apr;6(4):847-851.
16. Cascalho M, Platt JL. Novel functions of B cells. *Crit Rev Immunol*. 2007 27(2):141-151.

17. Kayler LK, Lakkis FG, Morgan C, Basu A, Blisard D, Tan HP, et al. Acute cellular rejection with CD20-positive lymphoid clusters in kidney transplant patients following lymphocyte depletion. *Am J Transplant.* 2007 Apr;7(4):949-954.
18. Bagnasco SM, Tsai W, Rahman MH, Kraus ES, Barisoni L, Vega R, et al. CD20 positive infiltrates in renal allograft biopsies with acute cellular rejection are not associated with worse graft survival. *Am J Transpl.* 2007 Aug;7(8):1968-1973.
19. Scheepstra C, Bemelman FJ, van der Los C, Rowshani AT, van Donselaar-van der Pant KAMI, Idu MM, et al. B cells in cluster or in scattered pattern do not correlate with clinical outcome of renal allograft rejection. *Transplantation.* 2008 Sep;86(6):772-780.
20. Zarkhin V, Li L, Sarwal M. "To B or not to B?" B-cells and graft rejection. *Transplantation.* 2008 Jun;85(12):1705-1714.
21. Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, Flax S, Gaber AO. Correlation between Banff Classification, acute renal rejection scores, and reversal of rejection. *Transplant Proc.* 1995 Feb;27(1):1009.
22. Van Sasse JLCM, van der Woode FJ, Thorogood J, Hollander AAMJ, van Es LA, Weening JJ, et al. The relation between acute vascular and interstitial renal allograft rejection and subsequent chronic rejection. *Transplantation.* 1995 May;59(9):1280-1285.
23. Minervini MI, Torbenson M, Scantlebury V, Vivas C, Jordan M, Shapiro R, et al. Acute renal allograft rejection with severe tubulitis (Banff 1997 grade IB). *Am J Surg Pathol.* 2000 Apr;24(4):553-558.
24. Martin F, Chan C. B cell immunology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu Rev Immunol.* 2006 Feb;24:467-496.
25. Edwards JC, Cambridge G. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 2006 May;6(5):394-403.
26. Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, Nagy-Bojarski K, Watschinger B, Soleiman A, et al. Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Mar;15(3):603-612.
27. Shimizu T, Tanabe K, Tokumoto T, Shimmura H, Ishikawa N, Ishida H, et al. Histological features of renal allograft biopsies in ABO minor-mismatched kidney transplantation. *Clin Transplantation.* 2003 17(Suppl.10):9-13.
28. Aiello FB, Calabrese F, Rigotti P, Furian L, Marino S, Cusinato R, et al. Acute rejection and graft survival in renal transplanted patients with viral diseases. *Mod Pathol.* 2004 Feb;17(2):189-196.

29. Mengel M, Bogers J, Bosmans JL, Serón D, Moreso F, Carrera M, et al. Incidence of C4d stain in protocol biopsies from renal allografts: results from a Multicenter trial. *Am J Transplant*. 2005 May;5(5):1050-1056.
30. Seemayer CA, Gaspert A, Nickleit V, Mihatsch M. C4d staining of renal allograft biopsies: a comparative analysis of different staining techniques. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Feb;22(2):568-576.
31. Koo DDH, Roberts ISD, Quiroga I, Procter J, Barnardo MCNM, Sutton M. C4d deposition in early renal allograft protocol biopsies. *Transplantation*. 2004 Aug;78(3):398-403.
32. Magil AB, Tinckam KJ. Focal peritubular capillary C4d deposition in acute rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 May;21(5):1382-1388.
33. Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002 Nov;11(6):609-618.

Table 1. Demographic, clinical, and immunologic characteristics of renal transplanted patients with acute T cell-mediated rejection distributed according to the presence of cellular infiltrates rich in B lymphocytes in the biopsy(ies) detected through immunohistochemistry.

Characteristic	CD20-Positive	CD20-Negative	P Value
Receptor age (mean, SD; years)	40.14 (12.35)	40,57 (11.77)	0.870
Donor age (mean, SD; years)	43.18 (13.06)	37.04 (16,15)	0.074
Receptor gender (Male; n, %)	23 (63.3)	30 (56.6)	0.492
Donor gender (Male; n, %)	13 (37.1)	32 (61.5)	0.026*
Receptor ethnicity (White; n, %)	33 (91.6)	47 (88.6)	0.646
Patients with previous transfusions (n; %)	15 (57.6)	31 (77.5)	0.190
Number of transfusions (mean, SD)	3.15 (4.63)	3,35 (4.51)	0.865
Retransplant (n; %)	4 (11.1)	3 (5.6)	0.348
PRA positive (n; %)	8 (22.2)	8 (15.0)	0.390
HLA-A <i>mismatches</i> (mean, SD)	1.40 (0.65)	1.30 (0.63)	0.486
HLA-B <i>mismatches</i> (mean, SD)	1.48 (0.70)	1.55 (0.57)	0.072
HLA-DR <i>mismatches</i> (mean, SD)	0.73 (0.60)	0.92 (0.56)	0.196
Total HLA <i>mismatches</i> (mean, SD)	3.40 (1.11)	3.58 (1.04)	0.184
Cold ischemia time (hours; mean, SD)	19.15 (7.40)	20.16 (5.99)	0.508
Warm ischemia time (minutes; mean, SD)	0.21 (0.68)	0.50 (2.28)	0.471
Patients with induction therapy (n; %)	9 (25.0)	12 (22.6)	0.797
Patients with acute rejection episode(s) resistant to methylprednisolone (n; %)	7 (19.4)	6 (11.3)	0.287
Delayed graft function (n; %)	19 (52.7)	35 (66.0)	0.209
Patients with C4d positive (n; %)	11 (30.5)	12 (22.6)	0.403

Abbreviations – HLA (*human leucocitary antigen*), M (male), n (number), PRA (*panel-reactive antibodies*), SD (standard-deviation), W (white).

* Statistically significant value ($P < 0.05$).

Table 2. Serum creatinine levels and renal function evaluated through glomerular filtration rate, during a five-year post-transplant follow-up, of renal transplanted patients with acute T cell-mediated rejection distributed according to the presence of cellular infiltrates rich in B lymphocytes in the biopsy(ies) detected through immunohistochemistry.

Period	Variable (mean, SD)	CD20-Positive (mean, SD)	CD20-Negative (mean, SD)	P Value
One year	SCreatinine	2.29 (1.09)	1.94 (0.81)	0.116
	GFR	45.17 (20.28)	39.33 (19.48)	0.220
Two years	SCr	2.19 (0.93)	1.82 (0.73)	0.066
	GFR	39.05 (18.24)	47.86 (22.60)	0.088
Three years	SCr	2.13 (0.93)	1.88 (0.79)	0.239
	GFR	42.21 (21.09)	45.91 (20.19)	0.472
Four years	SCr	2.30 (1.02)	2.03 (0.95)	0.276
	GFR	40.00 (23.61)	41.07 (16.33)	0.828
Five years	SCr	2.31 (0.95)	2.15 (0.90)	0.484
	GFR	37.80 (19.57)	38.80 (16.73)	0.828

Abbreviations – GFR (glomerular filtration rate), SCr (serum creatinine), and SD (standard-deviation).

Units – Serum creatinine level (mg/dL) and GFR (mL/min).

Table 3. Morphological parameters and C4d status of the biopsies of renal transplanted patients with acute T cell-mediated rejection distributed according to the presence cellular infiltrates rich in B lymphocytes in the biopsies detected through immunohistochemistry.

Morphological Parameters	CD20-Positive Biopsies (n, %)	CD20-Negative Biopsies (n, %)	P Value
i2	22 (52.3)	65 (71.4)	0.032*
i3	20 (47.6)	26 (28.5)	0.032*
t2	10 (23.8)	68 (74.7)	<0.001*
t3	32 (76.1)	23 (25.2)	<0.001*
Without arteritis	33 (78.5)	88 (96.7)	0.001*
With arteritis	09 (21.4)	03 (3.2)	0.001*
C4d-positive	08 (19.0)	20 (21.9)	0.700
C4d-negative	34 (80.9)	71 (78.0)	0.700

Abbreviations – i2 (interstitial inflammatory infiltrate affecting 26% to 50% of the renal cortex), i3 (interstitial inflammatory infiltrate affecting more than 50% of the renal cortex), t2 (tubulitis with five to ten mononuclear cells in transversal sections of tubules or in group of ten tubular cells), and t3 (tubulitis with more than ten mononuclear cells in transversal sections of tubules or in group of ten tubular cells, or at least two areas of destruction of tubular basal membrane with interstitial inflammatory infiltrate classified as i2 or i3 and tubulitis t2 in any other focus of the biopsy).

* Statistically significant values

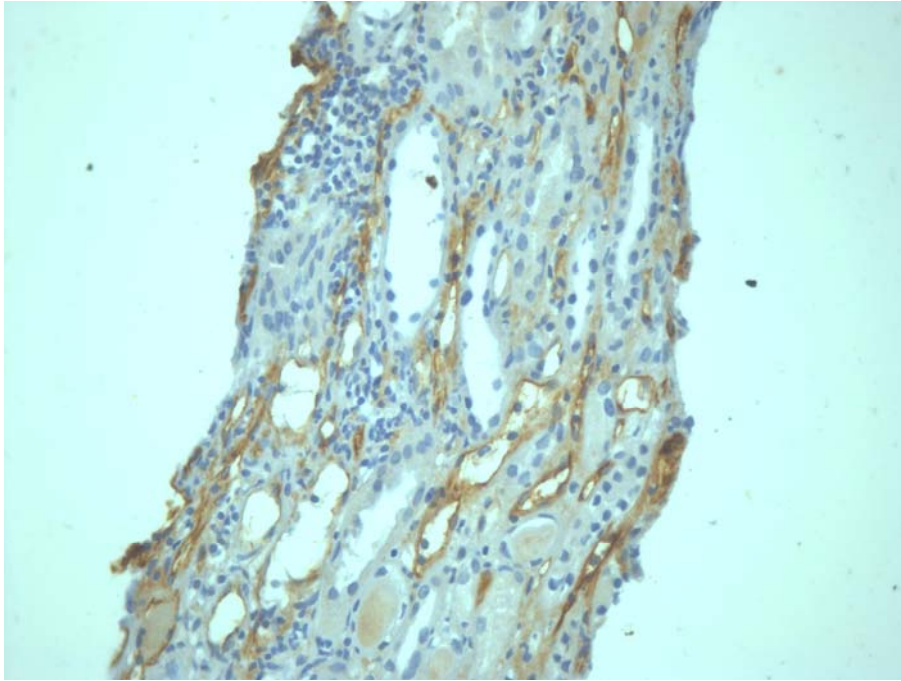


Figure 1 – C4d-positive biopsy (stained peritubular capillaries).

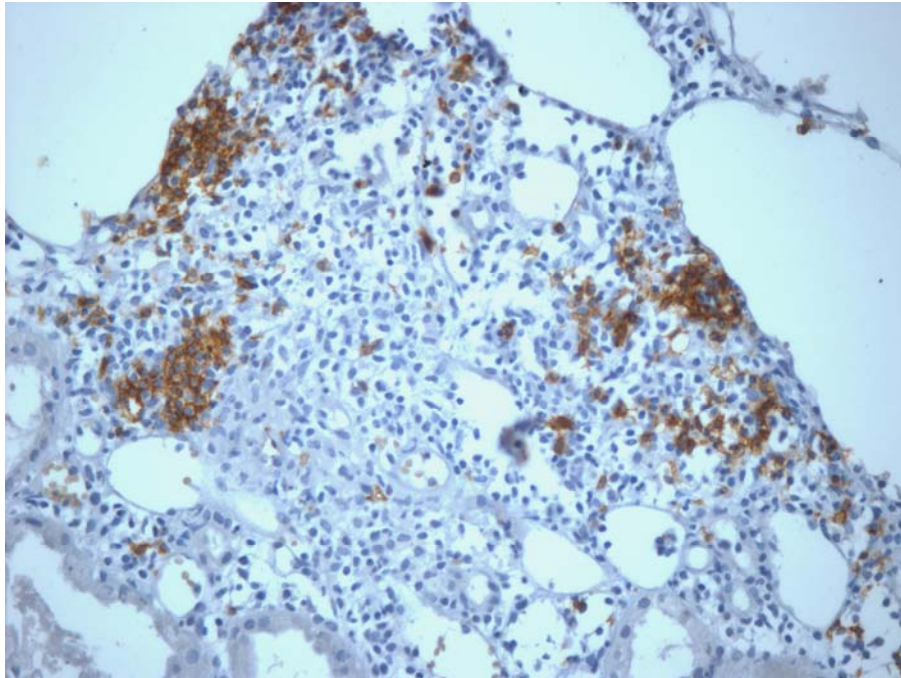


Figure 2 – CD20-positive biopsy category 1 (100 to 149 stained cells in a microscopic field of 400X).

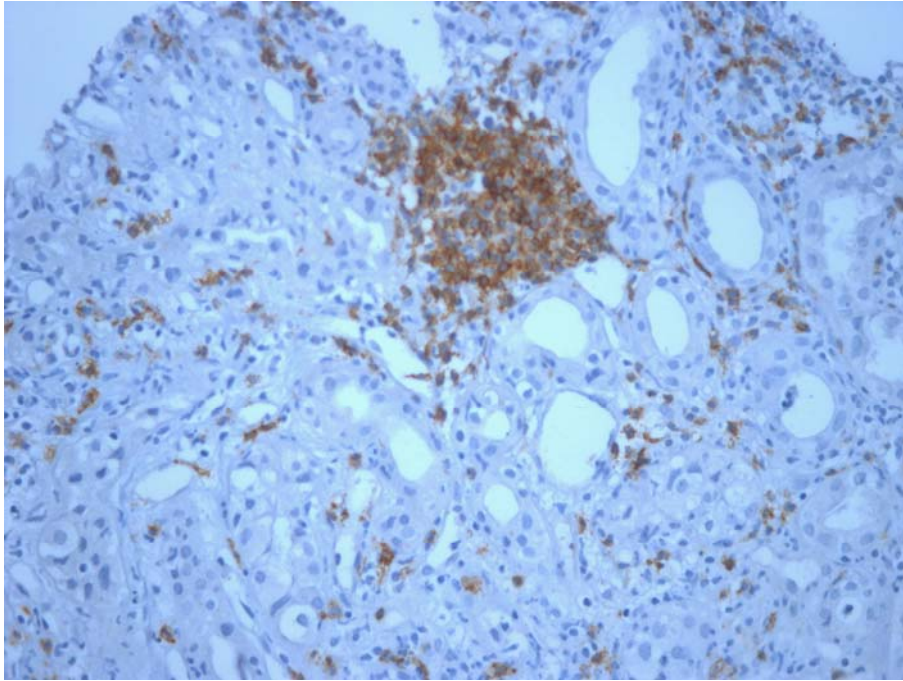


Figure 3 – CD20-positive biopsy category 2 (150 to 199 stained cells in a microscopic field of 400X).

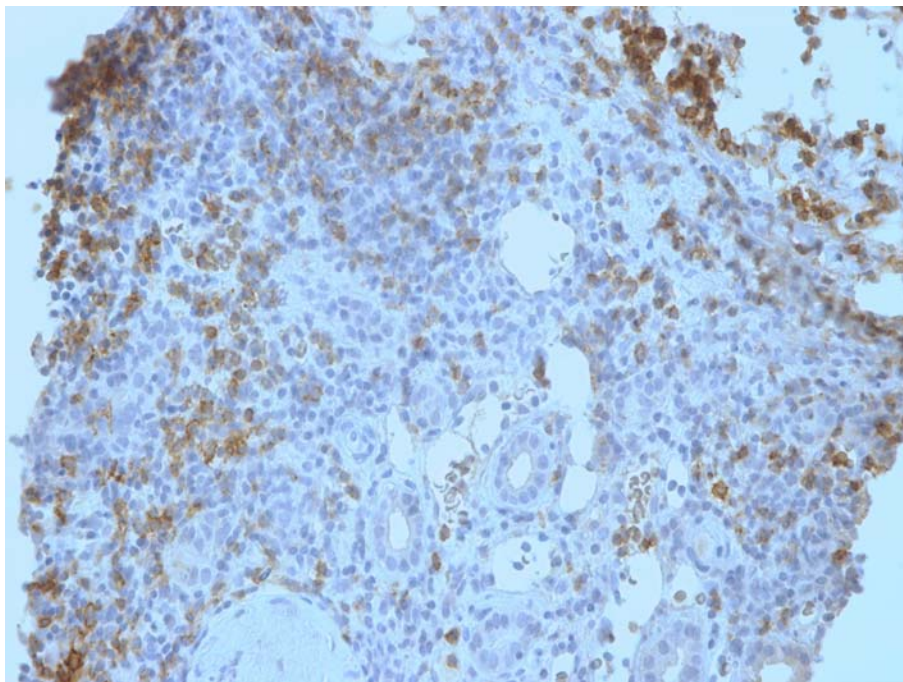


Figure 4 – CD20-positive biopsy category 3 (199 to 249 stained cells in a microscopic field of 400X).

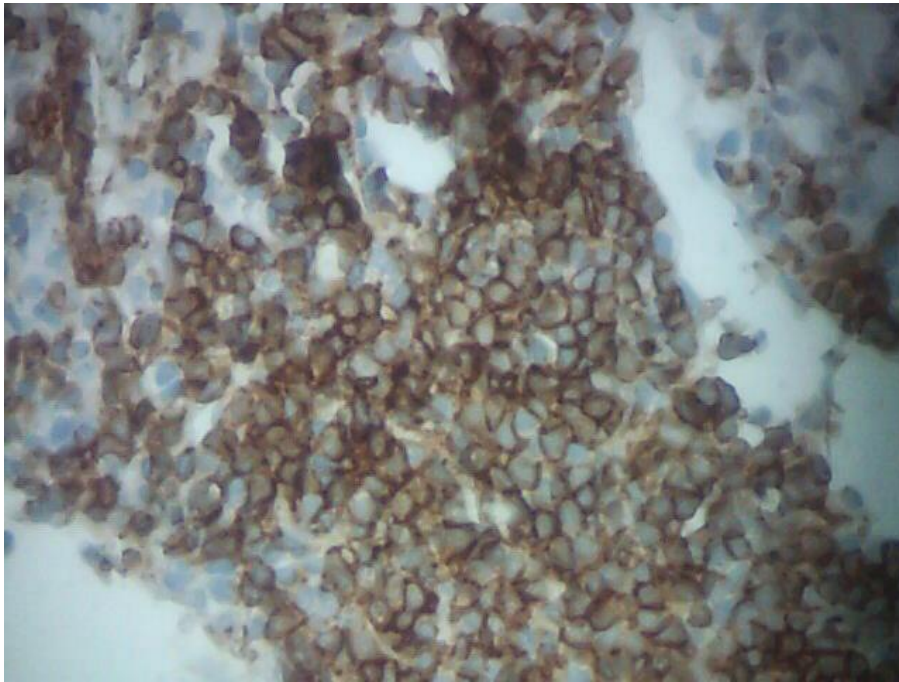


Figure 5 – CD20-positive biopsy category 4 (250 or more stained cells in a microscopic field of 400X).

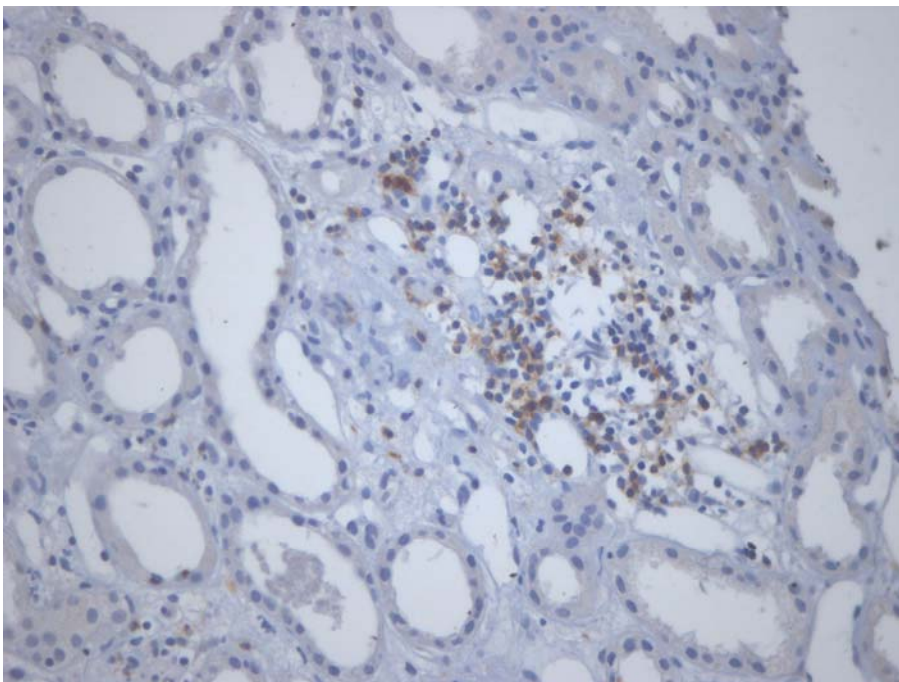


Figure 6 – CD20-negative biopsy (less than 100 positive cells in a microscopic field of 400X).

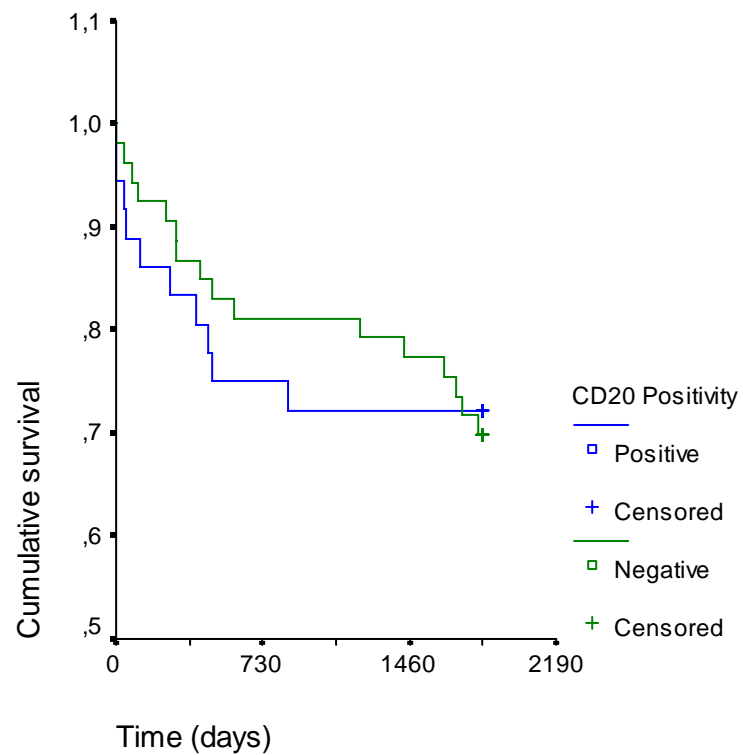


Figure 7 – Graft survival curve of CD20 positive and negative groups in a five-year posttransplant follow-up.

4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM PORTUGUÊS

DETECÇÃO DE LINFÓCITOS B EM REJEIÇÃO MEDIADA POR LINFÓCITOS T AGUDA EM ALOENXERTOS RENAIS DE DOADOR FALECIDO

Resumo

Introdução – A presença e o papel dos linfócitos B na rejeição ao aloenxerto renal têm sido investigados nos últimos anos. Alguns estudos demonstraram relação entre a presença de agregados de linfócitos B e desfechos desfavoráveis, enquanto outros trabalhos não detectaram esta relação. Os objetivos deste estudo são avaliar a frequência de infiltrado celular rico em linfócitos B em biópsias com diagnóstico histológico de rejeição mediada por linfócitos T aguda, seu impacto sobre a sobrevida do enxerto e a função renal em longo prazo, sua influência sobre o tempo decorrido entre o transplante e o episódio de rejeição aguda, sua distribuição nos diferentes graus de rejeição e sua relação com a positividade de C4d .

Métodos – Cento e trinta e três biópsias renais com diagnóstico confirmado de rejeição mediada por linfócitos T aguda graduadas de acordo com a Classificação de Banff de 2007, provenientes de 89 pacientes receptores de rim de doador falecido, foram analisadas. Utilizou-se método imunoistoquímico para a detecção de linfócitos B (anti-CD20) e para avaliação de rejeição mediada por anticorpos aguda concomitante (anti-C4d). Dividiram-se os pacientes e suas respectivas biópsias em dois grupos: um grupo com infiltrado celular rico em linfócitos B (100 ou mais células CD20 positivas em campo de 400 aumentos) e um grupo sem infiltrado que preencha este critério. Foram avaliados: sobrevida atuarial do enxerto e função renal ao longo de cinco anos de

acompanhamento, tempo médio entre o transplante e o episódio de rejeição aguda, critérios histopatológicos de rejeição mediada por linfócitos T aguda e a relação com a marcação de C4d.

Resultados – Foram considerados 40,4% dos pacientes e 31,6% das biópsias como pertencentes ao grupo CD20-positivo. As análises de sobrevida do enxerto, função renal e tempo médio entre o transplante e os episódios de rejeição aguda não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de pacientes. Não houve relação entre positividade de CD20 e marcação de C4d. As biópsias com infiltrado celular rico em linfócitos B mostraram associação estatisticamente significativa com presença de arterite, tubulite mais severa (t3) e com infiltrado inflamatório intersticial mais extenso (i3).

Conclusão – A presença de infiltrado celular rico em linfócitos B não foi associada à menor sobrevida, à pior função do enxerto, a intervalo de tempo maior entre o transplante e os episódios de rejeição aguda ou à rejeição mediada por anticorpos. No entanto, o infiltrado celular rico em linfócitos B foi associado a parâmetros histopatológicos indicadores de maior gravidade e de pior prognóstico, em casos de rejeição mediada por linfócitos T aguda.

Palavras-Chave – Linfócitos B, Rejeição aguda, Sobrevida do Enxerto, Transplante renal.

Introdução

Nos últimos anos, tem havido gradual declínio na incidência dos episódios de rejeição aguda ao enxerto renal. Paralelamente, a sobrevida do enxerto, particularmente em curto prazo, vem apresentando acréscimos substanciais (1). No entanto, a sobrevida do enxerto em longo prazo não acompanhou de maneira consistente estes progressos, sendo que as principais causas de perdas do enxerto em longo prazo são representadas pelo óbito com enxerto funcionante e pelas alterações crônicas do enxerto (2). Adicionalmente, episódios de rejeição aguda persistem tendo impacto negativo na sobrevida do enxerto (3,4,5).

Os avanços alcançados por meio de intensa pesquisa nas áreas básica e clínica permitiram a distinção dos episódios de rejeição aguda em rejeição mediada por anticorpos (AMR: *antibody-mediated rejection*) aguda e rejeição mediada por linfócitos T (TCMR: *T cell-mediated rejection*) aguda. O diagnóstico de AMR aguda baseia-se em uma tríade de achados. Esta tríade constitui-se de achados histopatológicos, imunopatológicos (positividade do C4d) e imunológicos (presença de anticorpos anti-doador séricos). A TCMR aguda tem seu diagnóstico estabelecido por meio das alterações histopatológicas observadas na biópsia do enxerto renal (6,7,8,9).

Previamente, a TCMR aguda era denominada rejeição aguda celular (RAC) e, a maioria dos estudos que a abordaram, caracteristicamente, destacou o papel dos linfócitos T, não recebendo os linfócitos B maior ênfase. No entanto, mais recentemente, surgiram evidências que sugerem uma possível importância dos linfócitos B em casos de TCMR aguda. Estes novos dados associaram a presença de infiltrados celulares ricos em linfócitos B, detectados principalmente por meio de método imunoistoquímico com a utilização de anticorpo específico para este grupo de linfócitos (anti-CD20), a diferentes desfechos e variáveis desfavoráveis (10,11,12). Há também

evidências de respostas terapêuticas com o uso de agente anti-linfócito B, o rituximab, em casos de rejeição aguda severa, refratária ao uso de corticosteróides ou mediada por anticorpos (13,14,15). Adicionalmente, além da tradicional propriedade de transformação em células produtoras de anticorpos (plasmócitos), os linfócitos B possuem outras funções imunológicas, como produção de citocinas, apresentação antigênica e ativação de linfócitos T, corroborando seu potencial envolvimento em respostas imunológicas complexas no contexto da rejeição aguda (16). Contudo, outros estudos não encontraram relação significativa entre estes agregados de linfócitos B e desfechos desfavoráveis (17,18,19).

A maior parte dos trabalhos abordando o tema dos linfócitos B na rejeição aguda apresenta limitações metodológicas significativas. Estas limitações são variadas e incluem: pequeno número de pacientes, alocação simultânea de transplantados renais com doadores falecidos e doadores vivos, restrição ao grupo de pacientes pediátricos, pouco tempo de seguimento, ausência de avaliação de C4d e critérios díspares de quantificação dos linfócitos B (20).

O presente estudo visa a avaliar a frequência e a possível associação de infiltrados celulares ricos em linfócitos B, detectados em biópsias de enxertos renais de doadores falecidos com diagnóstico confirmado de TCMR aguda, com a sobrevivência do enxerto, a função renal, o tempo decorrido do transplante até o episódio de rejeição aguda, o grau da rejeição e a positividade do C4d.

Material e Método

Pacientes

Os pacientes incluídos no presente estudo fazem parte do grupo de pacientes adultos submetidos a transplante renal com enxertos provenientes de doadores falecidos no Complexo Hospitalar da Irmandade Santa Casa de Porto Alegre no período de primeiro de janeiro de 1998 a 31 de dezembro de 2003. Neste intervalo, foram realizados 423 transplantes com estas características. Deste grupo, foram selecionados 112 pacientes com diagnóstico de TCMR aguda comprovados por laudo anatomopatológico, totalizando 179 biópsias (alguns pacientes tiveram mais de um episódio documentado) indicadas por disfunção prolongada do enxerto ou por suspeita de rejeição aguda. Procedeu-se a uma busca dos blocos de parafina contendo estas biópsias. Alguns blocos (seis) não foram disponibilizados, outros (25) não apresentavam material suficiente à inspeção e/ou não estavam em condições perfeitamente seguras para serem cortados ao micrótomo. Após a análise inicial das biópsias em condições adequadas, quinze foram excluídas do estudo por não haver critérios, conforme as últimas edições da Classificação de Banff para TCMR aguda, no material analisado. Após cumpridas estas etapas, 89 (79,4%) pacientes foram efetivamente incluídos no estudo, dentre os 112 inicialmente alocados. Referentes aos 89 pacientes, foram efetivamente incluídas 133 (74,3%) biópsias, dentre as 179 inicialmente registradas

Os pacientes foram acompanhados por período mínimo de cinco anos e tiveram a taxa de filtração glomerular (GFR: *glomerular filtration rate*) calculada por meio da fórmula MDRD (*modified diet in renal disease*) ao final de cada um dos cinco anos. Na avaliação do risco imunológico pré-transplante, realizou-se pesquisa de anticorpos anti-HLA de classe I pré-formados através de teste de reatividade contra painel (PRA: *panel-*

reactive antibodies), empregando-se técnica de imunoenensaio enzimático (ELISA: *enzyme-linked immunoabsorbent antibody*) em 85 (95,5%) pacientes e microlinfocitotoxicidade dependente de complemento com adição de antiglobulina humana (AHG-CDC: *complement dependent microlymphocitotoxicity with anti-human globulin*) em quatro (4,5%) pacientes. Todos os transplantes foram realizados após prova cruzada negativa por AHG-CDC contra os linfócitos do doador. Os padrões de compatibilidade HLA entre receptor e doador foram analisados a partir da tipificação dos *loci* A, B e DR, considerando-se o número de incompatibilidades em cada um destes *loci* e o número total. A imunossupressão empregada na maior parte dos casos foi a combinação de ciclosporina, prednisona e azatioprina (72,4%), seguida pelo esquema empregando ciclosporina, prednisona e micofenolato (18,3%), e o restante empregando regimes constituídos por ciclosporina e azatioprina (1,1%); tacrolimus, micofenolato e prednisona (1,1%); tacrolimus, azatioprina e prednisona (4,5%); rapamicina, azatioprina e prednisona (1,1%); e rapamicina, tacrolimus e prednisona (1,1%). Vinte e três pacientes (25,8%) foram submetidos à terapêutica de indução, sendo dezesseis (18,0%) com basiliximab, cinco (5,6%) com daclizumab e dois (2,2%) com OKT3. A terapêutica empregada nos episódios de rejeição aguda foi a pulsoterapia com metilprednisolona intravenosa. Treze pacientes (14,6%) apresentaram pelo menos um episódio de rejeição aguda refratária à pulsoterapia com metilprednisolona e foram tratados com timoglobulina ou OKT3.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Complexo Hospitalar da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, tendo aprovação simultânea pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Avaliação Histopatológica e Imunoistoquímica

Após a seleção inicial quanto à disponibilidade de blocos de parafina e adequação de material, foram analisadas 148 biópsias. Dentre estas, 133 (89,8%) foram efetivamente incluídas no estudo, por apresentarem tanto material disponível e adequado quanto critérios morfológicos de TCMR aguda.

As biópsias foram fixadas em formalina tamponada a 10%, submetidas a processamento histológico usual e embebidas em parafina para inclusão. Confeccionaram-se as lâminas conforme método de microtomia tradicional, com cortes de quatro micrômetros de espessura. Os métodos histoquímicos de coloração utilizados foram hematoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS), tricrômico de Masson (TM) e prata metenamina-ácido periódico (PASM). A graduação da TCMR aguda seguiu os parâmetros da Classificação de Banff de 2007 (9).

A avaliação do C4d foi efetuada por meio de método imunoistoquímico, devido à natureza retrospectiva do estudo e da indisponibilidade de material congelado para análise com imunofluorescência. O anticorpo anti-C4d empregado foi o anticorpo de coelho policlonal (Biomedica Gruppe, Viena, Áustria). Cortes de quatro micrômetros de espessura foram submetidos à recuperação antigênica com solução-tampão de citrato em banho-maria a 92°C. A diluição empregada do anticorpo foi de 1:50. Utilizou-se solução de diaminobenzidina (DAB) para coloração, contraindicando-se com hematoxilina. A análise seguiu as diretrizes da Classificação de Banff de 2007, sendo atribuídos os graus de acordo com a porcentagem de capilares peritubulares marcados. A negatividade total constituiu o grau C4d0; marcação de até 10%, C4d1; marcação superior a 10% até 50%, C4d2; e, acima de 50%, C4d3. Biópsias classificadas como C4d2 e C4d3 foram consideradas positivas. A figura 1 ilustra uma biópsia C4d positiva.

A detecção dos infiltrados celulares ricos em linfócitos B foi efetuada por meio de método imunoistoquímico. O anticorpo utilizado foi o anti-CD20 monoclonal de camundongo (Dako, Carpinteria, Califórnia, EUA). A diluição empregada foi 1:200 e as demais etapas foram idênticas às empregadas na confecção das lâminas de C4d. Para a análise, considerou-se o campo com o maior número de células coradas. As biópsias consideradas como positivas foram aquelas nas quais foram detectadas, neste campo, em 400 aumentos, 100 ou mais células marcadas. Adicionalmente, as biópsias positivas foram divididas em quatro categorias. As biópsias com 100 a 149 células marcadas foram incluídas na categoria 1; com 150 a 199, na categoria 2; com 200 a 249, na categoria 3; 250 ou mais, na categoria 4. Exemplos de biópsias positivas e de uma biópsia negativa podem ser observadas nas figuras de 2 a 6.

Trinta e quatro pacientes tiveram mais de uma biópsia analisada, sendo o número máximo de biópsias por pacientes de cinco (média de 1,48 e desvio-padrão de 0,7). Havendo uma ou mais biópsia(s) positiva(s) para C4d e para CD20, mesmo com outra(s) biópsia(s) negativa(s), o caso foi considerado positivo e incluído no grupo CD20-positivo. A categoria de positividade de CD20 definidora dos casos nos quais mais de uma biópsia mostrou-se positiva foi a categoria mais alta. As análises histopatológica e imunoistoquímica foram efetuadas por dois patologistas desprovidos dos dados clínicos.

Análise Estatística

Os dados foram armazenados e analisados por meio do programa SPSS versão 16.0 (*Statistical Package for Social Sciences*, Inc., Chicago, Illinois, EUA). As variáveis contínuas foram expressas por média e desvio-padrão e analisadas utilizando-se o Teste t de Student. As variáveis categóricas foram analisadas com o Qui-Quadrado.

A sobrevida do enxerto foi comparada entre os grupos pelo Método de Kaplan-Meyer e as diferenças entre as curvas foram analisadas pelo teste *log-rank*. Valores de P inferiores a 0,05 indicaram diferença estatisticamente significativa.

Resultados

Parâmetros Clínicos

As características demográficas, clínicas e imunológicas dos pacientes estão descritas na tabela 1. A única característica com diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos foi o sexo do doador. Pacientes do grupo CD20-positivo foram transplantados mais freqüentemente com enxertos provenientes de doadores femininos (P = 0,03). Adicionalmente, não se observou diferença significativa entre os dois grupos relativa aos esquemas de imunossupressão empregados.

A sobrevida do enxerto dos pacientes do grupo CD20-positivo ao final do primeiro e do segundo anos foi, respectivamente, de 83,3% e 75,0%. Ao final do terceiro, quarto e quinto anos, a taxa manteve-se em 72,2%. A sobrevida do enxerto dos pacientes do grupo CD20-negativo ao final de cada um dos primeiros cinco anos de acompanhamento foi, respectivamente, de 86,8%, 81,1%, 81,1%, 77,3% e 69,8%. A figura 7 ilustra a curva de sobrevida do enxerto em cinco anos. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa em qualquer intervalo, mesmo quando casos com marcação positiva de C4d foram excluídos da análise.

O grupo CD20-positivo apresentou tendência à pior função renal, avaliada pela taxa de filtração glomerular calculada pelo MDRD, ao longo dos cinco anos de acompanhamento. No entanto, estas diferenças não atingiram significado estatístico. Estes dados encontram-se pormenorizados na tabela 2.

O intervalo decorrido entre os episódios de rejeição com biópsias com infiltrado rico em linfócitos B teve média de 65,4 dias, com variação de sete a 222 dias. Este intervalo, nos episódios sem o infiltrado rico em linfócitos B, teve média de 53,4 dias, com variação de cinco a 1.280 dias. Não houve significado estatístico para estas diferenças ($P = 0,60$).

Análises Histopatológica e Imunoistoquímica

Dos 89 pacientes incluídos no estudo, 55 (61,8%) tiveram uma biópsia analisada; 27 (30,3%), duas biópsias; seis (6,7%), três biópsias; e um (1,1%), cinco biópsias. Os graus máximos de TCMR aguda em cada paciente distribuíram-se da seguinte maneira: grau IA, 48 indivíduos (53,9%); grau IB, 31 (34,8%); grau IIA, três (3,4%); grau IIB, cinco (5,6%); e grau III, dois (2,2%). Infiltrados ricos em linfócitos B foram detectados em 36 pacientes (40,4%). Distribuíram-se da seguinte forma: quinze (41,6%) na categoria 1, dezesseis (44,4%) na categoria 2, três (8,3%) na categoria 3 e dois (5,5%) na categoria 4. A marcação positiva do C4d ocorreu em 23 casos (25,8%).

De acordo com o grau de rejeição, a distribuição nas 133 biópsias foi a seguinte: 80 (60,2%) grau IA, 41 (30,8%) grau IB, três (2,3%) grau IIA, sete (5,3%) grau IIB e 2 (1,5%) grau III.

Dentre as 133 biópsias analisadas, 42 (31,6%) apresentaram infiltrado celular rico em linfócitos B. Destas, 42 biópsias CD20-positivas, 22 (61,1%) foram incluídas na categoria 1; dezessete (47,2%), na categoria 2; três (8,3%), na categoria 3; e duas (5,5%), na categoria 4. A presença do infiltrado rico em linfócitos B apresentou associação com graus mais altos de infiltrado inflamatório intersticial acentuado (i3) e de tubulite acentuada (t3) e com a presença de arterite. Nas biópsias positivas, vinte (47,6%) exibiram infiltrado inflamatório intersticial graduado como i3 e 32 (76,1%)

apresentaram tubulite classificada como t3. Nas biópsias negativas, os valores para estes graus foram de 26 (28,5%) e 23 (25,2%), respectivamente ($P = 0,032$ para o grau de infiltrado inflamatório intersticial e $P < 0,001$ para o grau de tubulite). Foi detectada arterite em doze biópsias, sendo nove em biópsias CD20-positivas e três em CD20-negativas ($P = 0,001$). Na tabela 3, estes achados encontram-se sumarizados.

A análise da marcação para C4d revelou positividade em 28 (21,0%) biópsias, referentes a 23 pacientes (25,8%). Quanto à classe específica do marcador, 89 (66,9%) biópsias foram consideradas C4d0; dezesseis (12,0%), C4d1; nove (6,7%), C4d2; e, dezoito (14,2%), C4d3. Não foi detectada associação entre a positividade de C4d e a presença de infiltrados celulares ricos em linfócitos B tanto ao analisar-se o grupo de pacientes ($P = 0,40$), quanto ao analisarem-se as biópsias ($P = 0,70$).

Discussão

O presente estudo inclui o maior número de pacientes adultos transplantados renais com enxertos de doadores falecidos dentre os trabalhos publicados abordando a rejeição mediada por linfócitos T aguda e a infiltração de linfócitos B. Adotou-se o critério de positividade de linfócitos B inicialmente estabelecido por Bagnasco e cols., pelo qual são necessárias pelo menos 100 células marcadas observadas em campo microscópico de 400 aumentos (18). Existem outros critérios, mais restritivos como o proposto por Sarwal e cols., onde o valor mínimo para a positividade é de 275 células, ou menos restritivos, como o adotado por Kayler e cols., onde quinze células são suficientes para considerar-se uma biópsia positiva (10,17). A utilização do critério de 100 células reside em três motivos básicos. Primeiramente, raras biópsias preenchem o critério de 275 células, o que tornaria difícil a comparação entre grupos. Por outro lado,

a adoção do número mínimo de quinze células levaria a um excesso, possivelmente a maioria, de biópsias positivas. Por fim, a aplicação do mesmo critério em diferentes estudos torna os resultados potencialmente comparáveis. Utilizando este critério, observou-se positividade de linfócitos B em 31,6% das biópsias, resultado comparável aos 30% relatados por Bagnasco e cols. (18).

Houve uma tendência de menor sobrevida do enxerto no grupo CD20-positivo ao final dos quatro anos pós-transplante, porém sem significado estatístico. Ao final do quinto ano, a sobrevida do enxerto foi menor no grupo CD20-negativo, também sem significado estatístico. Também houve tendência de pior função renal no grupo CD20-positivo ao longo dos cinco anos de acompanhamento, porém sem alcançar diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Adicionalmente, o intervalo transplante-biópsia, apesar de maior nas biópsias positivas, não diferiu de modo estatisticamente significativo.

Estes resultados reproduzem os três estudos com o maior número de pacientes, porém utilizando critérios de positividade distintos, até agora disponíveis. Bagnasco e cols., utilizando o mesmo critério de positividade do presente estudo, analisaram o valor prognóstico da presença de linfócitos B em 56 pacientes (34 transplantados renais de doadores falecidos) estudados. A função renal foi avaliada durante a rejeição e ao longo de quatro anos de acompanhamento e a sobrevida do enxerto foi observada também ao longo de quatro anos de seguimento. Não houve diferença significativa para nenhuma das variáveis ao longo deste intervalo (18). Kayler e cols. analisaram um grupo de 120 pacientes (73 transplantados com enxertos de doadores falecidos) com diagnóstico de TCMR aguda e não foram encontradas diferenças significativas para a presença ou a ausência de linfócitos B em termos de tempo de rejeição, resistência a corticosteróides, níveis de creatinina sérica e sobrevida do enxerto. Contudo, a quantificação dos

agregados de linfócitos B não adotou critérios suficientemente restritivos e muitos dos pacientes alocados foram submetidos a protocolos particulares (pré-tratamento com globulina anti-timócito ou com alemtuzumab) (17). Scheepstra e cols. dividiram a positividade para o anti-CD20 em agregados de células positivas e em células positivas esparsamente distribuídas, sendo este último padrão subdividido em cinco escores, tendo como base o número médio de células marcadas contadas em campos de grande aumento da biópsia. Foram analisadas 54 biópsias com diagnóstico de rejeição aguda referentes a 50 pacientes (40 de doadores falecidos). Não houve relação de qualquer um dos padrões de positividade com perda do enxerto, resposta à terapêutica e creatinina sérica aos seis e aos doze meses após a biópsia (19). No entanto, cabe ressaltar que, tanto o presente estudo quanto os acima citados não incluem coortes muito numerosas. Esta característica leva à possibilidade de ocorrência de erro tipo beta, no qual as diferenças não são detectadas ou não atingem significado estatístico devido à amostragem insuficiente.

Os achados histopatológicos de presença de arterite, grau de tubulite e extensão do infiltrado inflamatório intersticial apresentaram associação estatisticamente significativa com infiltrado rico em linfócitos B. Esta associação ainda não havia sido relatada nos estudos prévios. A relevância deste achado reside no fato de estas alterações fornecerem a base para o diagnóstico e para a graduação da TCMR aguda. Em termos prognósticos, a relação entre a presença de arterite e os graus mais altos de tubulite associam-se com desfechos clínicos desfavoráveis. A relevância clínica e prognóstica da presença de arterite foi comprovada nos primeiros estudos de validação da classificação de Banff (21,22). A importância prognóstica da tubulite severa (t3) foi analisada mais recentemente por Minervini e cols. Foi demonstrado que as taxas de perda de enxerto e os níveis séricos de creatinina em um ano foram equivalentes,

comparando-se um grupo de pacientes com arterite leve (v1) a um grupo com tubulite severa (t3), embora os níveis séricos de creatinina aos seis meses tivessem sido superiores no primeiro grupo. Ambos os grupos tiveram desfechos desfavoráveis quando comparados a grupos com graus mais baixos de tubulite (t1 e t2), e favoráveis em comparação a grupos com graus mais altos de arterite (v2 e v3) (23). Embora o presente estudo não tenha o objetivo de fornecer explicação fisiopatológica para a relação entre estes achados histopatológicos e a presença de agregados de linfócitos B, a literatura fornece evidências do estímulo fornecido por estas células aos linfócitos T. Este estímulo deriva principalmente da capacidade de apresentação de antígenos aos linfócitos T e de produção de citocinas e quimiocinas protagonizadas pelos linfócitos B, o que resultaria em linfócitos T mais numerosos e ativos, levando à maior infiltração inflamatória no enxerto, com alterações histopatológicas mais acentuadas (24,25,26). Já existe evidência de correlação entre infiltrados de linfócitos T e linfócitos B em episódios de rejeição aguda (19). Uma limitação que pode ser atribuída à associação entre a presença de arterite e os agregados de linfócitos B em nosso estudo é a frequência relativamente baixa de acometimento arterial (9,1%), embora semelhante proporção (12,0%) tenha sido encontrada em outra série (27).

A positividade da marcação de C4d ocorreu em 21,0% das biópsias, perfazendo 25,8% dos pacientes incluídos. Estes números são comparáveis a resultados de estudos prévios. As taxas de positividade nas biópsias relatadas por diferentes autores em casos de TCMR aguda varia entre 17,8% a 35,3% (28-32). Esta taxa de positividade, ao serem analisados os pacientes transplantados, situa-se entre 20% e 30% (33). Por fim, não se detectou relação entre a marcação positiva de CD20 e C4d. Esta ausência de relação também foi relatada em outras publicações. Sarwal e cols. e Scheepstra e cols. não observaram associação entre positividade de CD20 e de C4d (10,19). Na casuística de

Hippen e cols., os três casos com marcação positiva para C4d não apresentaram infiltração por linfócitos B (12).

Conclusão

A presença de infiltrado celular rico em linfócitos B, em biópsias com critérios de TCMR aguda, não foi associada com menor sobrevida e pior função do enxerto estatisticamente significativa no presente estudo. Houve associação entre este infiltrado e alterações histopatológicas definidoras de graus mais altos deste padrão de rejeição aguda. No entanto, ressalta-se a necessidade de mais estudos, preferencialmente prospectivos e com maior número de pacientes, contemplando inclusive mais casos com acometimento arterial, para melhor elucidação do papel dos linfócitos B no transplante renal.

Referências Bibliográficas

1. Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later – progress, challenges and promises. *N Engl J Med.* 2004 Dec;351(26):2761-2766.
2. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant.* 2004 Mar;4(3):378-383.
3. Cantarovich F, Carbajal R, Medioni J, Marmol A, Morelon E, Landais P. Clinical evaluation of early predictors of renal transplantation results. *Transplant Proc.* 2001 Feb-Mar;33(1-2):1192-1193.
4. Knight RJ, Burrows L, Bodian C. The influence of acute rejection on long-term renal allograft survival: a comparison of living and cadaveric donor transplantation. *Transplantation.* 2001 Jul;72(1):69-76.
5. Tantravahi J, Womer KL, Kaplan B. Why hasn't eliminating acute rejection improved graft survival? *Annu Rev Med.* 2007 58:369-385.

6. 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 Feb;55(2):713-723.
7. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch M, Halloran PF, Campbell PM, et al. Antibody-mediated rejection criteria – an addition to the Banff⁹⁷ Classification of Renal Allograft Rejection. *Am J Transplant.* 2003 Jun;3(6):708-714.
8. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff⁰⁵ Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (“CAN”). *Am J Transplant.* 2007 Mar;7(3):518-526.
9. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 Classification of Renal Allograft Pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* 2008 Apr;8(4):753-760.
10. Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Masek M. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 2003 Jul;349(2):125-138.
11. Hippen BE, DeMattos A, Cook WJ, Kew II CE, Gaston RS. Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. *Am J Transplant.* 2005 Sep;5(9):2248-2252.
12. Martins HL, Silva C, Martini D, Noronha IL. Detection of B lymphocytes (CD20+) in renal allograft biopsy specimens. *Transplant Proc.* 2007 Mar;39(2):432-434.
13. Becker YT, Becker BN, Pirsch JD, Sollinger HW. Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. *Am J Transplant.* 2004 Jun;4(6):996-1001.
14. Alausa M, Almagro U, Siddiqi N, Zuiderweg R, Medipalli R, Hariharan S. Refractory acute kidney transplant rejection with CD20 graft infiltrates and successful therapy with rituximab. *Clin Transplant.* 2005 Feb;19(1):137-140.
15. Lehnhardt A, Mengel M, Pape L, Ehrich JHH, Offner G, Strehlau J. Nodular B-cell aggregates associated with treatment refractory renal transplant rejection resolved by rituximab. *Am J Transplant.* 2006 Apr;6(4):847-851.
16. Cascalho M, Platt JL. Novel functions of B cells. *Crit Rev Immunol.* 2007 27(2):141-151.
17. Kayler LK, Lakkis FG, Morgan C, Basu A, Blisard D, Tan HP, et al. Acute cellular rejection with CD20-positive lymphoid clusters in kidney transplant patients following lymphocyte depletion. *Am J Transplant.* 2007 Apr;7(4):949-954.
18. Bagnasco SM, Tsai W, Rahman MH, Kraus ES, Barisoni L, Vega R, et al. CD20 positive infiltrates in renal allograft biopsies with acute cellular rejection are not associated with worse graft survival. *Am J Transpl.* 2007 Aug;7(8):1968-1973.

19. Scheepstra C, Bemelman FJ, van der Los C, Rowshani AT, van Donselaar-van der Pant KAMI, Idu MM, et al. B cells in cluster or in scattered pattern do not correlate with clinical outcome of renal allograft rejection. *Transplantation*. 2008 Sep;86(6):772-780.
20. Zarkhin V, Li L, Sarwal M. "To B or not to B?" B-cells and graft rejection. *Transplantation*. 2008 Jun;85(12):1705-1714.
21. Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, Flax S, Gaber AO. Correlation between Banff Classification, acute renal rejection scores, and reversal of rejection. *Transplant Proc*. 1995 Feb;27(1):1009.
22. Van Sasse JLCM, van der Woode FJ, Thorogood J, Hollander AAMJ, van Es LA, Weening JJ, et al. The relation between acute vascular and interstitial renal allograft rejection and subsequent chronic rejection. *Transplantation*. 1995 May;59(9):1280-1285.
23. Minervini MI, Torbenson M, Scantlebury V, Vivas C, Jordan M, Shapiro R, et al. Acute renal allograft rejection with severe tubulitis (Banff 1997 grade IB). *Am J Surg Pathol*. 2000 Apr;24(4):553-558.
24. Martin F, Chan C. B cell immunology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu Rev Immunol*. 2006 Feb;24:467-496.
25. Edwards JC, Cambridge G. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol*. 2006 May;6(5):394-403.
26. Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, Nagy-Bojarski K, Watschinger B, Soleiman A, et al. Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Mar;15(3):603-612.
27. Shimizu T, Tanabe K, Tokumoto T, Shimmura H, Ishikawa N, Ishida H, et al. Histological features of renal allograft biopsies in ABO minor-mismatched kidney transplantation. *Clin Transplantation*. 2003 17(Suppl.10):9-13.
28. Aiello FB, Calabrese F, Rigotti P, Furian L, Marino S, Cusinato R, et al. Acute rejection and graft survival in renal transplanted patients with viral diseases. *Mod Pathol*. 2004 Feb;17(2):189-196.
29. Mengel M, Bogers J, Bosmans JL, Serón D, Moreso F, Carrera M, et al. Incidence of C4d stain in protocol biopsies from renal allografts: results from a Multicenter trial. *Am J Transplant*. 2005 May;5(5):1050-1056.
30. Seemayer CA, Gaspert A, Nickleit V, Mihatsch M. C4d staining of renal allograft biopsies: a comparative analysis of different staining techniques. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Feb;22(2):568-576.

31. Koo DDH, Roberts ISD, Quiroga I, Procter J, Barnardo MCNM, Sutton M. C4d deposition in early renal allograft protocol biopsies. *Transplantation*. 2004 Aug;78(3):398-403.
32. Magil AB, Tinckam KJ. Focal peritubular capillary C4d deposition in acute rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 May;21(5):1382-1388.
33. Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002 Nov;11(6):609-618.

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e imunológicas de pacientes transplantados renais de doador falecido com rejeição mediada por linfócitos T aguda, distribuídos conforme a presença de infiltrado celular rico em linfócitos B na(s) biópsia(s) identificados por imunoistoquímica.

Variável	CD20 Positivo	CD20 Negativo	P
Idade do receptor (média, DP; anos)	40,14 (12,35)	40,57 (11,77)	0,870
Idade do doador (média, DP; anos)	43,18 (13,06)	37,04 (16,15)	0,074
Gênero do receptor (Masculino; n, %)	23 (63,3)	30 (56,6)	0,492
Gênero do doador (Masculino; n, %)	13 (37,1)	32 (61,5)	0,026*
Raça do receptor (Branca; n, %)	33 (91,6)	47 (88,6)	0,646
Pacientes com transfusões prévias (n; %)	15 (57,6)	31 (77,5)	0,190
Número de transfusões (média, DP)	3,15 (4,63)	3,35 (4,51)	0,865
Retransplante (n; %)	4 (11,1)	3 (5,6)	0,348
PRA positivo (n; %)	8 (22,2)	8 (15,0)	0,390
HLA-A <i>mismatches</i> (média, DP)	1,40 (0,65)	1,30 (0,63)	0,486
HLA-B <i>mismatches</i> (média, DP)	1,48 (0,70)	1,55 (0,57)	0,072
HLA-DR <i>mismatches</i> (média, DP)	0,73 (0,60)	0,92 (0,56)	0,196
Total de HLA <i>mismatches</i> (média, DP)	3,40 (1,11)	3,58 (1,04)	0,184
Tempo de isquemia fria (horas; média, DP)	19,15 (7,40)	20,16 (5,99)	0,508
Tempo de isquemia quente (minutos; média, DP)	0,21 (0,68)	0,50 (2,28)	0,471
Pacientes submetidos à terapêutica de indução (n; %)	9 (25,0)	12 (22,6)	0,797
Pacientes com episódio de RA córtico-resistente (n; %)	7 (19,4)	6 (11,3)	0,287
Função retardada do enxerto (n; %)	19 (52,7)	35 (66,0)	0,209
C4d positivo (n; %)	11 (30,5)	12 (22,6)	0,403

Abreviaturas – DP: desvio-padrão, HLA (antígeno leucocitário humano: *human leucocitary antigen*), n (número), PRA (teste de reatividade contra painel: *panel-reactive antibodies*: *panel-reactive antibodies*) e RA (rejeição aguda).

* Valor estatisticamente significativo ($P < 0,05$).

Tabela 2. Níveis séricos de creatinina e função renal aferida pela taxa de filtração glomerular ao longo de cinco anos pós-transplante em pacientes transplantados renais de doador falecido com rejeição mediada por linfócitos T aguda, distribuídos conforme a presença de infiltrado celular rico em linfócitos B na(s) biópsia(s) identificados por imunoistoquímica.

Período	Variável (média, DP)	CD20 Positivo (média, DP)	CD20 Negativo (média, DP)	P
Um ano	Creatinina sérica	2,29 (1,09)	1,94 (0,81)	0,116
	TFG	45,17 (20,28)	39,33 (19,48)	0,220
Dois anos	Creatinina sérica	2,19 (0,93)	1,82 (0,73)	0,066
	TFG	39,05 (18,24)	47,86 (22,60)	0,088
Três anos	Creatinina sérica	2,13 (0,93)	1,88 (0,79)	0,239
	TFG	42,21 (21,09)	45,91 (20,19)	0,472
Quatro anos	Creatinina sérica	2,30 (1,02)	2,03 (0,95)	0,276
	TFG	40,00 (23,61)	41,07 (16,33)	0,828
Cinco anos	Creatinina sérica	2,31 (0,95)	2,15 (0,90)	0,484
	TFG	37,80 (19,57)	38,80 (16,73)	0,828

Abreviatura – DP (desvio-padrão) e TFG (taxa de filtração glomerular, estimada pela fórmula MDRD).

Unidades - Creatinina sérica (mg/dL) e TFG (mL/min).

Tabela 3. Parâmetros morfológicos e análise do C4d de biópsias de transplantados renais de doador falecido com rejeição aguda mediada por linfócitos T, distribuídos conforme a presença de infiltrado celular rico em linfócitos B nas biópsias identificados por imunohistoquímica.

Parâmetros Histológicos	CD20 Positivas n (%)	CD20 Negativas n (%)	P
i2	22 (52,3)	65 (71,4)	0,032*
i3	20 (47,6)	26 (28,5)	0,032*
t2	10 (23,8)	68 (74,7)	<0,001*
t3	32 (76,1)	23 (25,2)	<0,001*
Arterite ausente	33 (78,5)	88 (96,7)	0,001*
Arterite presente	09 (21,4)	03 (3,2)	0,001*
C4d positivo	08 (19,0)	20 (21,9)	0,700
C4d negativo	34 (80,9)	71 (78,0)	0,700

Abreviaturas – i2 (infiltrado inflamatório intersticial acometendo 26% a 50% do córtex renal), i3 (infiltrado inflamatório intersticial acometendo mais de 50% do córtex renal), t2 (tubulite com cinco a dez células mononucleares em cortes transversais dos túbulos ou grupo de dez células tubulares) e t3 (tubulite com mais de dez células mononucleares em cortes transversais dos túbulos ou grupo de dez células tubulares, ou com pelo menos duas áreas de destruição da membrana basal tubular acompanhada por infiltrado inflamatório intersticial classificado como i2 ou i3 e tubulite t2 em qualquer outro local da biópsia).

* Valores estatisticamente significativos ($P < 0,05$).

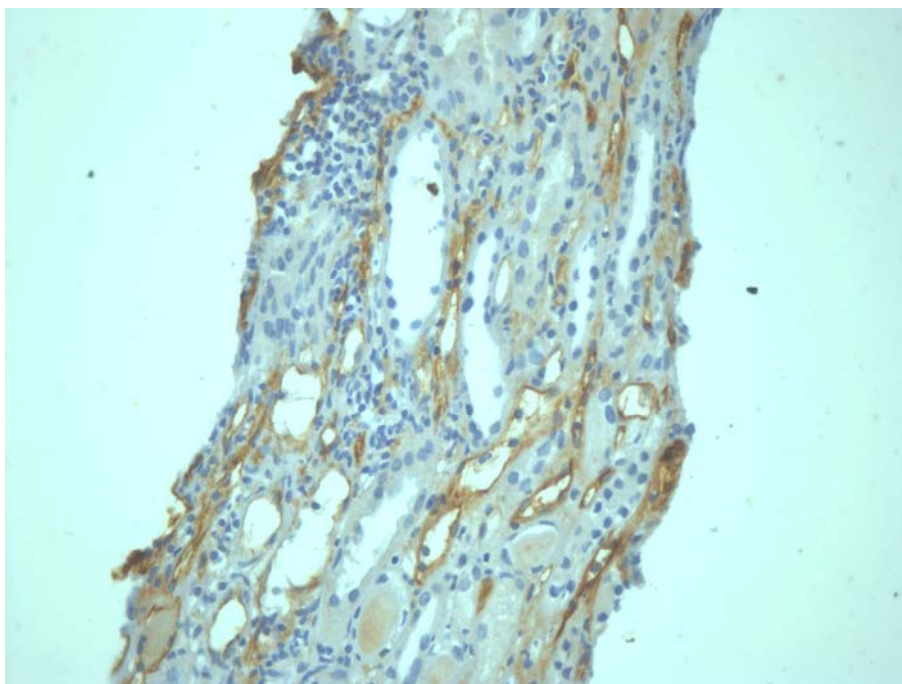


Figura 1 – Biópsia C4d positiva (marcação positiva em capilares peritubulares).

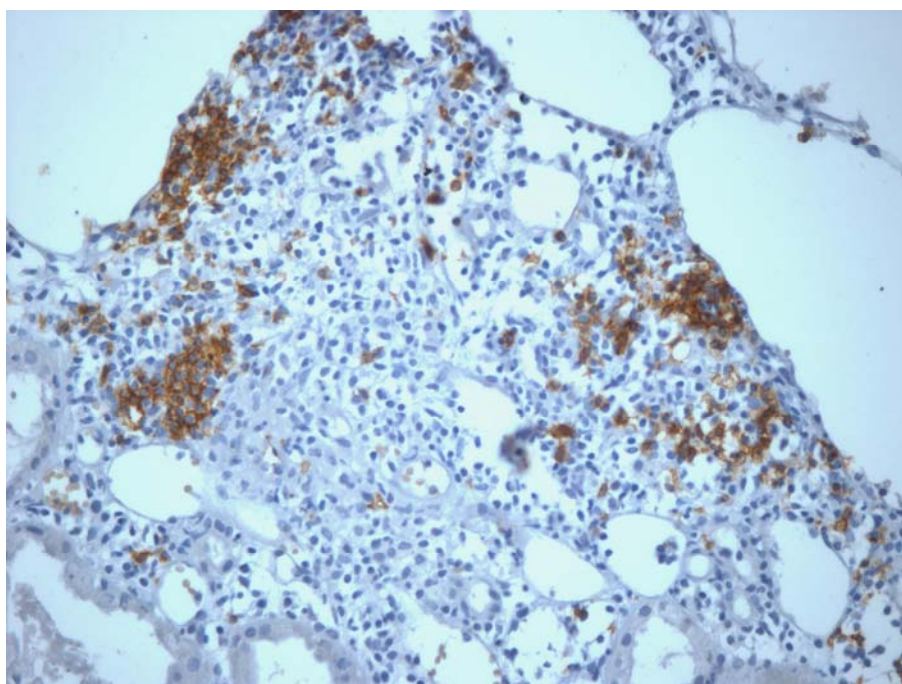


Figura 2 – Biópsia CD20 positiva categoria 1 (100 a 149 células marcadas em campo microscópico de 400 aumentos).

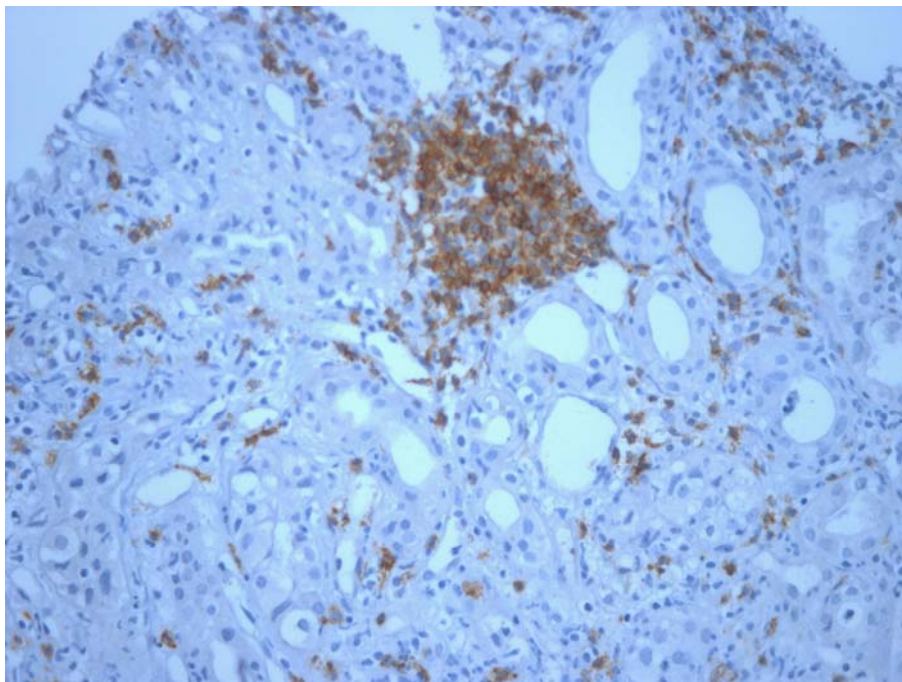


Figura 3 – Biópsia CD20 positiva categoria 2 (150 a 199 células marcadas em campo microscópico de 400 aumentos).

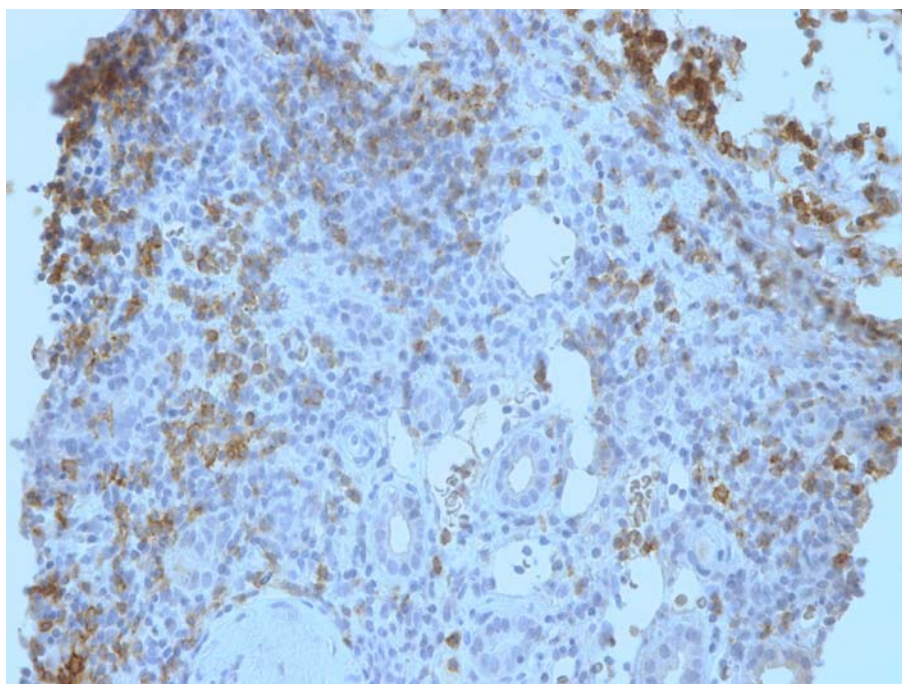


Figura 4 – Biópsia CD20 positiva categoria 3 (200 a 249 células marcadas em campo microscópico de 400 aumentos).

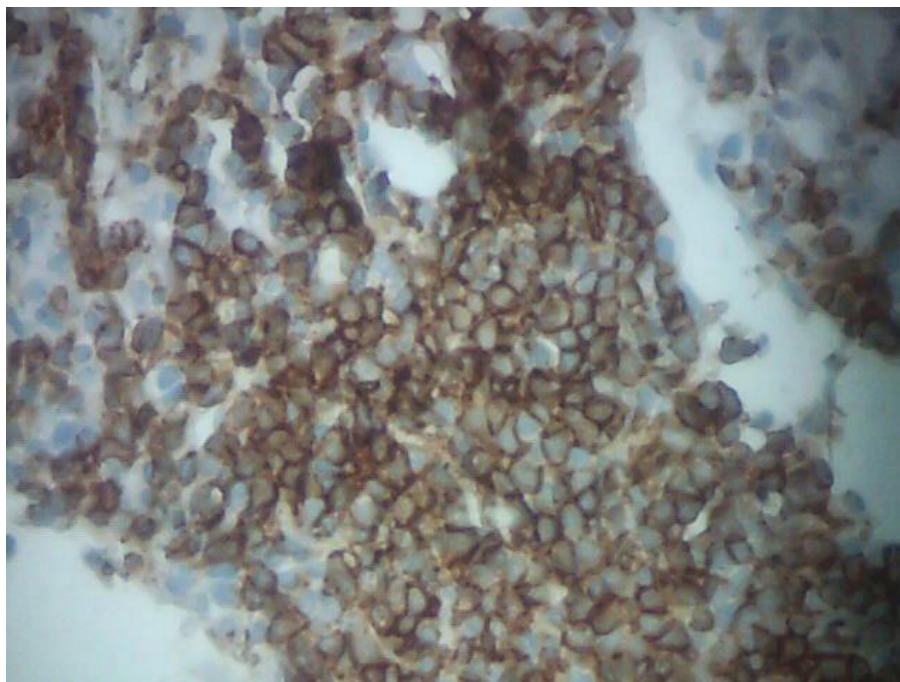


Figura 5 – Biópsia CD20 positiva categoria 4 (250 ou mais células marcadas em campo microscópico 400 aumentos).

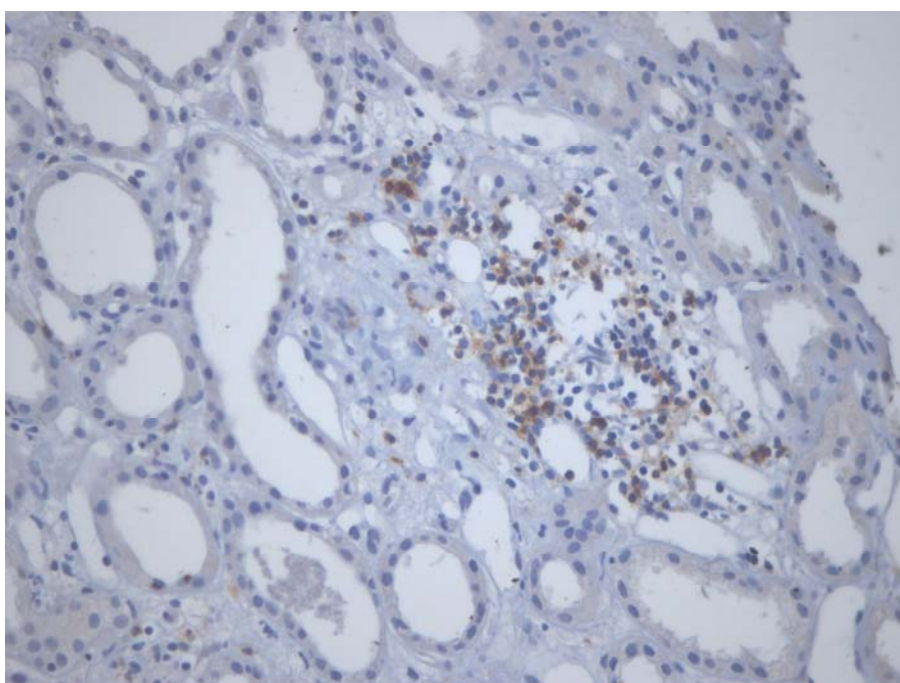


Figura 6 – Biópsia CD20 negativa (menos de 100 células marcadas em campo microscópico de 400 aumentos)

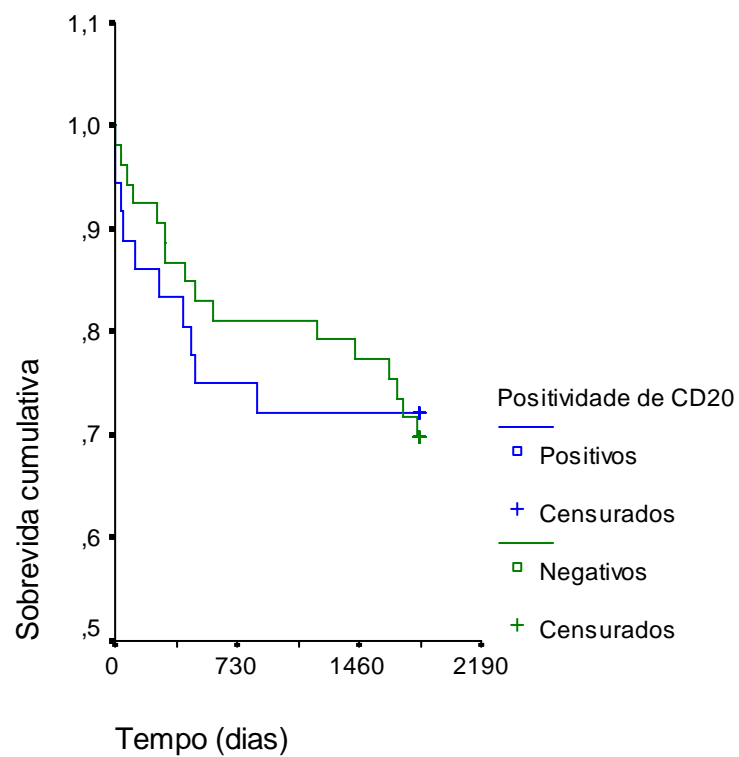


Figura 7 – Curva de sobrevivência do enxerto dos grupos CD20-positivo e CD20-negativo em acompanhamento de cinco anos pós-transplante.

5. CONCLUSÕES FINAIS

A presença de infiltrado celular rico em linfócitos B em biópsias de aloenxertos renais de doadores falecidos com diagnóstico de rejeição aguda mediada por linfócitos T foi detectada em 31,6% destas biópsias, referentes a 40,4% dos pacientes alocados no estudo. As características clínicas e demográficas destes pacientes não demonstraram diferenças entre o grupo de pacientes com biópsias exibindo infiltrado celular rico em linfócitos B e o grupo de indivíduos sem estes infiltrados, com exceção do sexo do doador, encontrando-se maior frequência de doadores do gênero feminino no primeiro grupo de pacientes.

A sobrevida analisada ao longo de cinco anos de acompanhamento não foi diferente entre os dois grupos de pacientes. Não houve diferença quanto à função renal e aos níveis séricos de creatinina ao final de cada um dos cinco anos entre os dois grupos de pacientes. O intervalo de tempo médio decorrido entre o transplante e os episódios de rejeição mediada por linfócitos T aguda não foi diferente ao compararem-se os episódios nos quais as biópsias exibiram infiltrado celular rico em linfócitos B com os episódios nos quais este infiltrado não foi detectado.

As biópsias nas quais foi encontrado infiltrado celular rico em linfócitos B, exibiram, mais frequentemente, tubulite acentuada, infiltrado inflamatório intersticial acentuado e presença de arterite, os quais caracterizam graus mais altos de rejeição mediada por linfócitos T aguda. A positividade de C4d não se associou à presença de infiltrado celular rico em linfócitos B.

6. ANEXOS

6.1. ANEXO I

CLASSIFICAÇÃO DE BANFF DE 1997 COM AS ATUALIZAÇÕES DE 2001, 2005 E 2007

Categorias Diagnósticas

1. Normal

2. Rejeição mediada por anticorpos

Devida a anticorpo anti-doador documentado (“suspeita para” se o anticorpo não é demonstrado); (pode coincidir com as categorias 3, 4, 5 e 6).

- Rejeição aguda mediada por anticorpos

Padrões (graduação)

- I. Dano tubular agudo semelhante à necrose tubular aguda e positiva para C4d e com mínima inflamação.
- II. Marginação capilar peritubular e/ou glomerular de neutrófilos e/ou leucócitos mononucleares e/ou trombose e positiva para C4d.
- III. Arterite com necrose fibrinóide das células musculares lisas da camada média e/ou arterite transmural e positiva para C4d.

- Rejeição crônica ativa mediada por anticorpos

Glomérulos apresentando duplos contornos e/ou multilamelação da membrana basal dos capilares tubulares e/ou atrofia tubular com fibrose intersticial e/ou espessamento fibroso intimal arterial com positividade para C4d.

3. Alterações “*borderline*” ou “suspeitas” para rejeição aguda mediada por linfócitos T. Ausência de arterite intimal, mas com focos de tubulite (t1, t2 ou t3) e sem infiltrado inflamatório intersticial ou com infiltrado inflamatório intersticial leve (i0 ou i1), não atingindo o limiar de i2 t2 para rejeição (pode coincidir com as categorias 2, 5 e 6).

4. Rejeição mediada por linfócitos T (pode coincidir com as categorias 2, 5 e 6).

- Rejeição aguda mediada por linfócitos T

Padrões (graduação)

IA. Casos com infiltrado inflamatório intersticial significativo (mais de 25% do parênquima afetado, i2 ou i3) e focos de tubulite moderada (t2).

IB. Casos com infiltrado inflamatório intersticial significativo (mais de 25% do parênquima afetado, i2 ou i3) e focos de tubulite severa (t3).

IIA. Casos com arterite intimal leve a moderada (v1).

IIB. Casos com arterite intimal severa comprometendo mais de 25% da área luminal (v2).

III. Casos com arterite transmural e/ou necrose e alteração fibrinóide das células musculares lisas da camada média das artérias com inflamação linfocitária.

- Rejeição crônica ativa mediada por linfócitos T

“Arteriopatia crônica do enxerto” (fibrose arterial intimal com infiltrado inflamatório mononuclear na fibrose, com formação de neointima).

5. Fibrose intersticial e atrofia tubular, sem evidência de qualquer etiologia específica (pode incluir esclerose glomerular e vascular inespecíficas, mas a graduação é determinada pelos achados túbulo-intersticiais).

Graduação

- I. Fibrose intersticial e atrofia tubular leves (envolvendo menos de 25% da área cortical).
- II. Fibrose intersticial e atrofia tubular moderadas (envolvendo 26% a 50% da área cortical).
- III. Fibrose intersticial e atrofia tubular severas (envolvendo mais de 50% da área cortical).

6. Outras categorias (não consideradas como resultantes de rejeição aguda e/ou crônica).

- Desordem linfoproliferativa pós-transplante
- Alterações inespecíficas
 - o Tubulite focal sem inflamação intersticial
 - o Alterações vasculares reativas
 - o Venulites
- Necrose tubular aguda
- Nefrite intersticial aguda
- Alterações associadas aos inibidores da calcineurina
- Dano subcapsular (“*healing in*”)
- Dano endotelial agudo pré-transplante
- Necrose papilar
- Glomerulonefrite “de novo”
- Doença recorrente
 - o Glomerulonefrite mediada por imunocomplexos
 - o Glomeruloesclerose segmentar e focal
 - o Diabete
 - o Síndrome hemolítico-urêmica
 - o Outros
- Doença pré-existente
- Infecção viral
- Obstrução e/ou refluxo, perda de urina
- Outros

Crítérios Histopatológicos de Rejeição Aguda

1. Tubulite (t) – Infiltração do epitélio tubular por células mononucleares, principalmente linfócitos, observadas em cortes transversais dos túbulos (ou grupo de dez células em cortes longitudinais ou oblíquos), não podendo estes apresentar atrofia superior a leve. É graduado o foco de inflamação mais severo e deve haver mais de um foco de tubulite.

Graduação

t0 – Ausência de células mononucleares nos túbulos.

t1 – Foco com uma a quatro células mononucleares em cortes transversais dos túbulos (ou grupo de dez células tubulares).

t2 - Foco com cinco a dez células mononucleares em cortes transversais dos túbulos (ou grupo de dez células tubulares).

t3 - Foco com mais de dez células mononucleares em cortes transversais dos túbulos (ou grupo de dez células tubulares) ou com pelo menos duas áreas de destruição da membrana basal tubular acompanhada por infiltrado inflamatório intersticial classificado como i2 ou i3 e tubulite t2 em qualquer outro local da biópsia.

2. Arterite (v) – A arterite intimal é definida como infiltração inflamatória linfocitária abaixo do endotélio, sendo esta distinta do infiltrado inflamatório da camada média e/ou da necrose e da alteração fibrinóide da parede do vaso. Hemorragia intersticial e infarto desacompanhados de arterite não preenchem critérios para vasculite (v3, como já foram considerados), mas deve-se referi-los com um asterisco em qualquer grau de v (v0*, v1*, v2* ou v3*). Devem ser referidos o número de artérias afetadas e o número de artérias acometidas.

Graduação

v0 – Sem arterite.

v1 – Arterite intimal leve a moderada em pelo menos 1 artéria em corte transversal.

v2 – Arterite grave com no mínimo 25% da luz da artéria comprometida em pelo menos 1 corte transversal.

v3 – Arterite transmural e/ou alteração fibrinóide com necrose das células musculares da camada média com infiltrado inflamatório no vaso.

3. Inflamação Intersticial (i) – Infiltrado inflamatório mononuclear, principalmente linfócitos, no interstício. A presença significativa de eosinófilos, neutrófilos ou plasmócitos no interstício deve ser registrada com um asterisco e a(s) população(ões) celular(es) presente(s) deve(m) ser descrita(s).

Graduação

i0 – Sem inflamação intersticial ou até menos de 10% do parênquima comprometido.

i1 – 10% a 25% do parênquima com células inflamatórias.

i2 – 26% a 50% do parênquima com células inflamatórias.

i3 – Mais de 50% do parênquima com células inflamatórias.

4. Glomerulite (g) - Glomérulos comprometidos por infiltrado de células inflamatórias mononucleares e aumento das células endoteliais

Graduação

g0 – Sem glomerulite.

g1 – Menos de 25% dos glomérulos comprometidos.

g2 – Comprometimento segmentar ou global em 25% a 75% dos glomérulos.

g3 – Comprometimento (predominantemente global) em mais de 75% dos glomérulos.

5. Marginação por células inflamatórias em capilares peritubulares (ptc) – Presença de neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos na luz de capilares peritubulares. Quando não houver neutrófilos, mas apenas células mononucleares, deve ser acrescido um asterisco. A graduação deve ser feita na área mais severamente afetada. A extensão deve ser classificada como focal (menos de 50% da área cortical afetada) ou difusa (50% ou mais da área cortical afetada). A dilatação dos capilares, se presente, deve ser registrada. Áreas de necrose, pielonefrite aguda ou córtex subcapsular não devem ser graduadas. Adicionalmente, não são utilizadas as veias e os *vasa recta* medulares para este escore.

Graduação

ptc0 – Ausência de alterações inflamatórias em capilares peritubulares corticais significativas, ou presença das alterações em menos de 10% dos capilares peritubulares.

ptc1 – Presença de três ou quatro células inflamatórias na luz de capilar peritubular cortical.

ptc2 – Presença de cinco a dez células inflamatórias na luz de capilar peritubular cortical.

ptc3 – Presença de mais de dez células inflamatórias na luz de capilar peritubular cortical.

Critérios Morfológicos das Alterações Histopatológicas Crônicas

1. Fibrose intersticial (ci) - Fibrose intersticial crônica que excede 5% da área cortical.

Graduação

ci0 – Fibrose intersticial compromete até 5% da área cortical.

ci1 – Fibrose intersticial discreta comprometendo 6% a 25% da área cortical.

ci2 – Fibrose intersticial moderada comprometendo 26% a 50% da área cortical.

ci 3 – Fibrose intersticial acentuada comprometendo mais de 50% da área cortical.

2. Atrofia tubular (ct) - Presença de túbulos com espessamento redundante das membranas basais ou redução maior que 50% de diâmetro tubular, quando comparados com túbulos não atróficos.

Graduação

ct0 – Ausência de atrofia tubular.

ct1 – Atrofia tubular comprometendo até 25% da área dos túbulos corticais.

ct2 – Atrofia tubular comprometendo 26% a 50% da área dos túbulos corticais.

ct3 – Atrofia tubular maior do que 50% da área dos túbulos corticais.

3. Glomerulopatia do transplante (cg) - Glomerulopatia Crônica é caracterizada por proliferação mesangial à custa de células e expansão da matriz, espessamento da membrana basal com interposição mesangial periférica (“duplo contorno”), algumas vezes com crescentes celulares. Também estão incluídas a mesangiólise e as alterações esclerosantes progressivas. Normalmente associada com proteinúria importante, freqüentemente em níveis nefróticos. Referir o número de glomérulos esclerosados e a porcentagem de glomérulos esclerosados.

Graduação

cg0 – Ausência de glomerulopatia. “Duplo contorno” identificado em menos de 10% das alças capilares de glomérulos, entre os mais comprometidos.

cg1 – “Duplo contorno” identificado em até 25% das alças capilares de glomérulos não esclerosados, entre os mais comprometidos.

cg2 – “Duplo contorno” identificado em 26% a 50% das alças capilares de glomérulos não esclerosados, entre os mais comprometidos.

cg3 – “Duplo contorno” identificado em mais de 50% das alças capilares de glomérulos não esclerosados, entre os mais comprometidos.

4. Aumento da matriz mesangial (mm) - O critério morfológico para aumento moderado da matriz mesangial é a expansão do espaço entre capilares glomerulares adjacentes maior que duas células mesangiais, em pelo menos dois lóbulos glomerulares.

Graduação

mm0 – Ausência de aumento de matriz mesangial.

mm1 – Aumento no mínimo moderado da matriz mesangial em até 25% dos glomérulos não esclerosados.

mm2 – Aumento no mínimo moderado da matriz mesangial em 26% a 50% dos glomérulos não esclerosados.

mm3 – Aumento no mínimo moderado da matriz mesangial em mais de 50% dos glomérulos não esclerosados.

5. Espessamento fibroso da íntima arterial (cv) - A lesão vascular crônica caracteriza-se por espessamento fibroso da íntima arterial com delaminação/descontinuidade da membrana elástica interna e/ou presença de células espumosas e/ou células mononucleares ocasionais. A quantificação deve ser feita levando em conta o vaso arterial mais afetado. Referir a presença de lesões características de rejeição crônica (ruptura e/ou delaminação da membrana elástica, células inflamatórias em meio à fibrose, formação de neo-íntima e proliferação de miofibroblastos).

Graduação

cv0 – Ausência de alterações vasculares.

cv1 – Redução em até 25% da área do lúmen arterial.

cv2 – Redução entre 26% a 50% da área do lúmen arterial.

cv3 – Redução de mais de 50% da área do lúmen arterial.

6. Espessamento hialino arteriolar (ah) - Espessamento da parede arteriolar por infiltrado hialino PAS positivo. Referir a presença de arteriolite (significado ainda não estabelecido) com um asterisco após o escore “ah”. Observar as formas nodulares para a possibilidade de toxicidade dos inibidores da calcineurina.

Graduação

ah0 – Ausência de espessamento hialino PAS positivo.

ah1 – Espessamento hialino PAS positivo leve/moderado em pelo menos uma arteríola.

ah2 – Espessamento hialino PAS positivo moderado/acentuado em mais de uma arteríola.

ah3 – Espessamento hialino PAS positivo acentuado em várias arteríolas.

7. Arteriopatia hialina induzida por inibidores da calcineurina (aah). Critério em avaliação nos próximos dois anos, ainda não incorporado à Classificação de Banff de 2007.

aah0 – Ausência de lesões típicas de arteriopatia por inibidores da calcineurina.

aah1 – Depósitos hialinos em substituição a necrose de células da camada média em uma arteríola e ausência de envolvimento circunferencial.

aah2 – Mais de uma arteríola com depósito hialino e ausência de envolvimento circunferencial.

aah3 – Envolvimento circunferencial arteriolar independente do número de arteríolas envolvidas

Crítérios Quantitativos de Avaliação do Marcador C4d

Avaliação quantitativa para a marcação de C4d, de acordo com a porcentagem em cinco campos de grande aumento.

Graduação

C4d0 – Negativo (0%)

C4d1 – Mínimo (acima de 0% e menor do que 10%)

C4d2 – Focal (de 10 a 50%)

C4d3 – Difuso (mais de 50%)

6.2. ANEXO II

TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

Anticorpos utilizados

1. Anticorpo C4d anti-humano policlonal (C4dpAb, Biomedica Gruppe, Viena, Áustria).
2. Anticorpo CD20 anti-humano monoclonal (CD20mAb, Dako, Carpinteria, Califórnia, EUA).

Confecção das lâminas de imunoistoquímica

Este protocolo foi desenvolvido para cortes de tecido embebidos em parafina e fixados em formalina neutra tamponada a 10%.

1. Desparafinização e reidratação dos cortes teciduais.
 - a) Permanência das lâminas com os cortes teciduais em estufa a 60°C por 30 minutos.
 - b) Duas passagens de cinco minutos cada em xilol.
 - c) Passagens em álcoois em soluções com concentrações decrescentes: 100%, 90%, 70% e 50%.
 - d) Lavar em água destilada.
2. Recuperação antigênica dos cortes teciduais.
 - a) Aquecer solução de citrato de sódio 0,1M pH 6,0 em banho-maria até 92°C.
 - b) Colocar as lâminas e deixar por 30 minutos na solução.
 - c) Retirar a solução com as lâminas do banho-maria e deixar esfriar em temperatura por 20 minutos.
 - d) Lavar em água destilada.
3. Bloqueio da peroxidase endógena.
 - a) Colocar as lâminas em solução com 95 mL de metanol e 5 mL de água oxigenada 30 V (duas passagens de 10 minutos cada protegidas da luz).
 - b) Lavar em água destilada.
 - c) Lavar em PBS (duas vezes de cinco minutos cada).
4. Bloqueio das ligações inespecíficas.
 - a) Incubar as lâminas com solução de proteína inócua à amostra (BSA: *bovine serum albumine* 1%) por 30 minutos.
5. Bloqueio da biotina.
 - a) Aplicar kit A de bloqueio da biotina (Dako, Carpinteria, Califórnia, EUA) por 15 minutos.
 - b) Aplicar kit B de bloqueio da biotina (Dako, Carpinteria, Califórnia, EUA) por 15 minutos.
6. Aplicação do anticorpo primário.
 - a) Diluição dos anticorpos (em BSA a 1%):
 - CD20: 1/200
 - C4d: 1/50
 - b) Deixar escorrer o líquido das soluções prévias e aplicar o anticorpo primário.

- c) Colocar as lâminas em câmara úmida.
- d) Armazenar a câmara úmida em geladeira com temperatura de 4°C de um dia para outro (*overnight*).

7. Aplicação do anticorpo secundário.

- a) Lavar as lâminas em PBS durante cinco minutos por duas vezes.
- b) Incubar com anticorpo secundário biotilado (Dako LSAB System, Dako, Carpinteria, Califórnia, EUA) durante 40 minutos em temperatura ambiente.

8. Aplicação do complexo biotina-peroxidase.

- a) Lavar as lâminas em PBS durante cinco minutos por duas vezes.
- b) Incubar com complexo biotina-peroxidase (Dako LSAB System, Dako, Carpinteria, Califórnia, EUA) durante 40 minutos em temperatura ambiente.

9) Revelação com substrato cromógeno

- a) Lavar as lâminas em PBS durante cinco minutos por duas vezes.
- b) Solução de diaminobenzidina (DAB; Fluka Chemie AG, Buchs, Suíça): 60 mg de DAB em 100 mL de PBS e 1 mL de água oxigenada 30 V.
- c) Aplicar a solução de DAB nas lâminas por cinco minutos.

10. Lavar em água destilada.

11. Contracoloração

- a) Colocar as lâminas em hematoxilina durante dois minutos.

12. Desidratar

- a) Passagem das lâminas em álcoois com concentração progressiva: 50%, 70%, 90%, e 100%.
- b) Duas passagens de cinco minutos cada em xilol.

13. Montar com lamínula e Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

6.3. ANEXO III

PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA DA IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE PORTO ALEGRE

Protocolo número 1633/07

Parecer número 317/07

Data de Entrada: 12/07/2007

Parecer – “Após avaliação do protocolo acima descrito, o comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição.”

Data da Reunião – 07/08/2007

“Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Aprovados.”

6.4. ANEXO IV

TERMO DE CONFIDENCIALIDADE PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS

AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR DE UM PROJETO DE PESQUISA

Nome do Projeto – DETECÇÃO DE LINFÓCITOS B EM BIÓPSIAS DE ENXERTOS RENAIIS EM REJEIÇÃO MEDIDA POR LINFÓCITOS T AGUDA EM ALOENXERTOS RENAIIS DE DOADOR FALECIDO

Responsáveis pelo Projeto - Rafael Nazário Bringhenti, Elisete Keitel, Márcia Silveira Graudenz e Tatiana Ferreira Michelin

Objetivos do Projeto - O presente estudo visa a avaliar a evolução clínico-laboratorial de pacientes com o diagnóstico de rejeição aguda mediada por linfócitos T com ou sem rejeição aguda mediada por anticorpos concomitante, confirmado por exame histopatológico, classificando-os de acordo com as categorias estabelecidas pela classificação de Banff e dividindo-os em dois grupos: amostras com agregados de linfócitos B detectados por exame imunoistoquímico positivo para o marcador anti-CD20 monoclonal e amostras sem estes agregados de linfócitos B. Serão comparadas características demográficas, clínicas, laboratoriais e histopatológicas adicionais.

Explicações dos Procedimentos - O estudo utilizará dados de pacientes transplantados na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, coletados em prontuários e analisará as amostras de biópsias renais de enxertos destes mesmos pacientes, coletadas no período de 1º de janeiro de 1998 a 31 de dezembro de 2003, sendo o acompanhamento clínico efetuado até 31 de dezembro de 2008. Destes, serão selecionados os indivíduos que tenham o diagnóstico histopatológico de rejeição aguda mediada por linfócitos T (previamente denominada rejeição aguda celular), com ou sem rejeição aguda mediada por anticorpos (previamente denominada rejeição aguda humoral) concomitante. Será realizado estudo imunoistoquímico com o marcador anti-C4d policlonal, para avaliação da rejeição humoral, e com o marcador anti-CD20 monoclonal para a detecção de linfócitos B, conforme descrito no item “Materiais e Métodos” e revisão conforme atualizações de 2001, 2005 E 2007 da Classificação de Banff 1997.

Possíveis Benefícios - Possibilitar em nosso meio o diagnóstico de rejeição aguda mediada por anticorpos (rejeição humoral) em pacientes transplantados renais, disponibilizando uma abordagem diagnóstica e terapêutica específica para os casos futuros, com a validação do método; fornecimento de dados adicionais para a compreensão da fisiopatologia da rejeição aguda ao enxerto renal, particularmente os casos refratários à terapêutica corrente.

Exclusão do Estudo - Pacientes transplantados renais sem biópsias no período do estudo, biópsias em que o tecido renal seja insuficiente para a realização do estudo,

dados de prontuário incompletos, seguimento inadequado e o não preenchimento dos critérios histopatológicos de confirmação rejeição aguda mediada por linfócitos T, conforme atual classificação de Banff.

Confidencialidade, Privacidade e Anonimato - Todas as informações obtidas neste estudo, bem como as constantes do prontuário hospitalar, poderão ser publicadas apenas com finalidade científica, sem utilização de iniciais, números de prontuários ou qualquer outra forma de cadastro, mantendo-se o anonimato dos pacientes incluídos no projeto.

Justificativa para a Não Aplicação de um Termo de Consentimento Livre e esclarecido - A utilização de poucos (dois) cortes no bloco de parafina para a realização da pesquisa não esgotará o material biológico do paciente; os resultados da pesquisa terão aplicabilidade imediata com vistas à melhora dos resultados clínicos de todos os pacientes que vierem a ser transplantados posteriormente e ainda tem o potencial de contribuir para o manejo clínico dos pacientes que ainda estão em acompanhamento, pela possibilidade de identificar atividade humoral. Adicionalmente, tratando-se de um estudo envolvendo 10 anos de experiência com o transplante renal, muitos pacientes envolvidos no estudo já foram a óbito neste período. Desta forma, provavelmente os casos de maior interesse clínico (aqueles em que o transplante não funciona e/ou ainda resultou em fatalidade) são parte fundamental do presente estudo. Portanto, considerando-se a impossibilidade de obtenção de todos os termos de consentimento e a ausência de prejuízo ao paciente pela utilização de poucos cortes no material disponível (bloco de parafina), de outra forma sem perspectiva de utilização em seu benefício, propomos um Termo de Compromisso pela sua utilização com fins científicos.

Por este instrumento, declaramos estar cientes de todas as etapas envolvidas neste projeto e concordamos em realizá-lo conforme aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre e do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre.

Porto Alegre, junho de 2007.

.....
Elizete Keitel
(Orientadora, PPG-UFCSPA)
Pesquisadora Responsável

.....
Rafael Nazário Bringhenti
(Mestrando, PPG-UFCSPA)

.....
Márcia Silveira Graudenz
(Co-orientadora, PPG-UFCSPA)

.....
Tatiana Ferreira Michelin
(Co-orientadora, PPG-UFCSPA)

7.5. Infiltrado inflamatório capilar peritubular

7.5.1. () ptc0

7.5.2. () ptc1

7.5.3. () ptc2

7.5.4. () ptc3

8. Achados crônicos

8.1. Atrofia tubular

8.1.1. () ct0

8.1.2. () ct1

8.1.3. () ct2

8.1.4. () ct3

8.2. Fibrose intersticial

8.2.1. () ci0

8.2.1. () ci1

8.2.2. () ci2

8.2.3. () ci3

8.3. Glomerulopatia do enxerto

8.3.1. () cg0

8.3.2. () cg1

8.3.3. () cg2

8.3.4. () cg3

8.4. Aumento de matriz mesangial

8.4.1. () mm0

8.4.2. () mm1

8.4.3. () mm2

8.4.4. () mm3

8.5. Espessamento fibrointimal arterial

8.5.1. () cv0

8.5.2. () cv1

8.5.3. () cv2

8.5.4. () cv3

8.6. Hialinose arteriolar

8.6.1. () ah0

8.6.2. () ah1

8.6.3. () ah2

8.6.4. () ah3

9. Outros achados

.....

10. Marcação de C4d

10.1. () C4d0

10.2. () C4d1

10.3. () C4d2

10.4. () C4d3

11. Classificação de Banff

- 11.1. () Normal
- 11.2. () Rejeição mediada por anticorpos
 - 11.2.1. () Aguda tipo I
 - 11.2.2. () Aguda tipo II
 - 11.2.3. () Aguda tipo III
 - 11.2.4. () Crônica ativa
- 11.3. () Alterações limítrofes
- 11.4. () Rejeição mediada por células T
 - 11.4.1. () Aguda tipo IA
 - 11.4.2. () Aguda tipo IB
 - 11.4.3. () Aguda tipo IIA
 - 11.4.4. () Aguda tipo IIB
 - 11.4.5. () Aguda tipo III
 - 11.4.6. () Crônica ativa
- 11.5. Fibrose intersticial e atrofia tubular sem indício de etiologia específica
 - 11.5.1. () Grau I
 - 11.5.2. () Grau II
 - 11.5.3. () Grau III
- 11.6. Outras categorias
 - 11.6.1. () Necrose tubular aguda
 - 11.6.1.1. () Focal
 - 11.6.1.2. () Extensa
 - 11.6.2. () Toxicidade por inibidores da calcineurina
 - 11.6.2.1. () Aguda
 - 11.6.2.2. () Crônica
 - 11.6.3. () Pielonefrite aguda
 - 11.6.4. () Nefrite túbulo-intersticial
 - 11.6.5. () Poliomavírus
 - 11.6.6. () Citomegalovírus
 - 11.6.7. () Obstrução crônica
 - 11.6.8. () Nefroesclerose hipertensiva
 - 11.6.9. ()

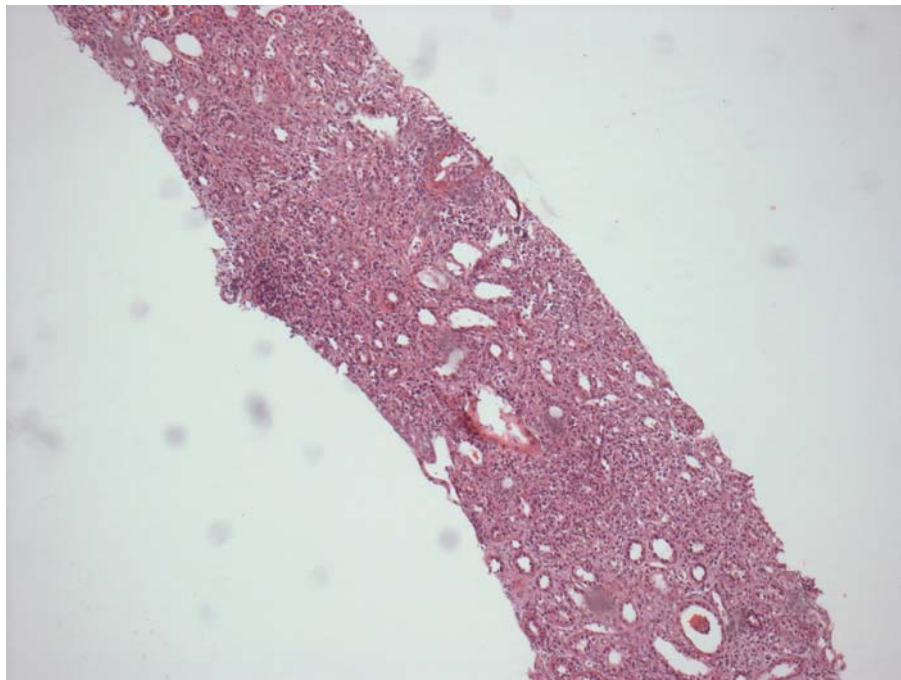
Outros.....

12. Marcação de linfócitos B (CD20)

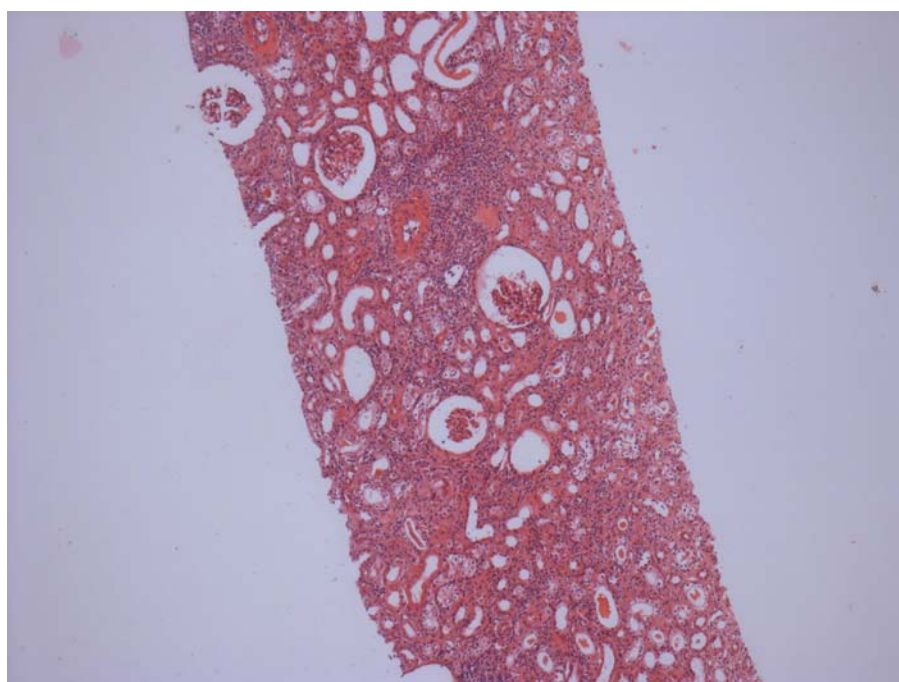
- 12.1. () Negativa
- 12.2. () Positiva
 - 12.2.1. () – Número de células marcadas por campo de 400 aumentos
 - 12.2.2. Categoria: 1 () 2 () 3 () 4 ()

6.6. ANEXO VI

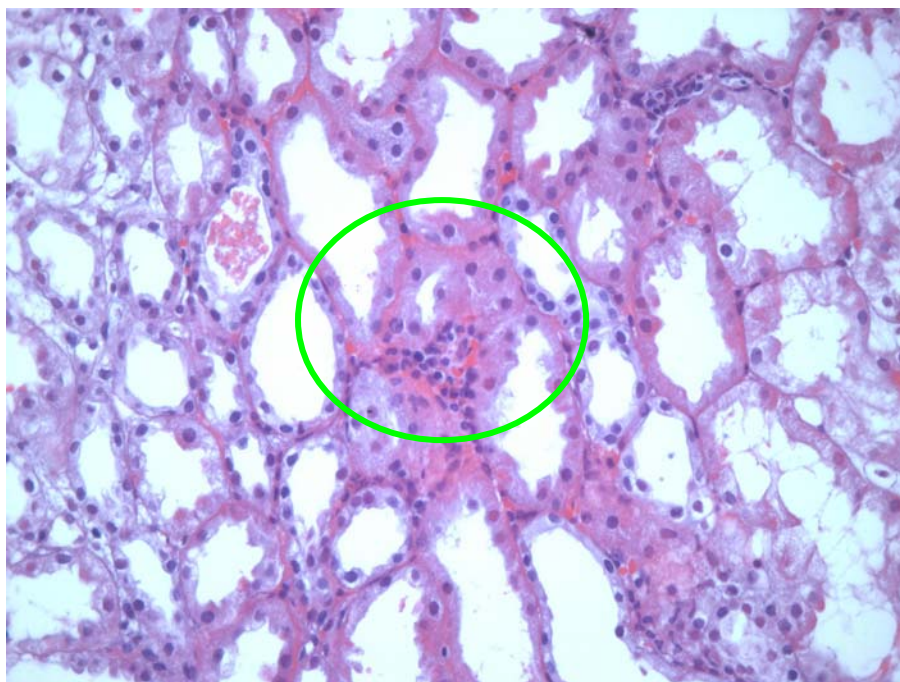
IMAGENS ILUSTRATIVAS DO TRABALHO



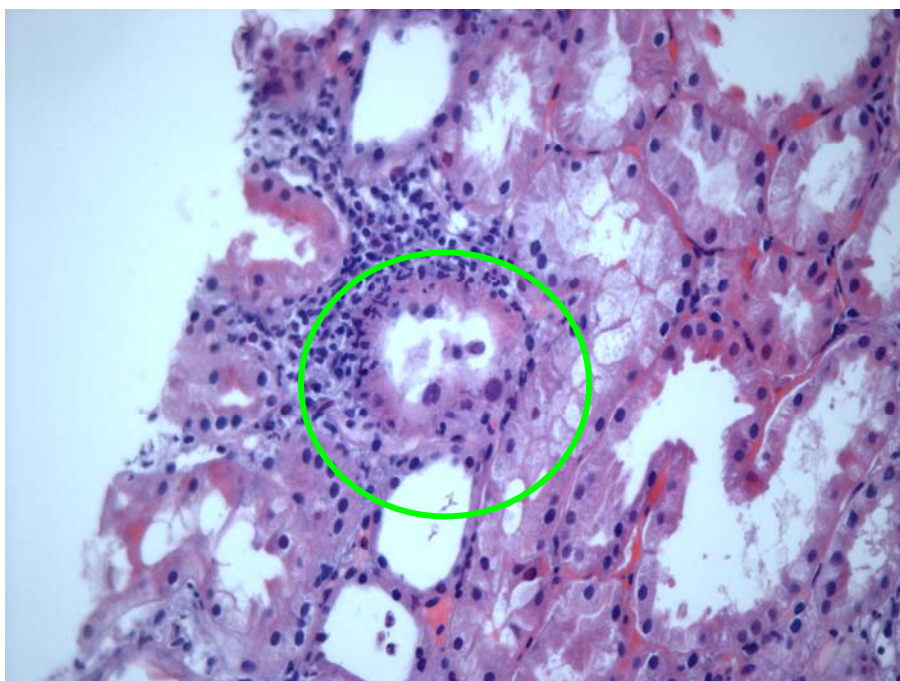
Infiltrado intersticial (hematoxilina-eosina, 40 aumentos).



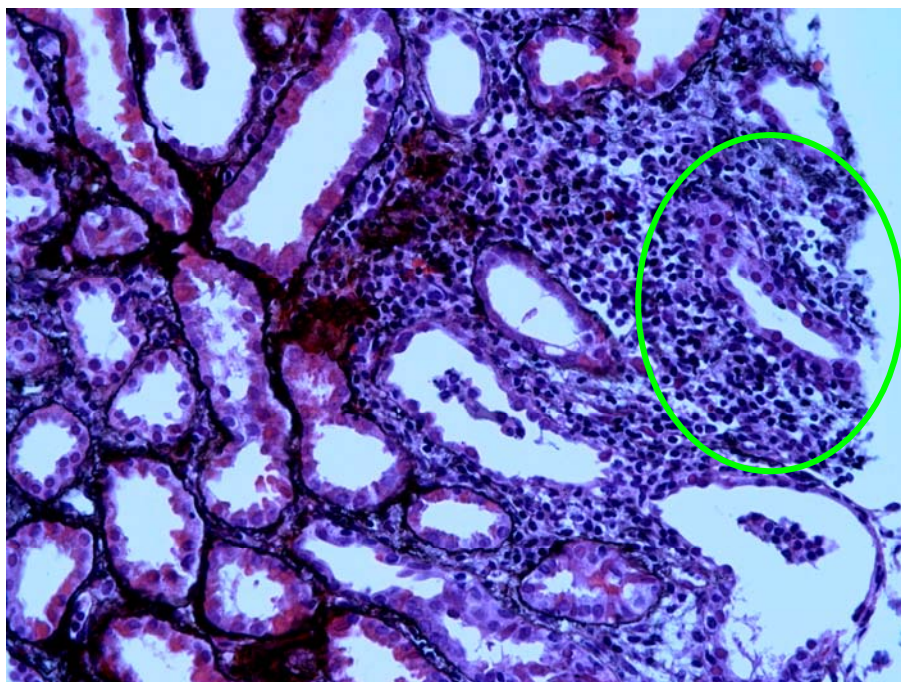
Infiltrado intersticial (hematoxilina-eosina, 40 aumentos).



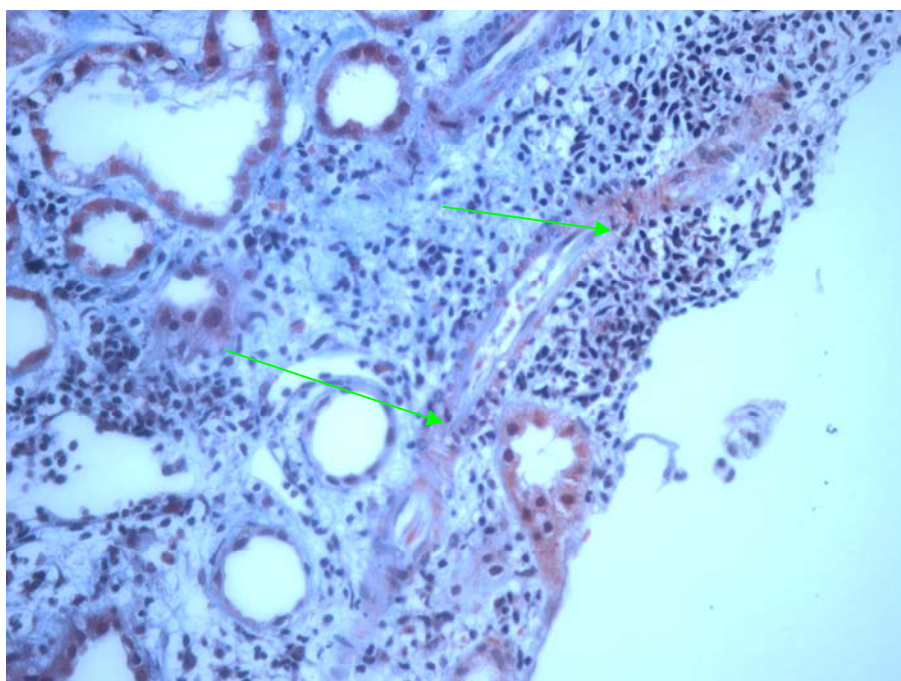
Tubulite moderada – t2 – (hematoxilina-eosina, 400 aumentos).



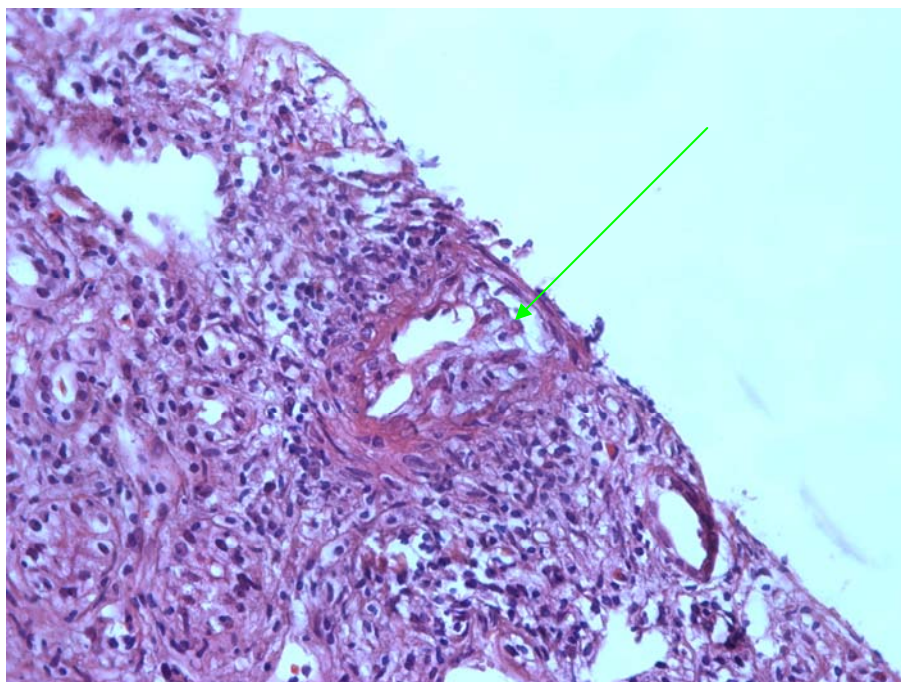
Tubulite acentuada – t3 – (hematoxilina-eosina, 400 aumentos).



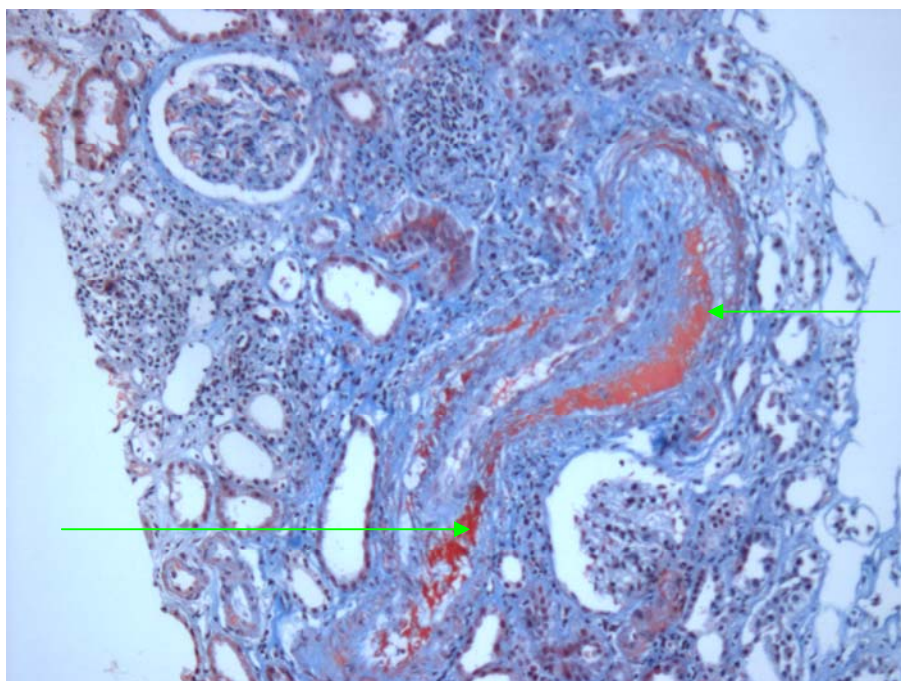
Tubulite acentuada – t3 – com ruptura da membrana basal tubular (prata metenamina – ácido periódico, 400 aumentos).



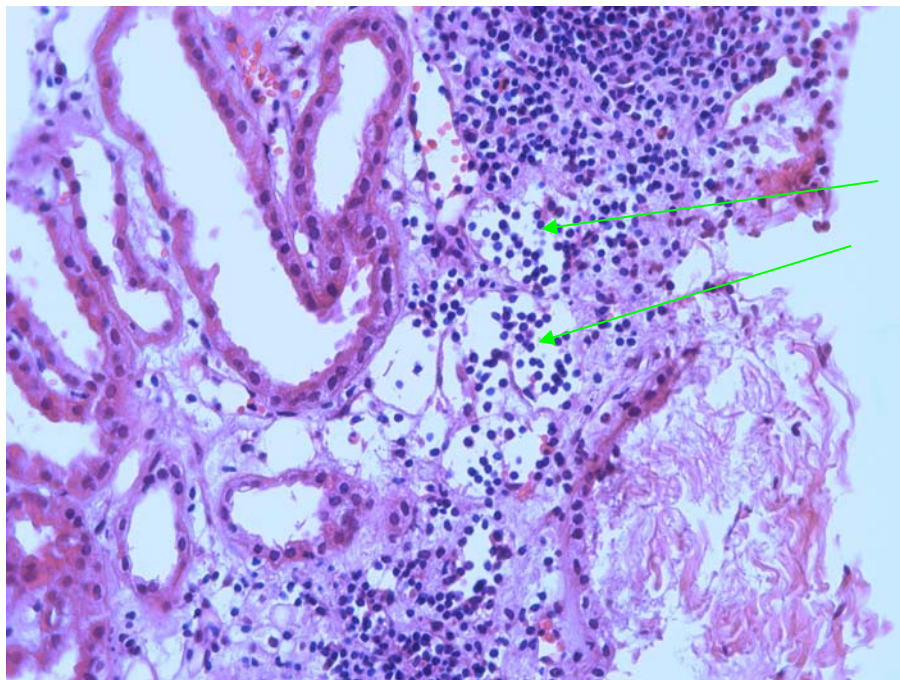
Vasculite leve – v1– (tricroômico de Masson, 400 aumentos).



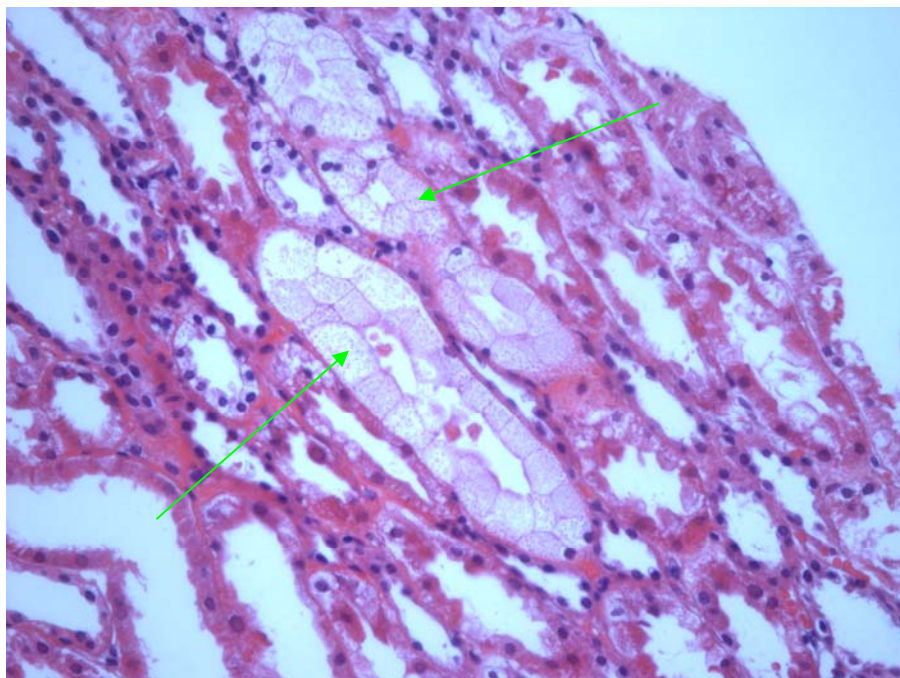
Vasculite moderada – v2 – (hematoxilina-eosina, 400 aumentos).



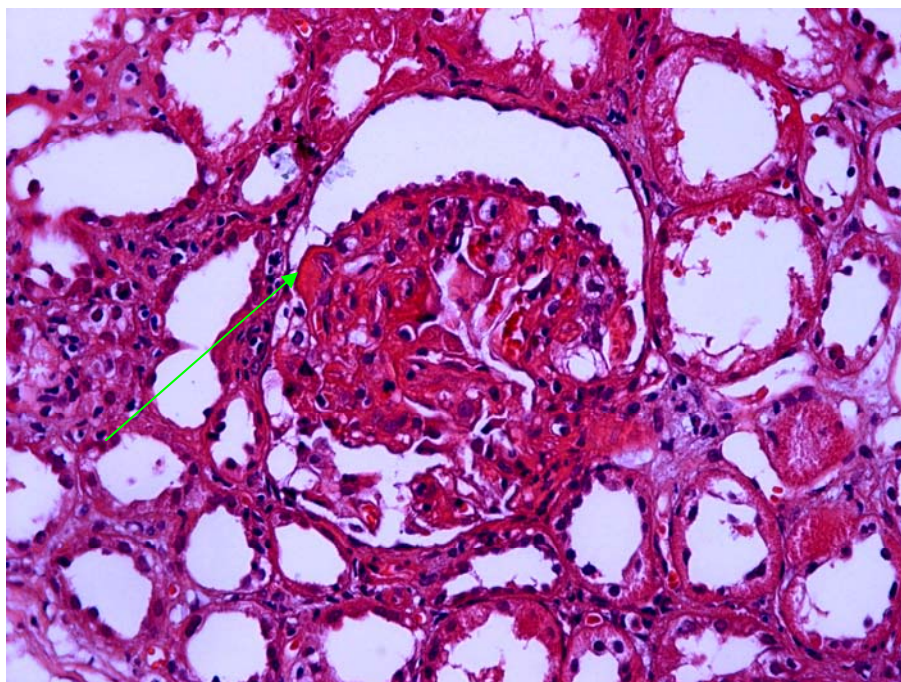
Vasculite acentuada – v3 – com necrose fibrinóide (tricroômico de Masson, 100 aumentos).



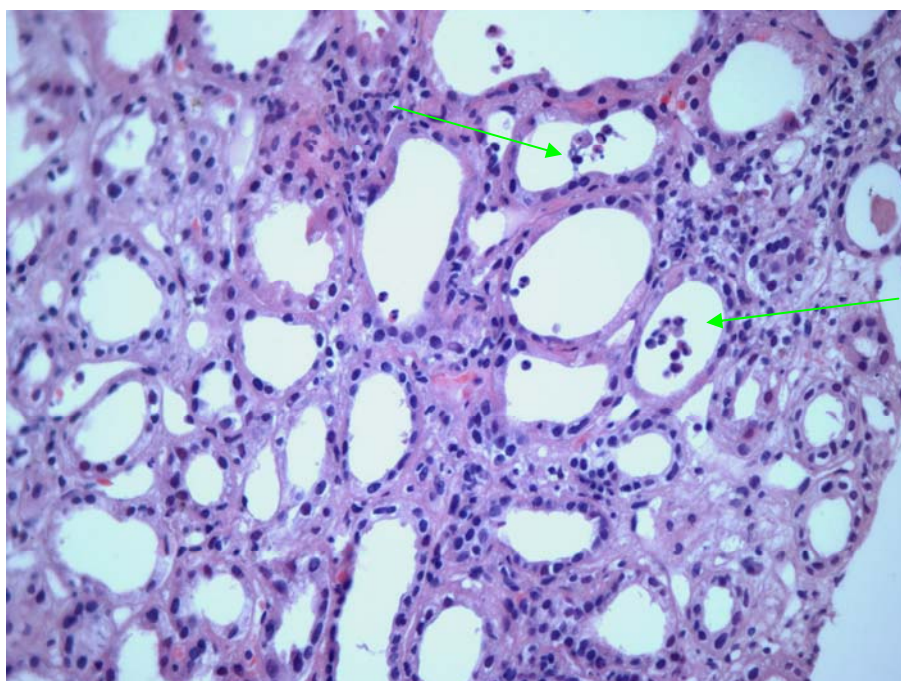
Marginação por células inflamatórias acentuada em capilares peritubulares – ptc3 – (hematoxilina-eosina, 400 aumentos).



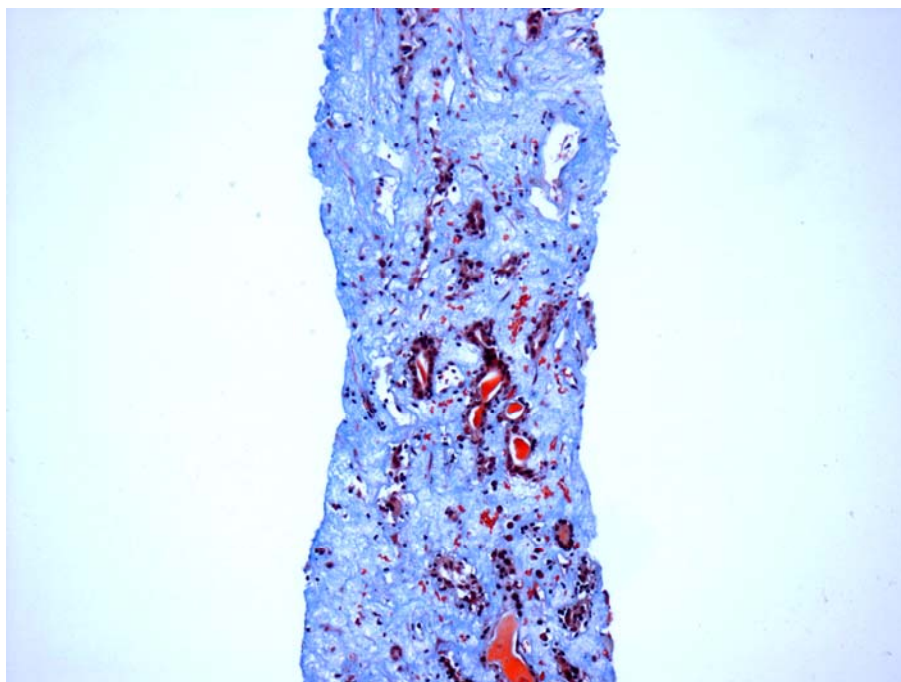
Toxicidade aguda por inibidor da calcineurina com vacuolização isométrica de células epiteliais tubulares (hematoxilina-eosina, 400 aumentos).



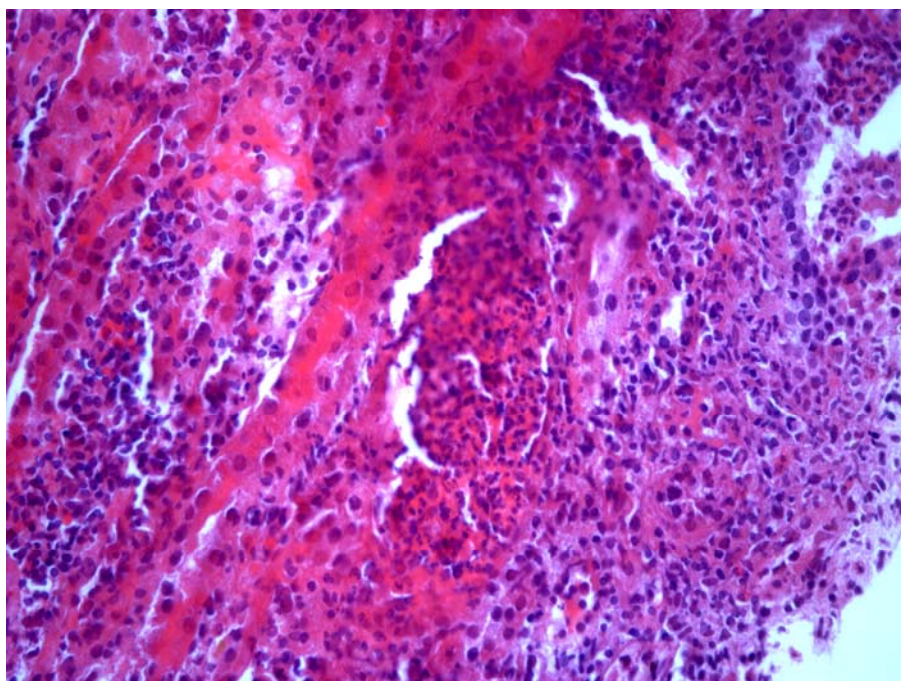
Toxicidade aguda por inibidor da calcineurina com microangiopatia trombótica de capilares glomerulares (hematoxilina-eosina, 400 aumentos).



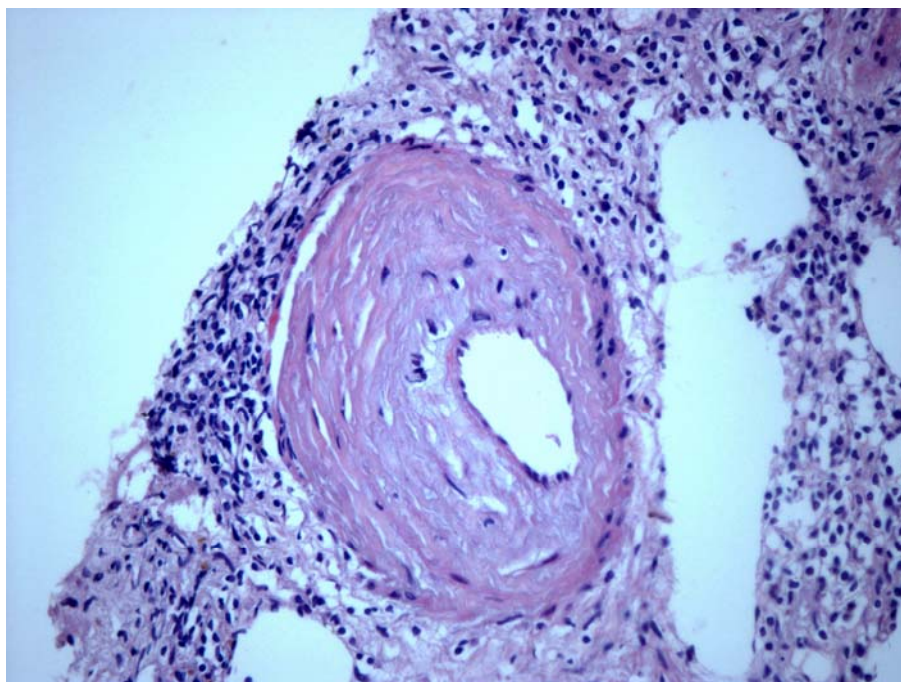
Necrose tubular (hematoxilina-eosina, 400 aumentos).



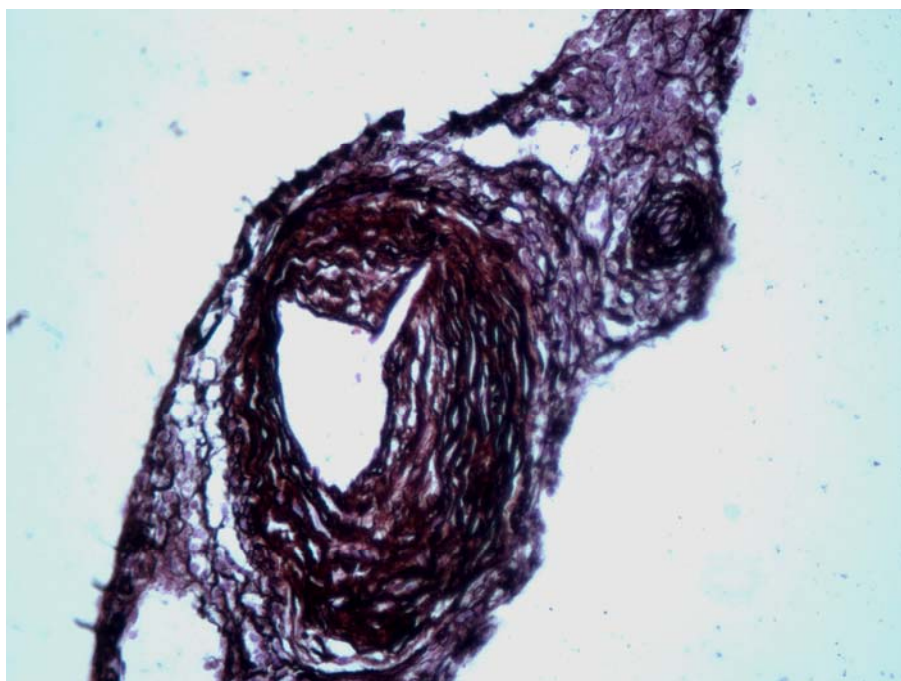
Fibrose intersticial e atrofia tubular (tricromico de Masson, 100 aumentos).



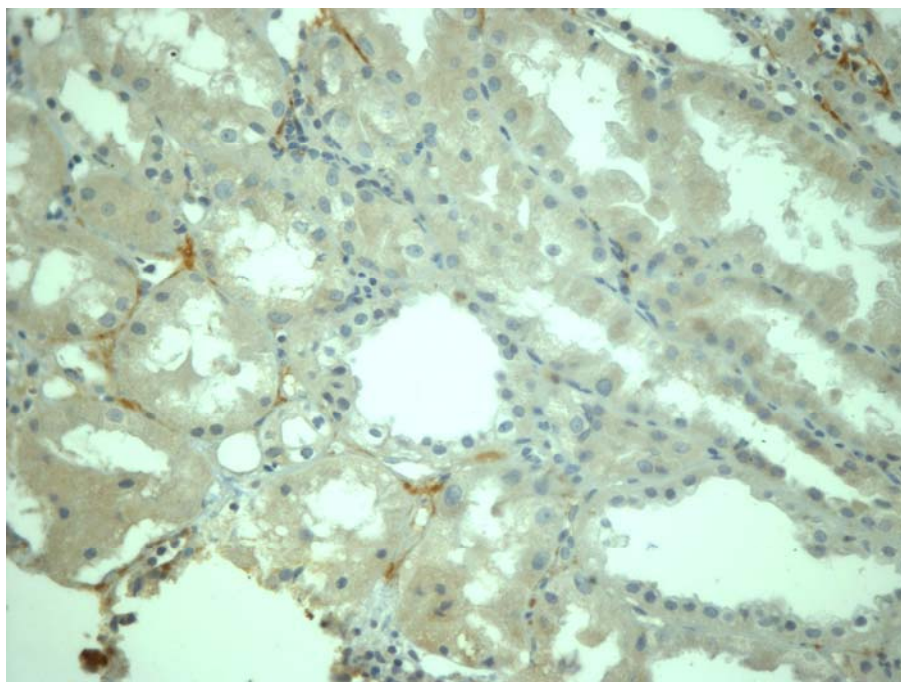
Pielonefrite aguda (hematoxilina-eosina, 400 aumentos).



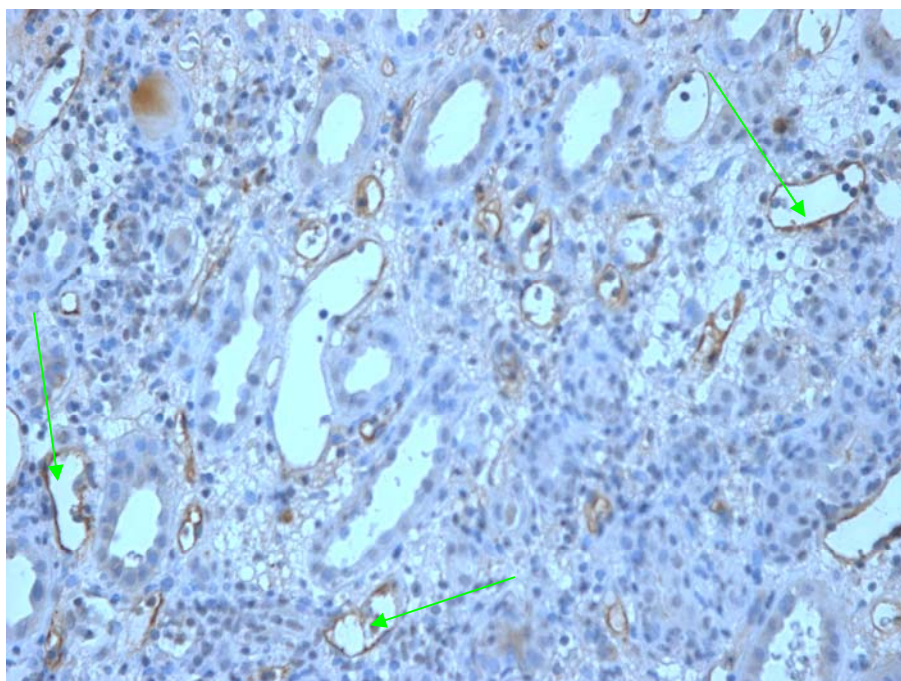
Arteriosclerose hipertensiva (hematoxilina-eosina, 400 aumentos).



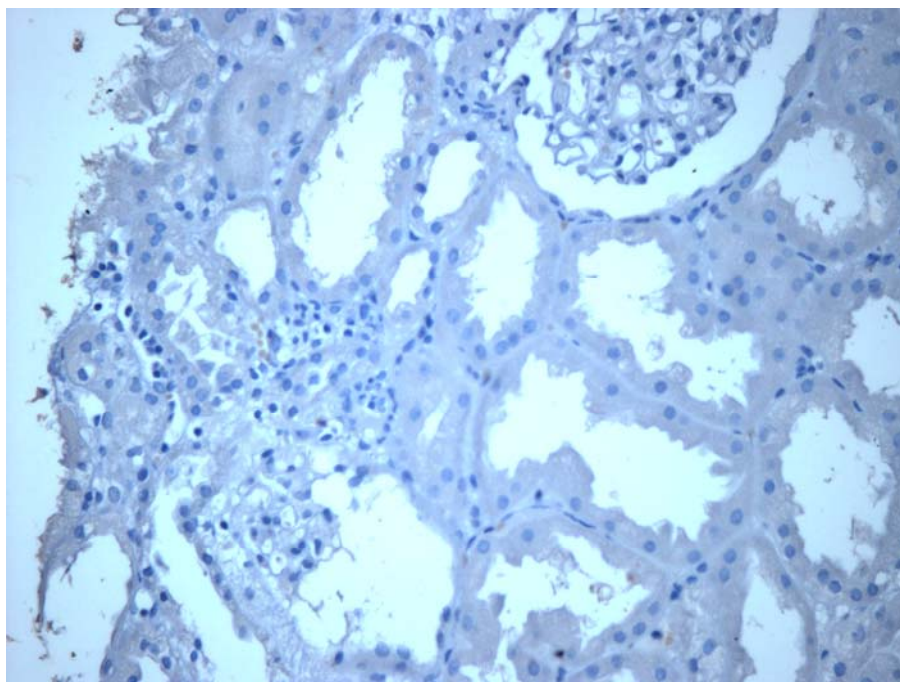
Arteriosclerose hipertensiva (prata metenamina – ácido periódico, 400 aumentos).



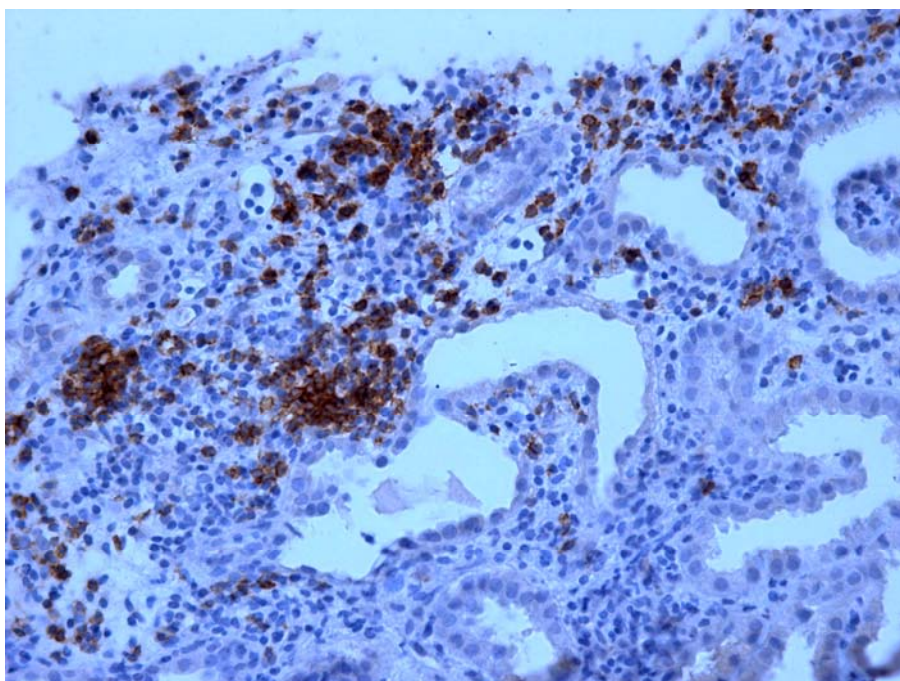
C4d negativo (imunoistoquímica, 400 aumentos).



C4d positivo em capilares peritubulares (imunoistoquímica, 100 aumentos).



CD20 negativo (imunoistoquímica, 400 aumentos).



CD20 positivo categoria 1 (imunoistoquímica, 400 aumentos).

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](#)