

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A FRAÇÃO DO COMPLEMENTO C4d, ANTICORPOS  
ANTI-HLA DOADOR ESPECÍFICOS E INFILTRADOS DE CÉLULAS B EM  
ENXERTOS RENAIIS COM REJEIÇÃO**

**VIRNA NOWOTNY CARPIO**

Porto Alegre  
2012

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A FRAÇÃO DO COMPLEMENTO C4d, ANTICORPOS  
ANTI-HLA DOADOR ESPECÍFICOS E INFILTRADOS DE CÉLULAS B EM  
ENXERTOS RENAIIS COM REJEIÇÃO**

Virna Nowotny Carpio

Orientador: Prof. Dr. Francisco J. Veríssimo Veronese

A apresentação desta tese é requisito do programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre

2012

*Aos maiores amores da minha vida,  
Marcos e Lara,  
pelo apoio incondicional e compreensão*

## AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Veronese, pelos ensinamentos transmitidos, amizade e paciência em todos os momentos, pela dedicação e pela disposição em ajudar. Obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntos!

- Aos meus pais e irmãos, base de toda minha formação.

- Aos colegas do laboratório de biologia molecular aplicado à nefrologia, pelo convívio e incentivo.

- Aos queridos amigos que fiz durante esta trajetória, Claus Dummer, Melina Loreto, Evlin Eickhoff, Tiago Lopes, pelas inúmeras contribuições.

- A todos os amigos e professores do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

- Ao Serviço de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em especial ao Prof. Dr. Luiz Fernando Jobim, a Beatriz Gil e Adriane Kulzer pelo apoio fundamental na realização deste projeto.

- Ao Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Prof<sup>a</sup>.Dra. Maria Isabel Edelweiss e Dra.Karla Laís Pegas.

- Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva pela sua disposição e suporte técnico para a captura e análise das imagens digitais.

- Laboratório de Nefrologia Genética, Celular e Molecular da Universidade de São Paulo, Prof<sup>a</sup>. Dra. Irene de Lourdes Noronha e Dr. Hugo Ludovico Martins.

- Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade.

- Aos funcionários do GPPG, em especial à Vania Naomi Hirakata, pela análise estatística deste trabalho.

- Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e ao Programa de Fomento à Pós-Graduação (PROF) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

## RESUMO

**Introdução:** O fragmento C4d e os anticorpos anti-HLA doador específicos (DSA) são marcadores de resposta humoral em enxertos renais com rejeição, mas o papel das células B nesse processo ainda não é claro. Neste estudo foi avaliada a correlação entre C4d, DSA e células B de enxertos com disfunção e sua associação com aspectos morfológicos, função e sobrevida do rim transplantado.

**Material e Métodos:** A marcação para C4d, células B CD20<sup>+</sup> e plasmócitos CD138<sup>+</sup> foi realizada por imunoperoxidase em biópsias por indicação de 110 receptores de transplante renal. Positividade para CD20 e CD138 foi definida por curva ROC ( $\geq 5$  céls./mm<sup>2</sup>). O soro coletado concomitante a biópsia foi testado para DSA classe I e classe II. Estes marcadores foram correlacionados com dados clínicos e do transplante, a histopatologia de Banff e a evolução do rim transplantado.

**Resultados:** Depósitos de C4d e DSA circulantes foram detectados em 100% e 70% dos pacientes com rejeição mediada por anticorpos (RMA) respectivamente, e nos casos de rejeição aguda celular (RAC) em 42% ( $p < 0,001$ , vs. RMA) e 28% ( $p = 0,003$ , vs. RMA). Estes dois marcadores correlacionaram-se positivamente ( $r = 0,31$ ,  $p = 0,016$ ). Houve correlação significativa entre DSA e plasmócitos CD138<sup>+</sup> ( $r = 0,32$ ,  $p = 0,006$ ), mas as células CD20 e CD138 não se correlacionaram entre si. As células CD138<sup>+</sup> predominaram na RMA, associadas com maior painel pré-transplante e DSA, mas não a C4d, e as células CD20<sup>+</sup> predominaram na RAC e nas biópsias com fibrose intersticial/atrofia tubular, associadas a maior incompatibilidade HLA e a retransplantes. Pacientes com C4d<sup>+</sup> tiveram pior função e sobrevida do enxerto em três anos de transplante, e aqueles com DSA<sup>+</sup> uma pior

sobrevida do enxerto. Positividade para CD20 ou CD138 não foi preditiva da função ou sobrevida do enxerto. Na análise multivariada, somente o C4d foi fator de risco para perda do enxerto.

**Conclusões:** Esses resultados confirmam o valor prognóstico do C4d e dos DSA para uma pior evolução do enxerto renal, e sugerem uma associação das células B CD20<sup>+</sup> com parâmetros de rejeição celular e dos plasmócitos CD138<sup>+</sup> com marcadores de resposta humoral. Entretanto, nesse estudo o infiltrado de células B na biópsia do enxerto não foi preditivo de uma pior evolução do rim transplantado.

**Palavras chave:** transplante renal, rejeição aguda, C4d, rejeição mediada por anticorpos, células B CD20, plasmócitos CD138.

## ABSTRACT

**Introduction:** The fragment C4d and the donor specific anti-HLA antibodies (DSA) are markers of the humoral response in rejecting kidney grafts, but the role of B cells in this process is still unclear. In this study we evaluated the correlation between C4d, DSA and B cells in dysfunctional grafts, and their association with morphological features, and graft function and survival.

**Material and Methods:** The staining for C4d, CD20<sup>+</sup> B cells and CD138<sup>+</sup> plasmocytes were done by immunoperoxidase in 110 kidney graft biopsies for cause. Positivity for CD20 and CD138 were established by ROC curve ( $\geq 5$  cells/mm<sup>2</sup>). Serum collected at biopsy were tested for anti-HLA class I and II antibodies. These markers were correlated with clinical and transplant characteristics, Banff histopathology and graft outcomes.

**Results:** C4d deposits and circulating DSA were detected in 100% and 70% of the patients with antibody-mediated rejection (AMR) respectively, and in cases with acute cellular rejection (ACR) in 42% ( $p < 0.001$ , vs. AMR) and 28% ( $p = 0.003$ , vs. AMR), respectively. Both markers were positively correlated ( $r = 0.31$ ,  $p = 0.016$ ), and there was also a significant correlation between DSA and plasmocytes CD138<sup>+</sup> ( $r = 0.32$   $p = 0.006$ ). CD20 and C138 cells were not significantly correlated. Plasmocytes CD138<sup>+</sup> predominated in AMR, and were associated with higher pre transplant PRA and DSA positivity, but not with C4d. CD20<sup>+</sup> B cells were highly expressed in ACR and in biopsies with interstitial fibrosis and tubular atrophy, in association with more HLA mismatches and re-transplants. Patients with C4d had poorer graft function and survival, and those

with DSA<sup>+</sup> also had a worse graft survival in three years of transplant. CD20 or CD138 cells were not predictive of graft outcomes. In multivariate analysis, only C4d remained a risk factor for graft loss.

**Conclusion:** These results confirm the prognostic value of C4d and circulating DSA for a worse kidney graft outcome, and suggest an association of CD20<sup>+</sup> B cells with parameters of cellular rejection whereas CD138<sup>+</sup> plasmacytes correlated with markers of the humoral response. However, in this study the B cell infiltrate in graft biopsy was not predictive of adverse outcomes to the transplanted kidney.

**Key words:** renal transplantation, acute rejection, C4d, donor specific antibodies, CD20 B cells, CD138 plasmacytes

## Lista de tabelas

Tabela 1. Critérios diagnósticos para RMA aguda	28
Tabela 2. Critérios diagnósticos para RMA crônica	30
Tabela 3. Resumo dos principais estudos sobre a detecção do fragmento C4d em biópsia de enxerto renal	34
Tabela 4. Estudos clínicos de células plasmáticas no transplante renal	45
Tabela 5. Resumo dos estudos que avaliaram o papel do infiltrado de células B no enxerto renal	48
Tabela 6. Estudos publicados que avaliaram a associação entre linfócitos B, rejeição aguda e os desfechos do enxerto renal	49

## **Lista de Figuras**

Figura 1. Mecanismos efetores da rejeição alogênica	25
Figura 2. Vias de ativação do sistema do complemento	32
Figura 3. Formação do fragmento C4d	33
Figura 4. Interpretação da coloração para C4d no enxerto renal	36
Figura 5. Linfopoiese da célula B	44
Figura 6. Tráfego das células B no enxerto renal durante a rejeição aguda	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

CPH	complexo principal de histocompatibilidade
DSA	anticorpos anti-HLA doador específico
HLA	antígeno leucocitário humano
IL	interleucina
IFN	interferon
TNF	fator de necrose tumoral
RA	rejeição aguda
RCA	rejeição celular aguda
SR	sem rejeição
FI/AT	fibrose intersticial/atrofia tubular
RMA	rejeição mediada por anticorpos
APC	célula apresentadora de antígeno
CPT	capilar peritubular
ATG	globulina anti-timocitária
IVIg	imunoglobulina polivalente humana
Ig	imunoglobulina
IF	imunofluorescência
IHC	imunohistoquímica
PM	peso molecular
RMAC	rejeição crônica mediada por anticorpos
RMAA	Rejeição aguda mediada por anticorpos
RCB-	Complexo receptor de antígeno em célula B

## SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract	8
Lista de Abreviaturas	12
Capítulo 1. Introdução	14
Capítulo 2. Referencial Teórico	20
2.1. Rejeição de Aloenxertos	21
2.2. Rejeição Mediada por Anticorpos	25
2.2.1 Rejeição Aguda Mediada por Anticorpos	26
2.2.2 Rejeição Crônica Mediada por Anticorpos	29
2.3. Marcadores de Rejeição Mediada por Anticorpos	31
2.3.1 Fragmento C4d	31
2.3.2 Anticorpos específicos contra doador (DAS)	38
2.3.3 Linfócito B e Plasmócito	41
2.3.3.1 Linfopese do linfócito B	41
2.3.3.2 Linfócito B e Plasmócito na rejeição do transplante	44
Capítulo 3. Justificativa	51
Capítulo 4. Objetivos	54
Capítulo 5. Referências Bibliográficas	56
Capítulo 6. Artigo “ ASSOCIATION BETWEEN C4D, DONOR-SPECIFIC HLA ANTIBODIES AND B CELLS IN KIDNEY GRAFTS WITH REJECTION”	73
Capítulo 7. Considerações Finais	116
Anexos	119

## **Capítulo 1. Introdução**

Após várias décadas de procedimentos experimentais, o transplante renal começou a ser realizado com sucesso em seres humanos a partir de 1950. No Brasil, iniciou-se efetivamente em 1965, alcançando expressivo crescimento na década de 1980 (1). É um tratamento bem estabelecido, principalmente devido à evolução da histocompatibilidade, aos avanços na preservação de órgãos, às drogas imunossupressoras mais efetivas e ao melhor monitoramento dos pacientes (2,3). Atualmente o transplante renal representa o tratamento de escolha para a maioria dos pacientes portadores de insuficiência renal crônica terminal, pois melhora a sobrevida e a qualidade de vida desses pacientes (4,5).

O transplante de órgão de um indivíduo para outro geneticamente distinto resulta no desenvolvimento de uma resposta imune específica, conhecida como rejeição, que é capaz de destruir o enxerto.

Apesar dos progressos alcançados no manejo clínico e na imunossupressão de receptores de transplante renal, a rejeição permanece ainda como o grande desafio a ser vencido e os principais alvos moleculares envolvidos nessa reação são as moléculas alogênicas do Complexo Principal de Histocompatibilidade(CPH), HLA de classe I e II (6).

Diversos estudos sobre a sensibilização aos antígenos do sistema HLA (antígenos leucocitários humanos, do inglês *human leukocyte antigens*) no pós-transplante renal têm indicado que esta via pode ser importante na detecção dos pacientes com maior risco de rejeição e perda do enxerto (7,8).

Os antígenos do sistema HLA, em humanos, são geneticamente determinados e encontram-se no braço curto do cromossomo 6 e constituídos por glicoproteínas, exercendo importantes funções no sistema imune (9).

Estes antígenos são divididos em duas classes, denominadas I e II. Os antígenos de classe I, isto é, HLA-A, B e C estão presentes nas membranas citoplasmáticas da maioria das células nucleadas do organismo, incluindo os linfócitos T e B, plaquetas e células de órgãos parenquimatosos, sendo os alvos dos linfócitos T citotóxicos, e são facilmente detectados por métodos sorológicos. Os antígenos de classe II, principalmente HLA-DP, DQ e DR, são menos bem caracterizados e têm distribuição restrita. São normalmente encontrados em linfócitos B, células T ativadas, macrófagos, no endotélio vascular e em algumas células epiteliais. A compatibilização dos pares doador e receptor nos antígenos do CPH é importante para o sucesso dos transplantes (10).

O papel central dos linfócitos T na rejeição ao enxerto está bem estabelecido, porém com a ocorrência de algumas formas graves de rejeição e a crescente evidência de que, além dos mecanismos celulares, mecanismos humorais também estejam envolvidos na rejeição aguda e crônica do enxerto, pesquisadores vêm demonstrando maior interesse na rejeição mediada por anticorpos (11,12). A rejeição mediada por anticorpos (RMA) foi constatada nos aloenxertos de rim e coração, e em ambas rejeições aguda e crônica. Estudos mostraram que 20-40% dos pacientes com rejeição aguda tem DSAs circulantes, e este grupo tem relativamente uma pior sobrevida do enxerto (11,13,14).

A correlação entre RA de mau prognóstico e o desenvolvimento de anticorpos específicos contra antígenos HLA classe I do doador também foi descrita por Halloran *et al.* (13), que consideram a ativação do sistema do complemento e a participação de neutrófilos os mecanismos patogênicos mais importantes na rejeição mediada por anticorpos (15). A identificação histológica da

fração C4d do complemento contribuiu, recentemente, para a demonstração da participação de anticorpos fixadores de complemento na agressão ao enxerto (11,16,17).

Feucht e colaboradores (18) foram os primeiros a demonstrar, em 1991, a marcação para C4d em capilares peritubulares de biópsias do enxerto renal de pacientes com alto risco imunológico e com prova cruzada pré-transplante negativa, associando este achado a uma menor sobrevida do enxerto em 1 ano de transplante. Posteriormente, em 2001 sugeriram que a presença do fragmento C4d em capilares peritubulares foi o preditor mais importante para a perda do enxerto renal (19). Importantes trabalhos demonstraram uma forte correlação da presença de C4d em capilares peritubulares e a presença de anticorpo anti-doador no soro do receptor e foram fundamentais para confirmar a especificidade do fragmento C4d como marcador de rejeição mediada por anticorpos, evidenciando os efeitos deletérios dos aloanticorpos e revelando C4d como indicador de menor sobrevida do enxerto (16,20).

Recentemente o esquema Banff introduziu o termo “rejeição mediada por anticorpos” como uma categoria individual para denominar os casos de rejeição humoral aguda e crônica (21-23)

A definição de rejeição aguda mediada por anticorpos foi baseada na evidência imunopatológica da ação de anticorpos anti-HLA produzindo deposição do sub-produto do componente C4 da via clássica do complemento - C4d - nos capilares peritubulares, e na evidência sorológica de anticorpos circulantes contra os antígenos HLA ou contra outros antígenos endoteliais do doador. Foi estabelecido como critério mínimo um dos três tipos histológicos: 1) evidência

morfológica de dano tissular agudo (do tipo necrose tubular aguda) na presença de C4d em capilares peritubulares; 2) marginação de neutrófilos e/ou trombose em capilares peritubulares com presença de C4d em capilares peritubulares; ou 3) presença de necrose fibrinóide em artérias e necrose das células musculares lisas da média de artérias com inflamação linfocitária (v3) na presença de C4d em capilares peritubulares (23).

Já Tsai e col (24) examinaram o impacto das células CD20+ intra enxerto e não encontraram uma associação dos linfócitos B CD20+ com RMA. Ao contrário, assim como seu grupo outros também identificaram uma associação com RAC.

As células B estão sendo cada vez mais reconhecidas como importantes interventoras na rejeição aguda e crônica do enxerto e pior sobrevida do enxerto. Episódios de rejeição aguda em órgãos como rim (25-29), coração (30), e fígado (31) mostraram infiltração de células B. As vias *homing* e migratória as rotas de entrada e de saída das células-B ao enxerto, estão sendo descobertas. Uma vez recrutadas para a lesão ao alloenxerto à linhagem precoce de células B CD20+ pode se expandir para agregado nodular denso e funcionar como apresentadora de antígenos com capacidade de auxiliar uma robusta rejeição mediada por células T. Esse tipo de rejeição costuma ser refratária ao uso de drogas imunossupressoras sendo pouco responsiva ao tratamento convencional com corticosteróides (32).

Os linfócitos B, CD20+ têm o potencial de diferenciarem-se em células plasmáticas CD138+. As células plasmáticas mais maduras, CD20- e CD138+, são as principais produtoras de aloanticorpos contra o doador conduzindo o eixo da rejeição vascular. Vários estudos têm apontado que células plasmáticas

CD138+ estão associadas com RMA e também são menos sensíveis a terapia convencional e podem predizer um pior desfecho (33). Apesar destes relatos, ainda é desconhecida a participação das células B na rejeição ao enxerto, no desfecho, na função e na sobrevida. Se elas estão envolvidas o mecanismo de ação ainda não está claro.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar marcadores imunológicos de risco para rejeição do enxerto renal, o C4d, os DSA circulantes, as células CD20 e os plasmócitos CD138, determinando a sua associação com a histopatologia, a função e a sobrevida do aloenxerto em receptores de transplante renal.

## **Capítulo 2. Referencial Teórico**

## 2.1 Rejeição de Aloenxertos

Com exceção da rejeição hiperaguda, que é mediada por aloanticorpos formados previamente ao transplante, os outros tipos de rejeição, em especial a rejeição aguda, são iniciados pelo reconhecimento aloantigênico pelo linfócito T. A reação de rejeição é mediada por uma variedade de leucócitos, incluindo macrófagos, células T citotóxicas (CD8+) e auxiliares (CD4+) e plasmócitos. Como consequência de uma rede de interações celulares e moleculares, que compreende também a secreção de diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, ocorre um recrutamento de células predominantemente inflamatórias para o enxerto que contribuem para a agressão ao órgão transplantado. A complexa rede de interações imunológicas leva a vários caminhos de agressão ao enxerto, às vezes com algumas características predominantes, mas muitas vezes com sobreposição de mecanismos celulares e humorais (34, 35).

O sistema imunológico dispõe de dois tipos de resposta ao órgão transplantado: resposta imune celular e humoral, que necessita do reconhecimento dos antígenos HLA do doador expressos nas células transplantadas para ser ativada. Ambas as vias de alo-reconhecimento são importantes no processo de rejeição e podem ocorrer simultaneamente (36).

Na rejeição celular linfócitos T CD4+ são ativados a partir da ligação do receptor de célula T a um peptídeo apresentado pela célula apresentadora de antígeno (APC) na presença de uma molécula HLA de classe II (primeiro sinal). Em conjunto com a interação de diversas moléculas co-estimulatórias (ex., B71-2/CD28, CD40/CD40L), compreendendo o segundo sinal, deflagram respostas intracitoplasmáticas e intra-nucleares que culminam na ativação clonal e

proliferação dos linfócitos T. Esse processo depende da ação de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  entre outras (30). Na fase efetora da resposta imune ao enxerto renal, os linfócitos T CD8+ são ativados e liberam grande quantidade de grânulos citotóxicos contendo perforina e granzima B, que induzem o surgimento de poros na membrana da célula lesada promovendo a entrada de água e lise celular. Com isso, ocorre a destruição das células através de um processo conhecido como citotoxicidade mediada por célula e mínima ativação de mecanismos pró-apoptóticos via Fas/Fas ligante. Esse mecanismo é capaz de aumentar o potencia de destruição dos fagócitos estimulados pelas citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4+ ativados (38,39). Essas citocinas são estímulos inflamatórios liberados pelos enxertos com imunoativação, bem como por leucócitos com atividade imunológica inata que transitam pelo enxerto. Seu efeito é o recrutamento e ativação de leucócitos aloreativos a partir do sangue periférico e importante potencialização da resposta inflamatória envolvida no processo de rejeição.

A resposta imune do tipo humoral é desencadeada pela ligação do antígeno ao anticorpo e seu mecanismo efetor é predominantemente mediado pela ativação da via clássica do complemento. Nesse caso, os antígenos são as próprias moléculas HLA expressas no órgão transplantado (classe I e classe II) e os anticorpos são especificamente direcionados para a destruição das células que os expressam (37).

Na rejeição humoral, ocorre logo após a ativação dos linfócitos T auxiliares quando são sintetizados fatores de crescimento e diferenciação como IL-4, IL-5 e

IL-6. Estes induzem a expansão clonal dos linfócitos B estimulados pelo antígeno, que acabam por produzir anticorpos específicos com atividade citotóxica contra as células do órgão transplantado (40). Após o transplante, o contato entre células do sistema imune do receptor com o endotélio vascular do órgão transplantado estimula a produção de anticorpos específicos contra o doador. O endotélio dos capilares peritubulares, assim como dos capilares glomerulares, expressam antígenos de classe I e II mesmo na fase de repouso. Este é o motivo pelo qual a microvasculatura renal, representada por células endoteliais, seja o principal alvo imunológico na rejeição humoral (19).

Portanto, idealmente, o diagnóstico desse tipo de rejeição deveria incluir a evidência do dano tecidual com a demonstração de que o mesmo foi mediado pela ativação da via clássica do complemento e, ainda, demonstrar a presença do aloanticorpo responsável por tal ativação (20).

A biópsia renal é o método “padrão-ouro” que é utilizado para a avaliação da disfunção renal dos enxertos e também para diagnóstico diferencial das condições que podem afetar o mesmo. Sendo assim, a análise histológica e imunohistoquímica em material de biópsia renal é o método de escolha para o diagnóstico de doenças independentemente do compartimento acometido (41,42).

O sistema de Banff utiliza uma escala semi-quantitativa para classificação e graduação das alterações histológicas agudas (a) e crônicas (c) que ocorrem nos glomérulos (g), túbulos (t), interstício (i), artérias e arteríolas (v) da rejeição do rim transplantado. Essa codificação é acompanhada de um escore numérico, que varia de zero a três (normal, leve, moderado, severo), na dependência da severidade ou extensão da alteração histológica (21,22). Os critérios para

adequação do fragmento biopsiado são dez ou mais glomérulos (no mínimo sete) e ao menos duas artérias (no mínimo uma).

As categorias de diagnóstico são: rim normal, rejeição mediada por anticorpos aguda e crônica (humoral), suspeita de rejeição (mediada por células T ou celular), rejeição celular tipo IA e IB (infiltrado celular mononuclear), IIA e IIB (arterite com ou sem necrose fibrinóide do músculo liso do vaso) ou III (arterite transmural), rejeição crônica mediada por células T, arteriopatia crônica do enxerto, fibrose intersticial e atrofia tubular sem evidência de etiologia específica de grau I, II ou III, e outras alterações não relacionadas a rejeição (21,23).

A tubulite, caracterizada pela invasão de células mononucleares no epitélio do túbulo renal, e a arterite da íntima são lesões indicativas de rejeição aguda do tipo celular (21,43). Em 2001, na 6ª conferência de Banff foram estabelecidos critérios para rejeição mediada por anticorpos, que foram adicionados à classificação de 1997.

O diagnóstico da rejeição aguda humoral freqüentemente é difícil devido a pouca quantidade de dados clínicos e histopatológicos específicos, e também pela dificuldade da imunohistoquímica convencional para detectar reagentes imunes humorais como anticorpos e produtos do complemento em biópsias do enxerto renal, pois estes são rapidamente depurados da superfície das células endoteliais (19,44).

Essa cascata de eventos culmina em lesão tecidual e manifestações clínicas variadas, podendo levar a rejeição aguda ou crônica do enxerto renal.

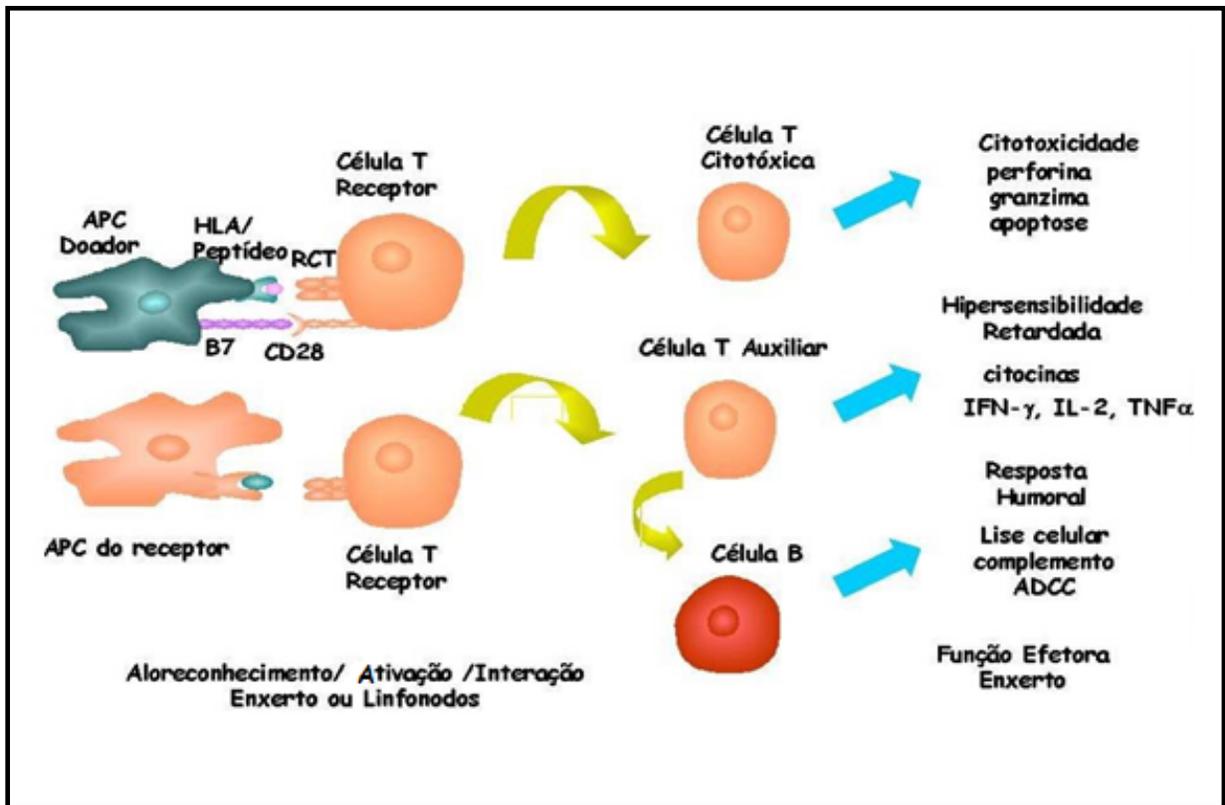


Figura 1. Mecanismos efetores da rejeição alôgenica (adaptado de ref. 10).

INF  $\gamma$  = interferon  $\gamma$ ; IL-2 = interleucina-2; ADCC = citotoxicidade celular dependente de anticorpos; R<sub>c</sub>T = receptor de célula T; CAA = célula apresentadora de antígeno.

## 2.2 Rejeição Mediada por Anticorpos

Os anticorpos podem causar dano ou disfunção tecidual per se ou em conjunto com células imunoinflamatórias competentes.

A rejeição mediada por anticorpos (RMA) foi recentemente reconhecida como uma importante causa de perda do enxerto aguda e crônica, de fato, as rejeições com envolvimento humoral ocorrem mais frequentemente do que se imaginava até pouco tempo.

Ocorre em uma fração substancial da pacientes transplantados renais, de 21 a 51%, e pode suceder no período pós-transplante imediato (rejeição

hiperaguda), nos primeiros meses pós-transplante (RMA aguda) ou tardiamente (RMA crônica) (45,46).

A RMA exige tratamento distinto quando comparado com a rejeição mediada por células T. A histopatologia não é suficientemente sensível para detectar a RMA. Desde então, a introdução da análise do fragmento C4d tem melhorado a acurácia do diagnóstico de RMA, com uma especificidade de 96% e sensibilidade de 95% (45-47).

Os critérios para diagnóstico são a presença de disfunção do enxerto associada a alterações histológicas características, presença de depósito de C4d no tecido renal, por imunofluorescência ou imunohistoquímica, e demonstração do DSA circulante (48,49).

### **2.2.1 Rejeição aguda mediada por anticorpos (RMA aguda)**

A existência de anticorpos anti-HLA pré-formados é sabidamente danosa ao enxerto por desencadear a rejeição hiperaguda. Quando os anticorpos anti-HLA surgem após o transplante os seus efeitos também são deletérios para o enxerto, por mecanismo humoral e podem coexistir com dano celular mediado por células T (13).

A rejeição hiperaguda ocorre em receptores que já possuem anticorpos dirigidos contra os antígenos HLA de classe I do doador. É encontrada naqueles pacientes que sofreram algum tipo de sensibilização prévia por transplante prévio, gestação ou transfusões. A RMA aguda difere da hiperaguda, na medida em que pode ser desencadeada tanto por anticorpos pré-formados quanto por anticorpos

anti-doador “de novo” (20,45,46,49). Estes anticorpos são possivelmente anti-HLA e /ou anti-endotélio, que ativam a via clássica do sistema complemento (20).

O paciente com RMA aguda apresenta uma perda aguda da função do enxerto em geral nas primeiras semanas após o transplante; clinicamente não pode ser distinguida da rejeição mediada por células e é resistente ao tratamento convencional de rejeição aguda (14,50,51). A incidência deste tipo de rejeição varia de 2,5 a 10% dos transplantados renais nos primeiros meses, mas pode desenvolver-se anos após o transplante, freqüentemente desencadeada por diminuição da imunossupressão (abandono, iatrogênica, ou má absorção) (46,49,52).

Observa-se que em 20 a 30% das rejeições agudas existe um componente humoral isolado ou associado ao componente celular (45,53,54).

As alterações histopatológicas encontradas na rejeição aguda mediada por anticorpos também são visualizadas nos quatro componentes histológicos do rim (55). Nos túbulos, costuma observar-se o dano agudo o qual abrange um espectro de alterações morfológicas que vai desde a perda da borda em escova até a necrose de coagulação. O interstício costuma apresentar edema, e em algumas vezes hemorragia e/ou necrose (16).

A alteração mais freqüente dos glomérulos é a presença de neutrófilos e monócitos na luz capilar, podendo ainda ocorrer trombos de fibrina e necrose intracapilares (16,56,57). As artérias, nos casos mais severos, apresentam necrose fibrinóide e/ou inflamação transmural (55,58).

Na conferência de Banff em 2001, publicada em 2003, foram estabelecidos os critérios objetivos para o diagnóstico e a classificação da rejeição aguda mediada por anticorpos.

Em termos histopatológicos, o dano tubular agudo caracteriza a classe I; a presença de neutrófilos e/ou monócitos e/ou a trombose em capilares peritubulares e/ou alças capilares glomerulares compõem a classe II; e a necrose fibrinóide e/ou arterite transmural qualifica como classe III. Além das alterações morfológicas, são necessários critérios sorológicos (positividade no soro para anticorpos anti-doador contra antígenos HLA ou outros) e imunopatológicos (positividade para a fração do complemento C4d por imunofluorescência ou imunistoquímica em biópsia renal) (23,54), conforme mostra a tabela 1.

**Tabela 1. Critérios diagnósticos para RMA aguda**

1. Evidência Morfológica de lesão tecidual aguda, como:

- lesão tubular aguda
- neutrófilos e/ou células mononucleares em capilares peritubulares
- necrose fibrinóide em artérias

2. Provas Imunopatológicas para detecção da ação de anticorpos

Presença de depósito de C4d em capilares peritubulares

3. Provas sorológicas de anticorpos circulantes específicos anti- doador

Anticorpo anti-HLA ou contra outros antígenos endoteliais

---

Adaptado de Colvin RB. Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection: Diagnosis and Pathogenesis. J. Am. Soc. Nephrol. 18:1046-1056,2007.

## **Tratamento da RMA aguda**

As intervenções terapêuticas são dirigidas para o controle da resposta dos anticorpos anti-HLA e não-HLA. Independentemente da natureza do anticorpo, o tratamento da RMA é baseado em quatro conceitos básicos:

- a. Eliminação de anticorpos circulantes (através de plasmaferese);
- b. Inibição de anticorpos residuais (com imunoglobulina intravenosa [IVIg]);
- c. Supressão ou depleção de linfócitos B (com anticorpo monoclonal anti-CD20, Rituximab);
- d. Na presença de rejeição mista com componente celular, supressão da resposta das células T através do anticorpo anti-linfócito como ATG (54,59-62).

### **2.2.2 Rejeição crônica mediada por anticorpos (RMA crônica)**

Nos últimos anos, ficou evidente o papel significativo da presença dos aloanticorpos contra antígenos do CPH na patogênese da lesão que ocasiona a disfunção crônica do enxerto. Vários estudos têm mostrado que, em uma fração substancial de receptores de rim, são detectados anticorpos anti-HLA classe I ou II, seja doador reativo (63,64) ou *de novo*, (64,65), associados com perda tardia do aloenxerto.

A deposição da fração do complemento C4d em capilares peritubulares do enxerto renal está fortemente correlacionada com as lesões de glomerulopatia do transplante e com aloanticorpo circulantes (66-68). Em um estudo retrospectivo a deposição de C4d foi verificada em 34% das biópsias com nefropatia crônica do enxerto (67), enfatizando, assim, a participação do componente humoral entre os mecanismos imunológicos da rejeição crônica.

## **Tabela 2. Critérios diagnósticos para RMA crônica**

1. Evidências histológicas de injúria crônica; é necessário a presença de pelo menos duas das alterações:
  - duplicação ou multilaminação da membrana basal dos capilares glomerulares
  - duplicação ou multilaminação da membrana basal dos capilares peritubulares,
  - fibrose intimal das artérias sem duplicação da camada elástica
  - fibrose intersticial / atrofia tubular
2. Depósito de C4d em capilares peritubulares
3. Evidência sorológica de anticorpos circulantes anti-HLA ou outros antígenos do endotélio.

---

Adaptado de Colvin RB. Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection: Diagnosis and Pathogenesis. J. Am. Soc. Nephrol. 18:1046-1056,2007.

### **Tratamento da RMA crônica**

Em contraste com o tratamento da RMA aguda, a terapia ideal para o RMA crônica ainda está indefinida, visto que a história natural desta patologia é desconhecida e o uso de agentes que interfiram no controle a longo prazo de linfócitos B e plasmócitos ainda não foi adequadamente testado. A RMA crônica tem um prognóstico ruim, sem protocolo de tratamento bem definido (49). Billing e cols. investigaram o uso de IVIG com rituximab em seis pacientes (idades 10-26) que tinham evidência de rejeição crônica mediada por anticorpos (69). Todos os pacientes apresentavam mais que 40% dos CPT marcados para C4d e em todas

as biópsias haviam vários graus de infiltrado de linfócitos B CD20-positivos. Os pacientes receberam quatro doses semanais de IVIG (1g/kg), seguido de uma dose de rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>). A função do enxerto melhorou ou estabilizou em quatro pacientes após um ano de observação. Fehr e cols.(70) relataram recentemente que pacientes com RMA crônica foram tratados com uma combinação de rituximab + IVIG. Todos apresentaram melhora da função do enxerto. Os autores concluíram que essa abordagem terapêutica pode representar uma opção de tratamento para RMA crônica.

Em resumo, os estudos têm demonstrado a eficácia do rituximab para o tratamento de rejeições refratárias, rejeição que contém infiltrados de células B, RMA aguda e RMA crônica. As evidências mostraram que a creatinina e a sobrevida do enxerto melhoram no curto e médio prazo . A combinação de IVIG em altas doses com ou sem rituximab parece ser uma abordagem promissora para reduzir DSA e tratar RMA aguda e RMA crônica (69-73).

## **2.3 Marcadores de rejeição mediada por anticorpos**

### **2.3.1 Fragmento C4d**

A ligação de anticorpos a antígenos usualmente envolve ligações não-covalentes. As interações antígeno-anticorpo são potencialmente reversíveis, suscetíveis à ruptura, pela ação do sistema do complemento. A ativação do complemento inicia uma série de reações enzimáticas em que a clivagem proteolítica e a ativação de proteínas sucessivas da cascata do complemento levam à ligação covalente ou a “fixação” dos fragmentos do complemento à superfície do antígeno. A figura 2 ilustra as vias de ativação do complemento.

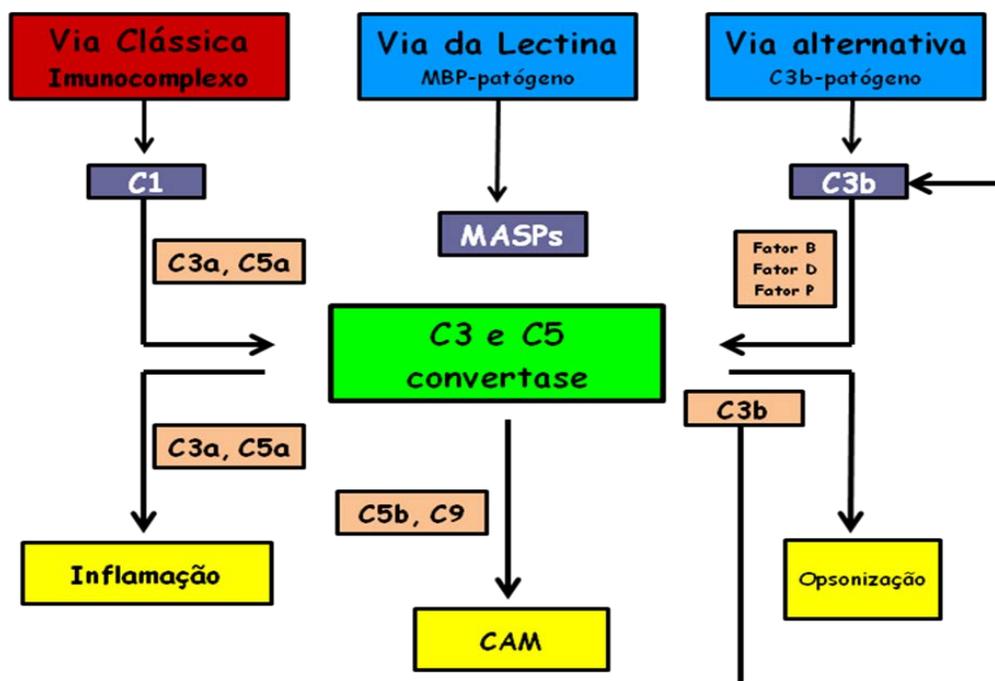


Figura 2. Vias de ativação do sistema do complemento. MAPs=protease sérica associada à proteína ligadora de manose (MBP);CAM=complexo de ataque à membrana.

A fração C1 se liga à região Fc da molécula do anticorpo originando um agregado antígeno-anticorpo que resulta na formação de uma proteinase ativa e do subcomponente C1s, o qual ativa tanto C4 quanto C2 (figura 2) (74,75). O C4 é uma glicoproteína de peso molecular (PM) de aproximadamente 200.000 composto de 3 cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto, uma cadeia  $\alpha$  de PM=93.000, uma cadeia  $\beta$  de PM=75.000 e uma cadeia  $\gamma$  de PM= 33.000 (76). A ligação do C4 à porção C1q resulta na sua ativação e clivagem em um peptídeo de PM=8.000, o C4a, de cadeia  $\alpha$  N-terminal. O restante da cadeia  $\alpha$  forma um grupo reativo que leva a geração do C4b, o qual vai se ligar covalentemente com as moléculas próximas contendo grupos amino ou hidroxil, proteínas ou carboidratos como a região Fc da cadeia pesada de IgG ou a estruturas da

superfície da membrana de eritrócitos (75,77,78). O C4b pode permanecer ligado ou em fase solúvel, podendo ainda ser degradado por proteínas inativadoras de controle específico (C3bINA) e formar os fragmentos C4c PM=150.000 e C4d PM=44.500 (79). O C4d contém sítios tioéster e se mantém covalentemente ligado ao mesmo sítio (75,77).

O C4d, então, é um produto da degradação do componente C4 da via clássica do complemento. Especificamente é a porção alfa-2 da molécula de C4 que se liga covalentemente à superfície das células endoteliais e à membrana basal tubular e glomerular, tornando-se uma molécula estável que permanece por tempo prolongado e constitui um marcador duradouro e específico de ativação local dessa via imunológica (44).

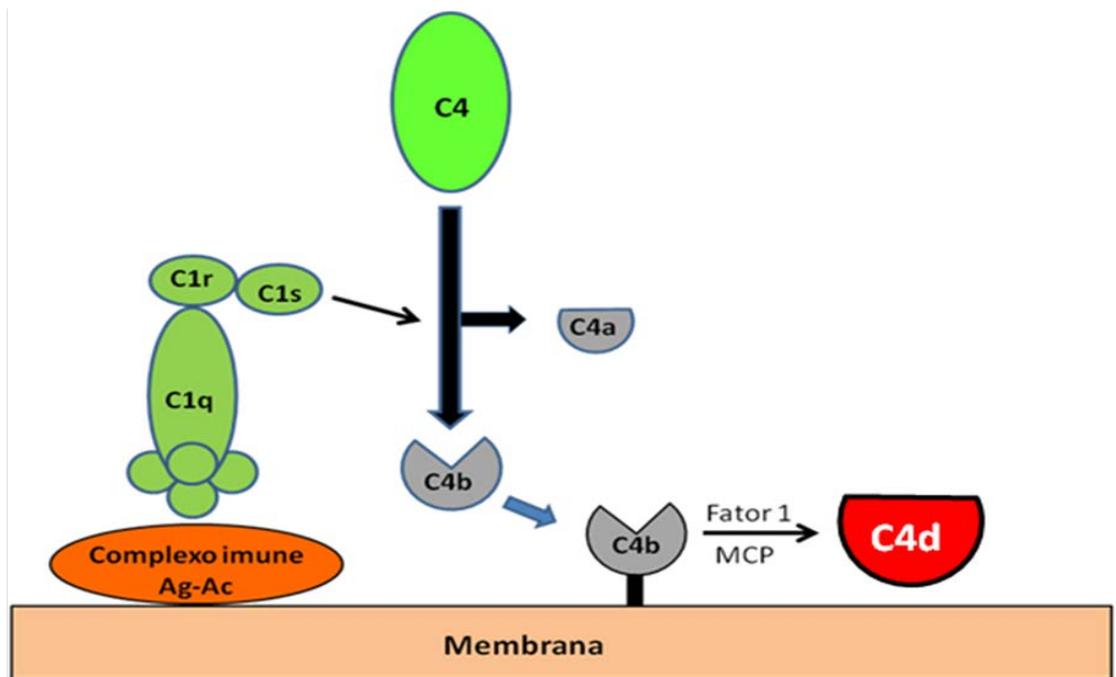


Figura 3. Formação do fragmento C4d, a partir da clivagem do C4b pelo fator 1 e pela proteína co-fator da membrana (MCP)

Assim, o C4d é fixado a uma estrutura protéica e é potencialmente um marcador durável da resposta imune humoral desencadeado pela ativação do sistema complemento através da via clássica. Dessa forma, o depósito de C4d nos capilares peritubulares em enxertos renais é útil como um marcador no diagnóstico de rejeição humoral (18,50). Descreve-se na literatura uma prevalência de marcação positiva para C4d em capilares peritubulares ao redor de 30% em biópsias do enxerto renal com disfunção aguda (16,67,80). A tabela 3 mostra os principais estudos que avaliaram o C4d como marcador de RMA e como fator prognóstico de evolução do enxerto renal.

**Tabela 3. Resumo dos principais estudos sobre a detecção do fragmento C4d em biópsia de enxerto renal.**

Estudo	Comentários
<b>Zwirner et al. 1989 (81)</b>	Primeiro estudo que detectou C4d em tecido renal
<b>Feucht et al. 1991 (18)</b>	Primeiro trabalho a analisar a expressão de C4d em transplante renal Presença de C4d em capilares peritubulares em casos de alto risco imunológico (painel de reatividade alto, retransplante)
<b>Feucht et al. 1993(82)</b>	A presença de depósitos de C4d em capilares peritubulares correlacionou com rejeições agudas graves e perda precoce do enxerto
<b>Collins, et al.,1999 (50)</b> <b>Crespo, et al.,2001(59)</b> <b>Mauyyedi, et al.,2002 (16)</b> <b>Bohmig, et al.,2002 (20)</b>	Estudos que confirmaram que o C4d é um marcador sensível e específico para o diagnóstico de RMA aguda, associado com a presença de anticorpos circulantes específicos anti-doador
<b>Lederer, et al.,2001 (19)</b>	A deposição de C4d em capilares peritubulares é um fator independente de pior sobrevida do enxerto renal

<b><i>Takaeuchi et al., (83)</i></b>	Estudo que identificou a presença de C4d na rejeição crônica do enxerto renal
<b><i>Mauiyyedi et al., 2001 (66)</i></b>	Introdução do conceito de rejeição crônica mediada por anticorpos (RMAC)
<b><i>Regele et al., 2002 (67)</i></b>	O fragmento C4d na RMAC está associado principalmente ao achado morfológico de glomerulopatia crônica do transplante
<b><i>Racusen et al., 2003 (23)</i></b>	Foi proposta a alteração da classificação de Banff de 1997 para incluir a RMA (aguda e crônica)
<b><i>Colvin et al., 2007 (49)</i></b>	Foi introduzido o conceito de “acomodação” (presença do anticorpo anti-doador no soro e do fragmento C4d em capilares peritubulares, na fase pré-clínica alterações histopatológicas de RMA e disfunção do enxerto renal na fase clínica)
<b><i>Smith et al., 2008 (84)</i></b>	Estudo realizado com macacos <i>Cynomolgus</i> que propõe quatro estágios progressivos da rejeição crônica mediada por anticorpos (RMAC): (1) Presença de DAS circulante, (2) depósito de C4d em CPT, (3) glomerulopatia do transplante e (4) aumento da creatinina/falência renal progressiva. Foi demonstrado que RMAC desenvolve-se sem “acomodação” imunológica e progride através de quatro estágios clínicos-patológicos diminuindo a sobrevida do enxerto.
<b><i>Carpio et al., 2011 (80)</i></b>	A pesquisa de C4d em biópsias do enxerto renal é útil para detectar RMA, com correlações clínico patológicas bem definidas.

A divergência nos resultados para C4d entre as técnicas IHC e IF demonstrados nos estudos comparativos de Michel Mihatsch e Nadasdy serviram de base para um ajuste na interpretação da marcação. (85,86)

Conforme atualizações realizadas em Banff 07 (48) a interpretação da marcação para C4d depende da técnica aplicada para sua detecção. O score da coloração para C4d é baseado no percentual de tecido marcado em IF/IHC. O

precipitado deve ser circunferencial e linear, no córtex ou medula dos CPT, excluindo as áreas de fibrose e necrose. A figura 4 mostra o score de coloração para C4d baseado no tecido marcado nas diferentes técnicas.

	% área da biópsia (córtex e/ou medula)	Significado e interpretação de acordo com a técnica	
		IF	IHC
<b>C4d0 Negativo</b>	0%	Neg	Neg
<b>C4d1 Mínimo</b>	1<10%	Neg	Desconhecido
<b>C4d2 Focal</b>	10-50%	Desconhecido	? Positivo
<b>C4d3 Difuso</b>	50%	Positivo	Positivo

Figura 4. Interpretação da coloração para C4d no enxerto renal. Porcentagem dos CPT afetados e a influência do método diagnóstico. Adaptado da referência 48.

Feucht e colaboradores (18) foram os primeiros a demonstrar, em 1991, a marcação para C4d em capilares peritubulares de biópsias do enxerto renal de pacientes com alto risco imunológico e com prova cruzada pré-transplante negativa, associando este achado a uma menor sobrevida do enxerto em 1 ano de transplante. A identificação do C4d nestas biópsias não foi acompanhada de outros depósitos de imunoglobulinas no tecido transplantado.

Na série descrita por Mauiyyedi e cols.(16), estudando receptores de transplante renal, a prevalência de positividade para C4d em capilares peritubulares variou na dependência do diagnóstico histológico, nos primeiros 3 meses pós transplante: rejeição humoral isolada 30%, rejeição celular aguda (RCA) isolada 15%, sendo em RCA grau I 10% e em grau II 5%. Na rejeição aguda a prevalência global foi então de 45%. Em 10% das biópsias com necrose

tubular aguda isolada também houve marcação para C4d. No estudo de Böhmig e cols. (20) foi verificada uma prevalência de 21,2% de marcação positiva para C4d em capilares peritubulares, em biópsias indicadas por disfunção aguda primária ou secundária do enxerto (mediana de 19 dias pós transplante, sendo 19 biópsias feitas após 3 meses do transplante). Neste estudo, os pacientes transplantados com C4d positivo na biópsia do enxerto tiveram uma pior evolução tardia, com uma sobrevida do enxerto significativamente pior em 4 anos do que aqueles com C4d negativo.

A rejeição mediada por anticorpos na classificação atual de Banff foi estabelecida com base nos resultados de diversos estudos desenvolvidos a partir do início da década de 90, que identificaram o C4d como marcador de elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de rejeição humoral. Entretanto, o significado do C4d nas demais categorias de Banff, ainda é incerto. Carpio e colaboradores em 2011 (80) descreveram a prevalência de C4d em biópsias de enxerto renal por indicação, onde a marcação positiva foi detectada em 31% das biópsias, das quais 15% tinham marcação difusa e 16% focal. A distribuição de depósito de C4d nos CPT das biópsias de acordo com a histopatologia foi 21%, 29% e 4% para os grupos SR, RAC, FI/AT respectivamente. O C4d foi detectado em todas as biópsias de RMA, mas considerando todos os casos de C4d+ independente da histologia, a pericapilarite ocorreu em 32 % versus 0,9% dos casos C4d- compatível com os critérios diagnóstico de RMA.

Outro aspecto a considerar sobre a deposição do fragmento C4d é a acurácia e a reprodutibilidade das técnicas atuais, que possa afetar a sua prevalência, o diagnóstico clínico e suas conseqüentes decisões terapêuticas. Nos

EUA e países europeus a prevalência de C4d em biópsias de enxerto renal, utilizando imunofluorescência ou imunohistoquímica varia de 17% a 60% (16,44,46,47,66,87,88,). Há poucos relatos da prevalência C4d em outros países. Recentemente, Ranjan et al (75) descreveram uma prevalência global de 45% em pacientes indianos, e Cheunsuchon et al (47) encontrou uma prevalência de 16,4% em receptores tailandeses. Em ambos os estudos a técnica de detecção do C4d foi imuno-histoquímica em parafina.

No Brasil, Ludovico-Martins et al (89) mostrou uma prevalência de 45% de C4d por imunofluorescência (IF), considerada técnica padrão ouro pela maior acurácia em relação a imuno-histoquímica. Neste estudo foram comparadas a imunofluorescência em criosato com imuno-histoquímica em criosato e imuno-histoquímica em parafina, observando-se uma boa concordância entre IF e IHC em criosato. Entretanto, a acurácia da IHC em parafina para o diagnóstico de RMA foi inferior aos demais métodos.

### **2.3.2 Anticorpo específico contra o doador (DAS - *donor specific antibody*)**

A avaliação da presença de aloanticorpos circulantes não é realizada rotineiramente no período pós-transplante. O método de microcitotoxicidade convencional mostra uma baixa sensibilidade para detectar anticorpos contra antígenos do CPH de classe II, que são também expressos nas células do endotélio capilar e por isto capazes de desencadear a reação de antígeno-anticorpo (18,19).

A introdução de técnicas que melhor identificam anticorpos circulantes reacendeu o interesse em avaliar a produção de anticorpos após o transplante e

seu impacto sobre a ocorrência de rejeição e sobrevida do enxerto. Tanto estudos *in vivo* como *in vitro* expandiram o atual entendimento das lesões mediadas por anticorpos, e atualmente é aceito a contribuição dos anticorpos para rejeições agudas e crônicas (90,91).

As tecnologias como a citometria de fluxo e a técnica de Luminex (92), chamaram a atenção para o fato de que cerca de 18% dos transplantados renais desenvolvem no pós-transplante anticorpos contra antígenos leucocitários humanos (anti-HLA), em boa parte especificamente contra os antígenos HLA do doador, como descrito por Terasaki (93,94). A correlação entre RA de mau prognóstico e o desenvolvimento de anticorpos específicos contra o doador também foram sugeridos por Halloran e colaboradores (14), que consideraram como mecanismos patogénéticos mais importantes da rejeição mediada por anticorpos a ativação do sistema do complemento e a ativação e invasão de neutrófilos no rim transplantado (93).

Recentemente o sistema Luminex de rastreamento (*screening*) foi introduzido e padronizado no Laboratório de Imunologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Brian e cols. (95) demonstraram a maior sensibilidade desse sistema de detecção em relação aos ensaios de citotoxicidade e suas variações, os quais ainda são universalmente utilizados pelo menor custo e pela presente indisponibilidade do equipamento Luminex na grande maioria dos laboratórios de Imunologia de Transplantes no Brasil. A tecnologia Luminex consiste em uma série de micro-esferas de poliestireno (*beads*) contendo fluorocromo de diferentes intensidades, revestidas com antígenos HLA de Classe I ou Classe II e reagentes previamente otimizados para a detecção de anticorpos HLA de Classe I ou Classe

II no soro humano (95). Em um estudo do nosso grupo (96), a avaliação de anticorpos anti-HLA de classe I e classe II mostrou uma associação entre presença de anticorpos e rejeição aguda e crônica no primeiro ano do transplante. Nove (45%) pacientes com anticorpos no pós-transplante desenvolveram RA contra 14 (20,6%) daqueles sem anticorpos. Entre os pacientes com anticorpos no pós-transplante, 11 (64,7%) desenvolveram rejeição crônica contra 32 (47,8%) dos sem anticorpos.

Worthington e cols (63) avaliaram 112 receptores de transplante renal, que evoluíram para perda do enxerto e foram reinscritos para novo transplante. Esses pacientes foram comparados com 123 pacientes transplantados, na mesma ocasião, mas que permaneceram com o enxerto funcionando durante um período de 5 anos. Dentre os pacientes que cursaram para perda do enxerto os autores puderam detectar anticorpos anti-HLA em 51% deles, enquanto que esses anticorpos foram detectados em apenas 1,6% dos pacientes do grupo controle. Anticorpos anti-HLA doador específicos foram detectados em 60% dos pacientes com anticorpos e precederam a falência do enxerto, sugerindo que a produção de anticorpos pós- transplante é fator preditor para a falência do enxerto.

Crespo e cols (59) estudaram 81 pacientes que apresentaram rejeição aguda nos 3 primeiros meses após transplante e demonstraram que nenhum dos pacientes com rejeição córtico-sensível apresentou anticorpos anti-HLA doador específico, enquanto que esses anticorpos foram detectados em 37% dos pacientes com rejeição córtico-resistente.

Em um estudo prospectivo que avaliou 49 pacientes com risco imunológico elevado, os autores detectaram que 38,8% dos pacientes apresentaram

anticorpos anti-HLA não doador específico e que 22,4% deles apresentaram anticorpos anti-HLA doador específicos, sendo que estes últimos cursaram com rejeição mediada por anticorpos (8).

A prevalência de anticorpos anti-HLA em 2.278 pacientes transplantados renais foi de 20,9%, conforme demonstrado por Terasaki (94) em um estudo multicêntrico. Pacientes que desenvolveram anticorpos pós-transplante tiveram 8,3% de falência do enxerto em 1 ano, contra 3,3% de falência naqueles sem anticorpos. Os autores sugerem que a presença de anticorpos circulantes precede o episódio de rejeição não só em transplante renal, mas também em transplantes de coração, fígado e pulmão, e que esses anticorpos podem estar envolvidos na rejeição crônica.

Considerando que os anticorpos anti-HLA podem ser detectados antes da rejeição ou da falência do enxerto, sugere-se que sua monitorização prospectiva possa ser um marcador precoce e não invasivo, que auxilia no diagnóstico e na terapêutica precoce da rejeição. (7,63,97,-99)

## **2.3.3 Linfócitos B e Plasmócitos**

### **2.3.3.1 Linfopoese do linfócito B**

Os linfócitos B passam por três processos básicos de desenvolvimento: maturação, ativação e diferenciação.

O processo de maturação ocorre na medula óssea e é independente da presença de antígenos. Os demais ocorrem nos órgãos linfóides secundários (periféricos) e são dependentes da presença de antígenos (100,101).

A maturação dos linfócitos B (Figura 5) inicia-se na medula óssea, onde a célula tronco hematopoética diferencia-se em célula pró-B (célula precursora de linfócito B), que por sua vez se diferencia em célula pré-B, depois em célula B imatura e, finalmente, em célula B madura. Após a maturação, as células B migram da medula para a circulação e então se localizam nos órgãos linfóides secundários, permanecendo nos centros germinativos. Quando estimuladas, dão origem a dois processos subseqüentes, a ativação e a diferenciação linfocitária (85,86). A maioria dos linfócitos B maduros expressa dois isotipos de imunoglobulinas em sua superfície, IgM e IgD. Essas imunoglobulinas estão ligadas de forma não covalente (por pontes dissulfeto) à  $Ig\alpha$  e à  $Ig\beta$ , formando o “complexo receptor de antígeno em célula B” (RCB) (10,100).

A ativação dos linfócitos B inicia-se com a interação do antígeno e do RCB. Essa interação gera uma cascata de eventos na membrana celular que, por meio da ativação de inositol trifosfato ( $Ca^{++}$  dependente) e diacilglicerol( via proteína quinase-C), resultará na proliferação e na diferenciação dos linfócitos B (100).

Os linfócitos B ativos expressam um maior número de moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade , de moléculas coestimulatórias (B7) de receptores de membrana para citocinas derivadas dos linfócitos T auxiliares. Essas alterações permitem que linfócitos B ativados interajam e respondam aos mediadores secretados pelos linfócitos T auxiliares. Essa interação é fundamental para que ocorra a formação de linfócito B de memória (10).

Uma vez ativados, os linfócitos B sofrem um processo de diferenciação que dará origem às células produtoras de anticorpos e às células B de memória.

Vale ressaltar que, dependendo do tipo de antígeno, ocorre uma resposta mais elaborada ou não do linfócito B. Quando o antígeno em questão é não-protéico (lipopolissacarídeos-LPS, glicolipídios e ácidos nucleicos), ocorre uma ativação direta do linfócito B, com proliferação policlonal de plasmócitos, sem, no entanto, formação de memória imunológica. Em contrário, se o antígeno é protéico, ocorre uma resposta mais elaborada, com a interação entre linfócitos B e T. Essa interação resulta na produção de anticorpos e também na formação de linfócitos B de memória. Portanto, a diferenciação dos linfócitos B em células de memória é um processo T- dependente (10).

Os linfócitos B, além da produção de anticorpos, também atuam como células apresentadoras de antígenos e tem capacidade de memória. Os linfócitos B produzem anticorpos de cinco classes principais: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. Cada plasmócito em estágio final de diferenciação produz anticorpo de uma única classe ou subclasse.

Nos últimos anos, tem sido atribuído o papel de células apresentadoras de antígenos aos linfócitos B. É possível que estes linfócitos permaneçam como células que forneçam uma fonte de ativação permanente aos linfócitos T, conferindo maior resistência aos corticosteróides (101,102).

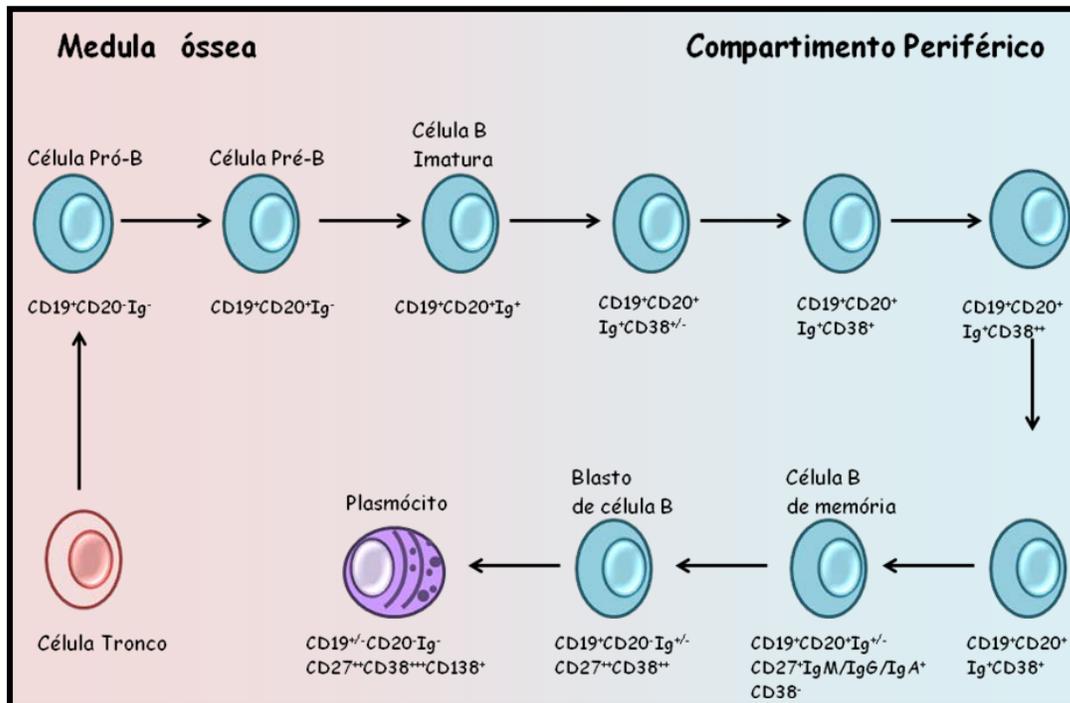


Figura 5. Linfopoiese de célula B. Adaptado de Nature Reviews Immunology, 2006

### 2.3.3.2 Linfócitos B e Plasmócitos na rejeição do transplante renal

Existem crescentes evidências de que as células B em seus mais variados estágios de maturação podem infiltrar órgãos sólidos transplantados levando a rejeição aguda. A presença de células imaturas CD20<sup>+</sup> e de células plasmáticas maduras CD138<sup>+</sup> estão associadas com rejeição mais agressiva e resistência à terapia com corticosteróides, e também a piores sobrevidas do enxerto renal (32). Apesar destes relatos, ainda não está claro o mecanismo de ação das células B no enxerto. Classicamente as células B atuam na apresentação de antígenos e na produção de autoanticorpos através da diferenciação em plasmócitos, ou por outro mecanismo que não identificado. Por outro lado, a presença de células CD20<sup>+</sup> ou CD138<sup>+</sup> pode constituir um fenômeno inespecífico e sua presença no interstício

renal em marcador de agressão imunológica grave e inflamação (24), ou ser um fenômeno inespecífico da cascata imune.

A associação destas células com a deposição de C4d e com a RMA ainda não está clara.

Os linfócitos B e os plasmócitos são conhecidos por desempenhar um papel crucial na produção de anticorpos e na manutenção de respostas aos aloanticorpos (26,33). Subconjuntos predominantes de células B podem ser identificados no momento da rejeição aguda. Um deles é o linfócito B CD20+, que se expressa especificamente durante os estágios iniciais de desenvolvimento das células B. Outros subconjuntos como CD38+ e CD138+ se expressam na fase final da linhagem de células B, tais como blastos e plasmócitos. A recente identificação fenotípica das células B revelou que as células CD20+ aparecem em formações de cluster, ou nódulos, e o CD38+ e CD138+ se expressam em infiltrados difusos no interstício renal (32,103). Na Tabela 4 são apresentados estudos clínicos que identificaram infiltrados de células plasmáticas e correlacionaram com a sobrevida e função do enxerto renal.

**Tabela 4. Estudos clínicos de células plasmáticas no transplante renal**

Estudo	Critério para positividade de linfócito B	Comentários
<i>Xu et al. 2008 (33)</i>	Marcação forte e difusa para CD138	Houve correlação entre C4d+ e CD138+ sugerindo que o infiltrado de células plasmáticas provavelmente participa da rejeição mediada por anticorpos através da secreção local de anticorpos
<i>Hwang et al. 2010 (103)</i>	CD20+ se > 275 positivas céls/ campo de grande aumento CD38+ se >30% de céls positivas no infiltrado	A combinação de infiltrado de células plasmáticas, com células B CD20+ preve pior desfechos clínicos de rejeição aguda celular

<b>Tsai et al. 2010 (24)</b>	CD138+ se $\geq 6$ céls/campo de grande aumento	A combinação de CD138+ com células CD20+ foi associada com uma pior função e sobrevida do enxerto
------------------------------	---	---

Historicamente, o foco principal da pesquisa das células B em transplantes foi em células plasmáticas na fase final da diferenciação e sua contribuição na rejeição mediada por anticorpos, com produção de anticorpos específicos do doador (DSA) (28). Estudos recentes mostram que a rejeição a órgãos sólidos pode ser “pura mediada por anticorpos, “pura” com eventos mediados por células ou, ainda, apresentar uma forma mista com diferentes graus de lesões aloimunes humoral e celular (29), como ilustrado na figura 6.

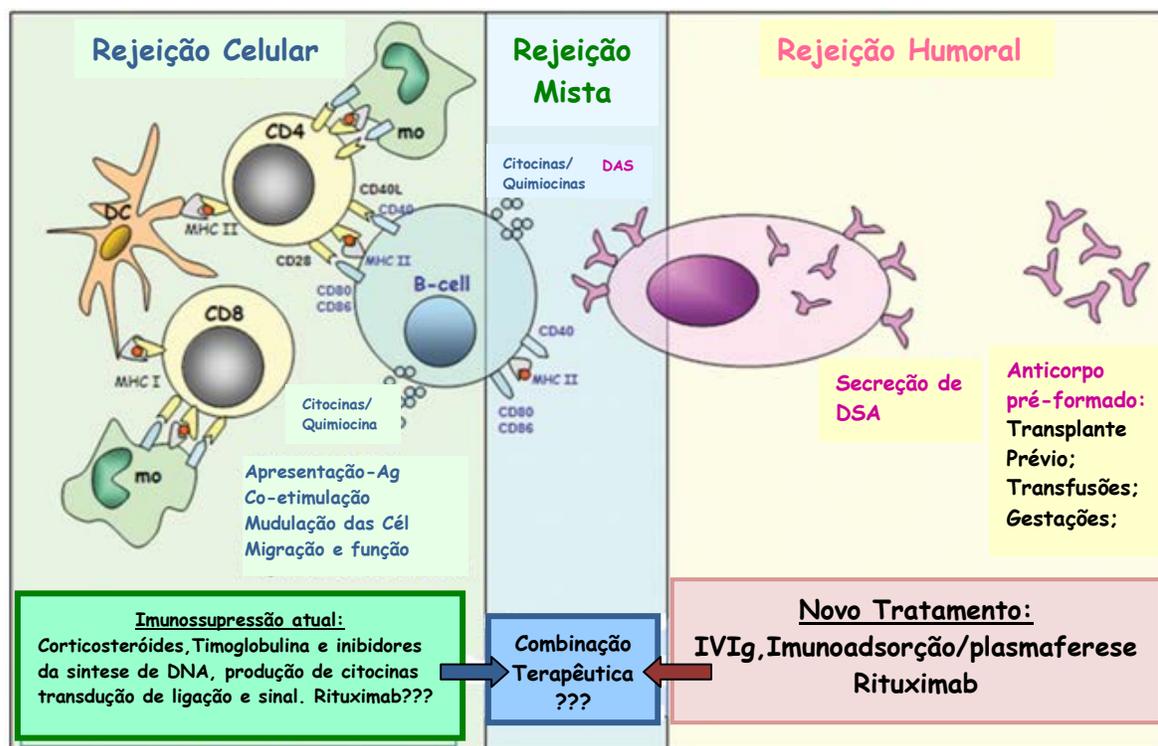


Figura 6. Possíveis sinais do tráfico das células B no enxerto renal durante a rejeição aguda. Adaptado de Zarkhin V, Li L, Sarwal M. To B or not to B? B-cells and graft rejection. Transplantation 2008;85:1705-1714.

A detecção de linfócitos B na rejeição do transplante renal foi descrita em estudos recentes, resumidos na tabela 5, os quais utilizaram o marcador imunohistoquímico anti-CD20 para fenotipar os linfócitos B maduros. Este marcador expressa-se na superfície celular de linfócitos B, não mais expressando-se quando estas células diferenciam-se em plasmócitos, em que os marcadores utilizados são os anti-CD138 e o anti-CD38 monoclonais (33). Na tabela 6 são apresentados alguns estudos pertinentes envolvendo células B e rejeição aguda do enxerto.

Sarwal e col. (25) demonstraram a presença de agregados de linfócitos B no interstício de biópsias de enxertos renais de pacientes pediátricos com rejeição celular aguda. Os pacientes que apresentavam estes agregados de linfócitos B mostraram maior resistência aos corticosteróides e menor sobrevida do enxerto. Adicionalmente, foram encontradas evidências de diferenciação de linfócitos B por meio de análise de microarranjos de DNA.

Hippen e cols. (27) estudaram pacientes com rejeição aguda mediada por linfócitos T Banff tipo IA e IB, comparando biópsias com ou sem marcação de anti-CD20 em um seguimento de quatro anos. Pacientes com infiltrados de linfócitos B apresentaram menor resposta ao tratamento com corticosteróides e menor sobrevida do enxerto em comparação com o grupo sem infiltrado. Apesar da contínua otimização nas últimas décadas do tratamento imunossupressor, o processo de rejeição aguda e crônica continua sendo determinante da sobrevida do enxerto em longo prazo. O infiltrado celular rico em células plasmáticas caracteriza-se por mais de 10% de plasmócitos do infiltrado inflamatório intra-

enxerto o qual tem sido observado em aproximadamente 5% dos pacientes com rejeição aguda comprovada por biópsia (33).

Becker e cols. (104) descrevem uma série de 27 casos de rejeição aguda mediada por anticorpos refratários ao tratamento inicial que foram submetidos a uma nova sessão terapêutica, convencional para esta situação, porém com o acréscimo de rituximab. Nestes casos os níveis médios de creatinina e o débito urinário atingiram consideráveis 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.

**Tabela 5. Resumo dos estudos que avaliaram o papel do infiltrado de células B no enxerto renal**

Estudo	Critério para positividade de linfócito B	Comentários
<b>Sarwal et al. 2003 (25)</b>	CD20+ se > 275 positivas céls/campo de grande aumento	A densidade de células CD20+ durante a rejeição aguda correlacionada com a resistência de glicocorticóides e perda do enxerto
<b>Hippen et al. 2005 (27)</b>	Céls B positivas se marcação forte e difusa para CD20	Infiltrado rico em células B durante a rejeição aguda correlacionado com o aumento de risco de rejeição esteróide-resistente e sobrevida do enxerto reduzida
<b>Kayler et al. 2007 (105)</b>	Clusters de linfócitos se $\geq 15$ céls CD20+ se > 50% de céls positivas	Presença de clusters CD20 <sup>+</sup> linfóides não pressagiam os resultados de resistência a glicocorticóides ou pior a curto e médio prazo
<b>Bagnasco et al. 2007 (106)</b>	CD20+ se > 275 positivas céls/campo de grande aumento	Não houve correlação entre o infiltrado rico de células B durante a rejeição aguda com o pior resultado

<b>Scheepstra et al 2008 (107)</b>	CD20+ se > 275 positivas céls/campo de grande aumento Agregados se > 30 céls	Não houve correlação entre o número de células CD20 <sup>+</sup> , em agregados ou em padrão disperso intersticial e resposta à terapia convencional
<b>Martins et al. 2010 (108)</b>	Contagem de céls plasmáticas Marcação C4d Eluição de anticorpos	A disfunção crônica do enxerto foi caracterizada por depósitos de C4d, infiltração de células plasmáticas e anticorpos anti-HLA em amostras de soro e / ou eluatos Correlação positiva entre estes parâmetros
<b>Hwang et al. 2010 (103)</b>	CD20+ se > 275 positivas céls/campo de grande aumento CD38+ se >30% de céls positivas no infiltrado	A combinação de infiltrado de células plasmáticas, com células B CD20 <sup>+</sup> preve pior desfechos clínicos de rejeição aguda celular

**Tabela 6. Estudos publicados que avaliaram a associação entre linfócitos B, rejeição aguda e os desfechos do enxerto renal**

Estudo	Número de pacientes(intervalo de idade, em anos)	Tipo de rejeição	% de céls CD20+ na rejeição aguda	Tempo de seguimento (T/S) em meses e % dos txp com perda do enxerto ou recuperação incompleta da função
<b>Grupo1. Células B CD20+ fortemente associadas a rejeição grave e resistente a esteróides</b>				
<b>Sarwal et al. 2003 (25)</b>	67 (1.4-22)	RAC : Banff IA, B ou IIA Tempo pós-tx: 1mês-10 anos	45%	T/S= 10-16 meses 89% das biópsias CD20 <sup>+</sup> 9% das biópsias CD20 <sup>-</sup>
<b>Hippen et al. 2005 (27)</b>	27 (26-67)	RAC:Banff IA,B Tempo pós-tx: 49-153 dias em CD20+ e 70-343 em CD20-	22%	T/S= 48 meses 67% das biópsias CD20 <sup>+</sup> 14% das biópsias CD20 <sup>-</sup>
<b>Tsai et al 2006 (26)</b>	31 (3-21)	RAC( I ou II) e RHA Tempo pós-tx:~ 2 anos	100% das RCA tinham clusters de CD20 <sup>+</sup> 17% dos controles tinham clusters de CD20 <sup>+</sup>	T/S= 16 meses >2 céls/hpf CD20 <sup>+</sup> tinham 4.5 vezes maior risco de perda do que 0-1 cell/hpf, (p=0,02) As céls CD20 <sup>+</sup> foram associadas com RAC mas não com RHA

<b>Martin et al. 2010 (108)</b>	34 (19-69)	RAC: Banff IA e IIA Tempo pós-tx: RA 25 ± 8 dias CAN 920 ± 177 dias	100% das RCA (137±57.2 céls/mm <sup>2</sup> ) e 100% das CAN(45.4±9.8 céls/mm <sup>2</sup> ) tiveram CD20 <sup>+</sup> : 36% das RCA e 20% das CAN tiveram padrão nodular e outros tiveram céls CD20 <sup>+</sup> dispersas;0% dos controles tiveram CD20 <sup>+</sup>	T/S= no momento da rejeição Apenas o padrão nodular de céls CD20+ em RA tendeu a associar-se com o aumento da creatinina sérica
---------------------------------	------------	---	--	--

**Grupo2. Células B CD20+ não preditoras de um resultado desfavorável ou resistência a esteróides**

<b>Doria et al. 2006 (109)</b>	14 (N/A)	RAC: Banff IA	50%	T/S= 12 meses Não houve diferença no resultado do enxerto entre CD20 <sup>+</sup> e CD20 <sup>-</sup>
<b>Kayler et al. 2007 (105)</b>	120 (46.5-15)	RAC: Banff IA ou IB	59%	T/S= 12 meses CD20 <sup>+</sup> : 4% das biópsias CD20 <sup>-</sup> : 6% das biópsias T/S= 24 meses CD20 <sup>+</sup> : 19% das biópsias CD20 <sup>-</sup> : 13% das biópsias
<b>Bagnasco et al. 2007 (106)</b>	56 (46±15)	RAC: Banff IA ou IIB Tempo pós-tx: 2.6±3.2 meses	44%	T/S= 36 meses CD20<50/hpf:32% CD20>100/hpf:33% CD20>200/hpf:29%
<b>Mengel et al. 2007(110)</b>	126 (48.7±14.3)	RA Borderline: 13 % biópsias protocolares e 10.8% por indicação Subclinica Banff I:5.4% de biópsias de protocolo Tempo pós-tx: 6-26 semanas	87% dos aloenxertos renais estáveis tinham infiltrados celulares	T/S=24 meses

Adaptado de Zarkhin V, Li L, Sarwal M. To or not to B? B-cells and graft rejection. Transplantation 2008;85:1705-1714.

### **Capítulo 3. Justificativa**

A resposta imune contra o órgão transplantado pode ser mediada por células T ou por meio da resposta humoral, desencadeada por anticorpos específicos contra o doador, além de outros mecanismos ainda não totalmente elucidados. No que se refere a RA, há importantes diferenças fisiopatológicas entre a rejeição aguda celular (RAC) e a rejeição humoral, atualmente chamada de rejeição medida por anticorpos (RMA).

O diagnóstico da RMA, diferente da RAC, não depende apenas da microscopia óptica. Existe a necessidade de outros métodos diagnósticos mais acurados, como a pesquisa de ativação do complemento C4d no tecido renal, bem como a pesquisa dos DSA circulantes. Com o surgimento de novas tecnologias como citometria de fluxo e a técnica do Luminex, hoje é possível detectar anticorpos anti-HLA específicos contra o doador antes da rejeição ou da falência do enxerto. Assim, a sua monitorização pode auxiliar no diagnóstico e na terapêutica precoce da RMA.

O C4d é um marcador da ativação da via clássica do complemento e o seu depósito em capilares peritubulares de enxertos renais tem sido descrito como um achado específico de RMA. Existe uma correlação muito estreita entre o C4d no tecido e a detecção de DSA circulantes. As células B, por outro lado, são atualmente reconhecidas como participantes no processo de rejeição do enxerto, A manutenção dos índices de sobrevida do enxerto renal, principalmente tardia, sugere o envolvimento de outros mecanismos na rejeição mediada por linfócitos T e por anticorpos refratários aos protocolos de tratamento, demonstrando a necessidade de se aprofundar a investigação da fisiopatogênese da rejeição. Muitos estudos demonstram que episódios de rejeição em órgãos sólidos podem

ser mediados por processos imunológicos do tipo “pura, mediada por anticorpos”, “pura, mediada por células T” ou apresentar um componente misto, isto é, graus variados de lesão aloimune celular e humoral.

Estudos recentes têm demonstrado que, a despeito do tratamento com plasmaferese e imunoglobulina e, mais recentemente, com o uso do anticorpo anti-CD20 Rituximab, a RMA ainda aumenta substancialmente o risco de perda do enxerto renal. Assim, esforços têm sido concentrados na identificação dos pacientes sob alto risco de desenvolvê-la.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar marcadores imunológicos de risco para rejeição do enxerto renal, a fração do complemento C4d, os DSA circulantes, e o infiltrado de células B CD20+ e CD138+, e sua associação com o diagnóstico histopatológico, a função e a sobrevida do aloenxerto em receptores de transplante renal.

## **Capítulo 4. Objetivos**

## **4.1 Objetivo Geral**

Avaliar marcadores imunológicos de risco para rejeição do enxerto renal, C4d, DSA circulantes, células B CD20+ e CD138+, e sua associação com o diagnóstico histopatológico, a função e a sobrevida do aloenxerto em receptores de transplante renal.

## **4.2 Objetivos Específicos**

1. Determinar a prevalência e o valor prognóstico da fração do complemento C4d em transplantados renais com a disfunção do aloenxerto.

2. Determinar a prevalência e o valor prognóstico de anticorpos anti-HLA doador específico (DSA) no pós- transplante.

3. Avaliar a expressão e valor prognóstico de linfócitos B e de plasmócitos no infiltrado celular de biópsias do enxerto por indicação em transplantados renais.

4. Correlacionar a presença do fragmento C4d, de DSA e da expressão de linfócitos B e de plasmócitos em biópsias de enxerto renal com a histopatologia, a função e a sobrevida do aloenxerto ao final do terceiro ano de transplante.

5. Avaliar a correlação entre os marcadores de rejeição C4d, DSA, linfócitos B e plasmócitos.

## **Capítulo 5. Referências Bibliográficas**

1. Ferreira U, Lima M, Scafi C, Fucs M, Murad M. Transplante renal: aspectos atuais. Rev Bras Med 1993; 50: 1499-507.
2. Bastos MG, Medeiros R, Manfro, RC. Transplante renal. Rev Ass Med Bras 1994; 40: 283-92.
3. Jordan SC, Quartel AW, Czer LS et al. Posttransplant therapy using high-dose human immunoglobulin (intravenous gammaglobulin) to control acute humoral rejection in renal and cardiac allograft recipients and potential mechanism of action. Transplantation 1998; 66: 800-5.
4. Humar A, Denny R, Matas AJ, Najarian JS. Graft and quality of life outcomes in older recipients of a kidney transplant. Exp Clin Transplant 2003; 1: 69-72.
5. Kaplan B, Meier-Kriesche Hu. Renal transplantation: a half century of success and the long road ahead. J.Am.Soc.Nephrol 2004; 15: 3270-1.
6. Cortesini R. Transplantation in the new millenium. Transplant Proc 2001; 33: 47-8.
7. Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Servetti S, Monaco PI, Buonomo O, et al. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. Transplantation. 2001; 71(8):1106-12.
8. Zhang Q, Liang LW, Gjertson DW, Lassman C, Wilkinson AH, Kendrick E, et al. Development of posttransplant antidonor HLA

antibodies is associated with acute humoral rejection and early graft dysfunction. *Transplantation*. 2005; 79(5): 591-8.

9. Acton RT. The Major Histocompatibility Complex. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroeder HW, editors. *Clinical Immunology Principles and Practice*. 2 ed. London: Mosby; 2001. p.1-13.

10. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular*. 5ª. ed, Rio de Janeiro, 2005.

11. Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11: 609-18.

12. Meier-Kriesche H U, 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; 4: 378-83.

13. Halloran PF, Wadgymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response. *Transplantation* 1990; 49: 85-91.

14. Halloran PF et al. The significance of the anti-class I antibody response. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I like antibody. *Transplant Int* 1992; 53: 550-3.

15. Campos, EF et al. Post-transplant anti-HLA classII antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *Am J Transplant* 2006; 6: 2316-20.

16. Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB, et al. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:779-87.
17. David-Neto, et al. C4d-positive chronic rejection: a frequent entity with a poor outcome. *Transplantation* 2007; 84: 1391-8.
18. Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, Held E, Riethmuller G, Land W, Albert E.: Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol* 1991; 86(3): 464-70.
19. Lederer SR, Kluth-Pepper B, Schneeberger H, Albert E, Land W, Feucht HE.: Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long-term survival of renal allografts. *Kidney Int* 2001; 59: 334-341.
20. Bohmig GA, Exner M, Habicht A, et al. Capillary C4d Deposition in Kidney Allografts: A Specific Marker of Alloantibody-Dependent Graft Injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1091-1099.
21. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, 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; 44(2):411-21.
22. Santoro D, Bellinghieri G, Mallamace A, Savica V. Evolution of the classification of acute and chronic transplant rejection. *G Ital Nefrol* 2005; 22 (Suppl 33):S65-70

23. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant*. 2003; 3: 708-14.
24. Tsai EW, Wallance WD, Gjertson DW, Reed EF, Ettenger RB. Significance of intragraft CD138+ lymphocytes and p-S6RP in pediatric kidney transplant biopsies. *Transplantation* 2010; 90: 875-881.
25. Sarwal M, Chua MS, Kambham N et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 2003; 349: 125-38.
26. Tsai EW, Rianthavorn P, Gjertson DW, Wallace WD, Reed EF, Ettenger RB. CD20+ lymphocytes in renal allografts are associated with poor graft survival in pediatric patients. *Transplantation* 2006; 82: 1769-73.
27. Hippen BE, DeMattos A, Cook WJ, Kew CE, Gaston RS. Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute rejection of renal allografts. *Am J Transplant* 2005; 5: 2248-52.
28. Terasaki PI, Cai J. Humoral theory of transplantation: Further evidence. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 541-5.
29. Nicleleit V, Andreoni K. The classification and treatment of antibody-mediated renal allograft injury: Where do we stand? *Kidney Int* 2007; 71: 7-11.

30. Noorchashm H, Reed AJ, Rostami SY, et al. B cell-mediated antigen presentation is required for the pathogenesis of acute cardiac allograft rejection. *J Immunol* 2006; 177: 7715-22.
31. Krukemeyer MG, Moeler J, Morawietz L, et al. Description of B lymphocytes and plasma cells, complement and chemokines/receptors in acute liver allograft rejection. *Transplantation* 2004; 78: 65-70.
32. Zarkhin V, Li L, Sarwal M. To B or not to B? B-cells and graft rejection. *Transplantation* 2008; 85:1705-1714.
33. Xu X, Shi B, Cai M, et al. A retrospective study of plasma cell infiltrates in explanted renal allograft. *Transp Proc* 2008; 40:1366-1370.
34. Manfro R, Gonçalves, LFS. Transplante renal: imunologia e farmacologia das drogas imunossupressoras. In: Barros E, Manfro, RC, Thomé FS, Gonçalves, LFS e col., editor. *Nefrologia: Rotinas e diagnóstico*. 3<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artemed; 2006.
35. Coelho V, Caldas C, Kalil J. Imunobiologia do transplante renal. In: Manfro RC, Noronha I, Pacheco e Silva A, editors. *Manual de Transplante renal*. 1 ed. São Paulo: Manole; 2004.
36. Hernandez-Fuentes MP, Warrens AN, Lechler RI. Immunologic monitoring. *Immunol Rev*. 2003; 196: 247-64.
37. Manfro RC, Gonçalves LF, Saitovich D. Imunologia e farmacologia das drogas imunossupressoras. In: Barros E, Manfro RC,

Thomé FS, Gonçalves LF, eds. Nefrologia. Rotinas, Diagnóstico e Tratamento. 3<sup>nd</sup> ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 2006. p. 463-74.

38. Meyer D, Thorwarth M, Otto C, Gassel HJ, Timmermann W, Ulrichs K, Thiede A. Apoptosis of alloreactive T cells in liver allografts during tolerance induction. *Transplant Proc* 1999; 31(1-2): 474.

39. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 1998; 280: 243-8.

40. Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Domenig C and Strom TB. The balance of deletion and regulation in allograft tolerance. *Immunol Rev* 2003; 196: 75-84.

41. Furness, P. N. Acp. Best practice no 160. Renal biopsy specimens. *J Clin Pathol* 2000; 53: 433-8.

42. Mattinzoli, D., Giardino, L. A., Corbelli, A., Armelloni, S., Li, M., Berra, S. e Rastaldi, M. P. The renal biopsy in the post-genomic era. *G Ital Nefrol* 2007; 24: 415-24.

43. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, et al. Banff'05 Meeting Report: Differential Diagnosis of Chronic Allograft Injury and Elimination of Chronic Allograft Nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant.* 2007; 7: 518-526.

44. Nickleit V, Zeiler M, Gudat F, Thiel G, Mihatsch MJ. Detection of the Complement Degradation Product C4d in Renal Allografts: Diagnostic and Therapeutic Implications. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:242-251.

45. Feucht HE. Complement C4d in graft capillaries – the missing link in the recognition of humoral alloreactivity. *Am J Transplant* 2003; 3: 646-52.

46. Mengel M, Borges J, Bosmans JL, et al. Incidence of C4d stain in protocol biopsies from renal allograft: results from a multicenter trial. *Am. J. Transplant* 2005; 5: 1050-56.

47. Cheunschon B, Vongwiwatana A, Premasathian N, Shayakul C, Parichatikanond P. The prevalence of C4d-positive renal allografts in 134 consecutive biopsies in Thai patients. *Transplant Proc* 2009; 41:3697-98.

48. 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; 8(4): 753-60.

49. Colvin RB. Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection: Diagnosis and Pathogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol* 2007; 18:1046-1056.

50. Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: Diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2208-14.

51. Takemoto SK, Zeevi A, Feng S, et al. National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 1033-41.

52. Slatinska J, Honsova E, Burgelova M, Slavcev A, Viklicki O. Plasmapheresis and intravenous immunoglobulin in early antibody-

mediated rejection of the renal allograft: a single-center experience. *Ther Apher Dial* 2009; 13: 108-12.

53. Watschinger B, Pascual M. Capillary C4d deposition as a marker of humoral immunity in renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2420-3.

54. Truong LD, Barrios R, Adrogue HE, Gaber LW. Acute antibody-mediated rejection of renal transplant. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1200-8.

55. Colvin RB, Nickleleit V. Renal Transplant Pathology. In: Jenette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG, ed. *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007, p. 1347.

56. Magil AB, Tinckam K. Monocytes and peritubular capillary deposition in acute allograft rejection. *Kidney Int* 2003; 63: 1888-93.

57. Sund S, Reisaeter AV, Scott H, et al. Glomerular monocyte/macrophage influx correlates strongly with complement activation in 1-week protocol kidney allograft biopsies. *Clin Nephrol* 2004; 62: 121-30.

58. Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, et al. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody. Analysis using Banff grading schema. *Transplantation* 1996; 61: 1586-92.

59. Crespo M, Pascual M, Tolhoff-Rubin N, et al. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: Incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation* 2001; 71: 652-8.

60. Nojima, Yoshimoto T, Nakao A, et al. Combined therapy of deoxyspergualin and plasmapheresis: a useful treatment for antibody-mediated acute rejection after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 930-3.

61. Rocha PN, Butterly DW, Greenberg A, et al. Beneficial effect of plasmapheresis and intravenous immunoglobulin on renal allograft survival of patients with acute humoral rejection. *Transplantation* 2003; 75: 1490-5.

62. Singh N, Pirsch J, Samaniego M. Antibody-mediated rejection: treatment alternatives and outcomes. *Transplant Rev* 2009; 23: 34-46.

63. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a of renal transplant outcome. *Transplantation* 2003; 75: 1034-40.

64. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, et al. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2804-2812.

65. Terasaki PI, Ozawa M. Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: Results of a 2-year prospective trial. *Transplantation* 2005; 80: 1194-97.

66. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, et al. Chronic humoral rejection: Identification of antibody-mediated chronic renal allograft

rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 574-582.

67. Regele H, Bohmig GA, Habicht A, 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; 13: 2371-2380.

68. Sipkens YW, Joosten AS, Wong MC, et al. Immunologic risk factors and glomerular C4d deposits in chronic transplant glomerulopathy. *Kidney Int* 2004; 65: 2409-2418.

69. Billing H, Rieger S, Ovens J, et al. Successful treatment of chronic antibody-mediated rejection with IVIG and rituximab in pediatric renal transplant recipients. *Transplantation* 2008; 86: 1214-1221.

70. Fehr T, Rusi B, Fischer A, Hopfer H, Wuthrich RP, Gaspert A. Rituximab and intravenous immunoglobulin treatment of chronic antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transplantation* 2009; 87: 1837-1841.

71. Jordan SC, Reinsmoen N, Peg A, et al. Advances in diagnosing and managing antibody-mediated rejection. *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 2035-2048.

72. Akalin E, Sehgal V, Murphy B, et al. Intravenous immunoglobulin treatment in a kidney transplant patient with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2005; 79: 257-8.

73. Bartel G, Schwaiger E, Böhmig GA. Prevention and treatment of alloantibody-mediated kidney transplant rejection. *Transplant International* 2011; 24(12):1142-1155.

74. Porter RR, Reid KB. Activation of the complement system by antibody-antigen complexes: the classical pathway. *Adv Protein Chem* 1979; 33: 1-7.

75. Campbell RD, Gagnon J, Porter RR. Amino acid sequence around the thiol and reactive acyl groups of human complement component C4. *Biochem J* 1981; 199: 359-70.

76. Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. Fourth component of human complement: description of a three polypeptide chain structure. *J Exp Med* 1974; 140: 1324-35.

77. Harrison RA, Thomas ML, Tack, BF. Sequence determination of the thiolester site of the fourth component of human complement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7388-92.

78. Law SK, Lichtenberg NA, Holcombe FH, Levine RP. Interaction between the labile binding sites of the fourth (C4) and fifth (C5) human complement proteins and erythrocyte cell membranes. *J Immunol* 1980; 125: 634-9.

79. Press EM, Gagnon J. Human complement component C4. Structural studies on the fragments derived from C4b by cleavage with C3b inactivator. *Biochem J* 1981;199: 351-7.

80. Carpio VN, Rech C, Eickoff E, Pegas KL, Edelweiss MI, Gonçalves LF, et al. Clinical and pathological correlations of C4d immunostaining and its influence on the outcome of kidney transplant recipients. *J Bras Nefrol* 2011; 33(3): 1-9.

81. Zwirner J, Felber E, Herzog V, Riethmüller G, Feucht HE. Classic pathway of complement activation in normal and diseased human glomeruli. *Kidney Int* 1989; 36: 1069-77.

82. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 1993; 43: 1333-8.

83. Takeuchi O, Oikawa T, Koyama K, et al. Multilayering of peritubular capillary is a specific diagnostic criterion for immunologic chronic rejection: does a humoral factor contribute to the pathogenesis of peritubular capillary lesions in chronic rejection? *Transplantation Proc* 2000; 32: 306-7.

84. Smith RN, Kawai T, Boskovic S, et al. Four stages and lack of stable accommodation in chronic alloantibody-mediated renal allograft rejection in cynomolgus monkeys. *Am J Transplant* 2008; 8:1662-1672.

85. Seemayer CA, Gaspert A, Nিকেleit V, Mihatsch MJ. C4d staining of renal allograft biopsies: a comparative analysis of different staining techniques. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22(2):568-76.

86. 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. *Human Pathol* 2005; 36:1178-1185.

87. Regele H, Exner M, Watschinger B, Wenter C, Wahrmann M, Osterreicher C, et al. Endothelial C4d deposition is associated with inferior kidney allograft outcome independently of cellular rejection. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16(10): 2058-66.

88. Ranjan P, Nada R, Jha V, Sakhuja V, Joshi K. The role of C4d immunostaining in the evaluation of the causes of renal allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23(5): 1735-41.

89. Ludovico-Martins H, Silva C, Teodoro WR, Martini Filho D, Noronha IL. Analysis of different staining techniques for c4d detection in renal allograft biopsies. *Transplant Proc*. 2009; 41(3): 862-5.

90. Bradley JA, Mowat AM, Bolton EM. Processed MHC class I alloantigen as the stimulus for CD4+ T-cell dependent antibody-mediated graft rejection. *Immunol Today* 1992; 13(11): 434-8.

91 Paul LC. Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney Int* 1999; 56(3): 783-93.

92. Pei R, Lee J, Chen T, Rojo S, Terasaki PI. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Hum Immunol* 1999; 60(12): 1293-302.

93. Sementilli A, David DR, Malheiros D et al. Patologia do transplante renal: achados morfológicos principais e como laudar as biópsias. *Bras Patol Med Lab* 2008; 44: 293-304.

94. Terasaki PI et al. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 2004; 4(3): 438-443.
95. Tait BD, Hudson F, Cantwell L, et al. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology* 2009 ;14(2): 247-54.
96. Torresan R, Manfro RC, Proença MC, et al. Association between the presence of anti-HLA antibodies with acute rejection and chronic allograft nephropathy in the first year after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2008; 40(3): 718-19.
97. Lee PC, Terasaki PI, Takemoto Sk, Lee PH, Hung CJ, Chen HL, et al. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 2002; 74(8): 1192-4.
98. Mckenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 2000; 69(3): 319-26.
99. Cardarelli F, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Delmonico FL, Wong W, Schoenfeld DA, et al. Prevalence and significance of anti-HLA and donor-specific antibodies long-term after renal transplantation. *Transplant Int* 2005; 18(5): 532-40.
100. Lydyard P, Grossi C. Desenvolvimento do Sistema Imune. In: Roitt I, Brostoff J, Male D. *Imunologia*. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole; 2000. p.10.1-10.15.

101. Carter RH. B cells in health and disease. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 377-84.

102. Rivera A, Chen CC, Ron N, Dougherty JP, Ron Y. Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymphnodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. *Int Immunol* 2001; 13: 1583-93.

103. Hwang HS, Song JH, Hyung BJ, et al. Clinical impact of CD38+ B cells on acute cellular rejection with CD20+ cells in renal allograft. *Transplantation* 2010; 89: 1489-1495.

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

105. Kayle Lk, Lakkis FG, Morgan A, et al. Acute cellular rejection with CD20-positive lymphoid clusters in kidney transplant patients following lymphocytes depletion. *Am J Transplant* 2007; 7: 949-954.

106. Bagnasco SM, Tsai W, Rahman MH, et al. CD20-positive infiltrates in renal allograft biopsies with acute cellular rejection are not associated with worse graft survival. *Am J Transplant* 2007; 7: 1968-1973.

107. Scheepstra C, Bemelman FJ, Loos CV, et al. B cells in clusters or in scattered pattern do not correlated with clinical outcome of renal allograft rejection. *Transplantation* 2008; 86: 772-778.

108. Martin L, Barra CC, Boccie O, et al. Detection of plasma cells, C4d deposits and donor-specific antibodies on sequential graft

biopsies of renal transplant recipients with chronic dysfunction. *Transplant Immunology* 2010; 22: 110-114.

109. Doria C, di Francesco F, Ramirez CB, et al. The presence of B-cell nodules does not necessarily a less favorable outcome to therapy in patients with acute cellular rejection of a renal allograft. *Transplant Proc* 2006; 38: 3441-4.

110. Menguel M, Gwinner W, Schwartz A, et al. Infiltrates in protocol biopsies from renal allograft. *Am J Transplant* 2007; 7:356-62.



**ASSOCIAÇÃO ENTRE C4d, ANTICORPOS ANTI-HLA DOADOR ESPECÍFICOS  
E CÉLULAS B EM ENXERTOS RENAIIS COM REJEIÇÃO**  
**ASSOCIATION BETWEEN C4d, DONOR-SPECIFIC HLA ANTIBODIES AND B  
CELLS IN KIDNEY GRAFTS WITH REJECTION**

Virna Nowotny Carpio<sup>1</sup>, Irene de Lourdes Noronha<sup>2</sup>, Hugo Ludovico Martins<sup>2</sup>, Luiz Fernando Jobim<sup>3</sup>, Beatriz Gil<sup>3</sup>, Adriane Kulzer<sup>3</sup>, Melina da Silva Loreto<sup>4</sup>, Luiz Felipe Santos Gonçalves<sup>1,4</sup>, Roberto Ceratti Manfro<sup>1,4</sup>, Francisco Veríssimo Veronese<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Medicina: Clínica Médica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Nefrologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Nefrologia Genética, Celular e Molecular, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>3</sup>Serviço de Imunologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>4</sup>Serviço de Nefrologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

**Autor para correspondência:** Francisco Veríssimo Veronese MD, PhD. Serviço de Nefrologia, sala 2030, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, 90035-003. Brasil. Fax: 55 51 3359-8121. e-mail: fveronese@hcpa.ufrgs.br

**Palavras chaves:** transplante renal, rejeição aguda, C4d, anticorpos doador específicos, linfócitos CD20, plasmócitos CD138.

**Título resumido:** C4d, DSA e células B na rejeição do enxerto.

**Contagem de palavras do resumo:** 355

**Contagem de palavras do texto:** 5.319

**Número de tabelas:** 04

**Número de figuras:** 03

**Conflitos de interesse:** Não há conflitos de interesse.

## **RESUMO**

**Introdução:** O fragmento C4d e os anticorpos anti-HLA doador específicos (DSA) são marcadores de resposta humoral em enxertos renais com rejeição, mas o papel das células B nesse processo ainda não é claro. Neste estudo foi avaliada a correlação entre C4d, DSA e células B em enxertos com disfunção e sua associação com aspectos morfológicos, função e sobrevida do rim transplantado.

**Material e Métodos:** A marcação para C4d, células B CD20<sup>+</sup> e plasmócitos CD138<sup>+</sup> foi realizada por imunoperoxidase em biópsias por indicação de 110 receptores de transplante renal. Positividade para CD20 e CD138 foi definida por curva ROC ( $\geq 5$  céls./mm<sup>2</sup>). O soro coletado concomitante a biópsia foi testado para DSA classe I e classe II. Estes marcadores foram correlacionados com dados clínicos e do transplante, histopatologia de Banff e a evolução do rim transplantado.

Resultados: Depósitos de C4d e DSA circulantes foram detectados em 100% e 70% dos pacientes com rejeição mediada por anticorpos (RMA) respectivamente, e nos casos de rejeição aguda celular (RAC) em 42% ( $p < 0,001$ , vs. RMA) e 28% ( $p = 0,003$ , vs. RMA). Estes dois marcadores correlacionaram-se positivamente ( $r = 0,31$ ,  $p = 0,016$ ). Houve correlação significativa entre DSA e plasmócitos CD138+ ( $r = 0,32$ ,  $p = 0,006$ ), mas as células CD20 e CD138 não se correlacionaram entre si. As células CD138<sup>+</sup> predominaram na RMA, associadas com maior painel pré-transplante e DAS, mas não a C4d, e as células CD20<sup>+</sup> predominaram na RAC e nas biópsias com fibrose intersticial/atrofia tubular, associadas a maior incompatibilidade HLA e retransplantes. Pacientes com C4d<sup>+</sup> tiveram pior função e sobrevida do enxerto em três anos de transplante, e aqueles com DSA<sup>+</sup> uma pior sobrevida do enxerto. Positividade para CD20 ou CD138 não foi preditiva da função ou sobrevida do enxerto. Na análise multivariada, somente o C4d foi fator de risco para perda do enxerto.

Conclusões: Esses resultados confirmam o valor prognóstico do C4d e dos DSA para uma pior evolução do enxerto renal, e sugerem uma associação de células B CD20<sup>+</sup> com parâmetros de rejeição celular e de plasmócitos CD138<sup>+</sup> com marcadores de resposta humoral. Entretanto, nesse estudo o infiltrado de células B na biópsia do enxerto não foi preditivo de uma pior evolução do rim transplantado.

## ABSTRACT

**Introduction:** The fragment C4d and the donor specific anti-HLA antibodies (DSA) are markers of the humoral response in rejecting kidney grafts, but the role of B cells in this process is still unclear. In this study we evaluated the correlations between C4d, DSA and B cells in dysfunctional grafts, and their association with morphological features, and graft function and survival.

**Material and Methods:** The staining for C4d, CD20<sup>+</sup> B cells and CD138<sup>+</sup> plasmocytes were done by immunoperoxidase in 110 kidney graft biopsies for cause. Positivity for CD20 and CD138 were established by ROC curve ( $\geq 5$  cells/mm<sup>2</sup>). Serum collected at biopsy were tested for anti-HLA class I and II antibodies. These markers were correlated with clinical and transplant characteristics, Banff histopathology and graft outcomes.

**Results:** C4d deposits and circulating DSA were detected in 100% and 70% of the patients with antibody-mediated rejection (AMR) respectively, and in cases with acute cellular rejection (ACR) in 42% ( $p < 0.001$ , vs. AMR) and 28% ( $p = 0.003$ , vs. AMR), respectively. Both markers were positively correlated ( $r = 0.31$ ,  $p = 0.016$ ), and there was also a significant correlation between DSA and plasmocytes CD138<sup>+</sup> ( $r = 0.32$ ,  $p = 0.006$ ). CD20 and C138 cells did not show a correlation. Plasmocytes CD138<sup>+</sup> predominated in AMR, and were associated with higher pre transplant PRA and DSA positivity, but not with C4d. CD20<sup>+</sup> B cells were highly expressed in ACR and in biopsies with interstitial fibrosis and tubular atrophy, in association with more HLA mismatches and re-transplants. Patients with C4d had poorer graft function and survival, and those with DSA<sup>+</sup> also had a worse graft survival in three years of transplant. CD20 or CD138 cells

were not predictive of graft outcomes. In multivariate analysis, only C4d remained a risk factor for graft loss.

**Conclusion:** These results confirm the prognostic value of C4d and circulating DSA for a worse kidney graft outcome, and suggest an association of CD20<sup>+</sup> B cells with parameters of cellular rejection whereas CD138<sup>+</sup> plasmacytes correlated with markers of the humoral response. However, in this study the B cell infiltrate in graft biopsy was not predictive of adverse outcomes to the transplanted kidney.

**Key words:** renal transplantation, acute rejection, C4d, donor specific antibodies, CD20 B cells, CD138 plasmacytes

## INTRODUÇÃO

A incidência de rejeição aguda do aloenxerto renal diminuiu com o uso de imunossuppressores mais potentes, mas muitos enxertos ainda são perdidos por essa causa. O papel da resposta imune humoral na rejeição foi subestimado, visto que somente em 2001 a classificação de Banff estabeleceu critérios para rejeição mediada por anticorpos (RMA) (1). Em 2005 foi adicionado o termo rejeição crônica ativa mediada por anticorpos (2) associada a perda tardia do enxerto (3,4). Esta associação entre resposta humoral e risco de perda do enxerto renal tem sido reconhecida há décadas (5-7).

A incidência de RMA em biópsias de enxertos com disfunção situa-se ao redor de 6% nos primeiros meses de transplante (8), mas até 30% dos casos de rejeição aguda podem ter um componente humoral envolvido (9). O produto da clivagem do complemento C4d é um marcador de RMA e está associado a presença e títulos elevados de DSA (10), mesmo na disfunção tardia do enxerto renal (4), e a uma pior evolução do enxerto como demonstrado em diversos estudos (6,9,11,12).

Sugere-se que os DSA *de novo* ou pré-formados contra antígenos HLA de classe I e/ou classe II após o transplante ativam a via clássica do complemento, gerando depósitos de C4d e acúmulo de neutrófilos em capilares peritubulares (CPT) (13,14). Tanto DSA circulantes quanto C4d em CPT são, isoladamente ou em conjunto, fatores de risco para rejeição crônica e má evolução do enxerto (10,15,16), mesmo quando detectados em enxertos clinicamente estáveis (17).

As células B em diferentes estágios de maturação, como células imaturas CD20<sup>+</sup>, plasmablastos CD38<sup>+</sup> e plasmócitos CD138<sup>+</sup> estão presentes em formação de *clusters* ou como infiltrados difusos, respectivamente, em enxertos renais com rejeição aguda (18-20). Sugere-se que as células B estejam associadas a rejeição mais agressiva, resistência a corticosteróides e menor sobrevida do enxerto (18,21-23), entretanto alguns estudos não mostraram esta associação (19,20,24). A apresentação antigênica e secreção local de aloanticorpos anti-HLA e anti-endotélio são mecanismos pelos quais as células B atuam no processo de rejeição (25,26). É possível que células CD20<sup>+</sup> e plasmócitos não sejam apenas um epifenômeno na rejeição, mas sim marcadores da resposta celular e humoral que resultam em inflamação e injúria tecidual grave, influenciando os desfechos do enxerto renal em longo prazo (18, 21-23).

Neste contexto, a associação entre células B, depósitos de C4d e DSA circulantes na rejeição celular e mediada por anticorpos tem sido intensamente investigada. O objetivo deste estudo foi correlacionar a presença de C4d, DSA circulantes e células B na rejeição aguda e sua associação com aspectos morfológicos, função e sobrevida do rim transplantado, testando a hipótese de que as células B em enxertos com disfunção estão associadas a uma pior evolução do enxerto.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Pacientes*

Entre abril de 2007 e agosto de 2009 foram realizados 208 transplantes renais no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Destes, foram incluídos 102 pacientes submetidos à biópsia do enxerto por indicação e que tinham tecido renal incluído em parafina disponível em arquivo. Foram também incluídos oito pacientes biopsiados entre 2003 e 2006, totalizando 110 pacientes. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.

### *Dados clínicos*

Foram coletados retrospectivamente dados demográficos e relativos ao transplante, incluindo pesquisa de anticorpos contra painel (PRA) de classe I e classe II pré-transplante (pico e último) e incompatibilidade HLA nos loci A, B e DR. A função do enxerto foi determinada pela creatinina sérica (mg/dl) no momento da biópsia, aos 3, 6, 12, 24 e 36 meses, e no final do seguimento. No modelo de análise multivariada foi incluída a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) calculada através da equação CKD-EPI (27). Os desfechos função e sobrevida do enxerto foram medidos até agosto de 2011, correspondendo a data da última consulta, registro de retorno à diálise ou de óbito com rim funcionante.

O protocolo de imunossupressão consistiu de indução com Basiliximab ou Timoglobulina<sup>®</sup>, seguido de prednisona, micofenolato mofetil ou sódico e inibidor de calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus). O diagnóstico de rejeição aguda foi baseado no quadro clínico, histopatologia e resposta ao tratamento específico. A rejeição celular aguda foi tratada com metilprednisolona

intravenosa, e para terapia de resgate foi utilizado Timoglobulina® ou OKT3®. Pacientes com rejeição aguda mediada por anticorpos foram tratados com plasmaferese e imunoglobulina intravenosa.

#### *Diagnóstico histopatológico*

Foi incluído no estudo a primeira biópsia de cada paciente. A interpretação histopatológica foi feita pela classificação de Banff 2007 (28) por patologista cego aos dados clínicos, e agrupada em categorias: 1) Sem rejeição (SR): rim normal, necrose tubular aguda, nefrotoxicidade por inibidor de calcineurina ou alterações “bordeline”; 2) Rejeição celular aguda (RCA); 3) Rejeição mediada por anticorpos (RMA); 4) Fibrose intersticial e atrofia tubular (FIAT). O diagnóstico de RMA foi baseado na marcação positiva de C4d em >25% dos CPT, presença de DSA circulantes e alterações morfológicas conforme critérios de Banff.

#### *Imunohistoquímica para C4d, células CD20 e células CD138*

Todas as 110 biópsias incluídas no estudo foram submetidas à imunohistoquímica pela técnica de peroxidase para marcação do fragmento C4d e de linfócitos B CD20. A análise de plasmócitos CD138 foi realizada em 92 (83,6%) biópsias que tinham material estocado suficiente para a análise.

Os fragmentos foram fixados em formol e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em fragmentos de 3 a 4 µm, fixados a 60°C por 2 horas e desparafinizados e reidratados em xilol e álcoois. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio diluído em

metanol (4,5%), por 5 minutos, e a recuperação antigênica em panela de pressão digital (Biocare Medical, Concord, Califórnia, USA) em tampão citrato 10mM (pH 6,0). Foi feito bloqueio inespecífico com soro de cabra 1:50 e avidina D a 1:10. Entre as etapas foram realizadas lavagens com PBS (NaCl 0,15 M, Fosfatos 6,5mM pH de 7.2).

#### Detecção de C4d

Incubou-se o anticorpo primário policlonal de coelho anti-C4d (American Research Produtos, Palo Alto, CA, USA) na diluição de 1:50 em diluente Renaissance (Biocare Medical, Concord, Califórnia, USA), a 4°C *over night*. Após o bloqueio da biotina endógena, foi feita a incubação com anticorpo secundário biotilado (Universal Link, Biocare Medical, Concord, Califórnia, USA) e aplicação da enzima peroxidase (HRP horseradish, Biocare Medical, Concord, Califórnia, USA). A revelação foi feita com 3-amino-9-etil-carbazol Romulin permanente (Biocare Medical, Concord, Califórnia, USA), a contra-coloração com Hematoxilina de Harris e a montagem em meio não aquoso, permanente (Vector Laboratories, Burlington, CA, USA)

O critério de positividade para C4d foi a marcação linear e circunferencial de 25-50% dos CPT (focal) ou > 50% dos CPT (difusa), de localização cortical. Os casos com marcação de <25% dos CPT foram considerados negativos para C4d (28,29).

#### Detecção das células CD20

Incubou-se o anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD20 (Dako, Carpinteria, CA, USA) na diluição 1:140 em PBS/BSA 1% a 4°C *over night*. Foi feito o bloqueio da biotina endógena, incubação com anticorpo secundário biotilado anti-mouse IgG (H+L) (Vector Laboratories, Burlington, CA, USA) na diluição 1:200 por 35 minutos, e incubação com a enzima estreptavidina peroxidase (Vector Laboratories, Burlington, CA, USA) 1:20 por 60 minutos. Demais etapas conforme descrito acima.

A quantificação das células CD20<sup>+</sup> foi feita por análise digital utilizando software versão 4.5 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). As imagens foram visualizadas através do microscópio Zeiss model AXIOSKOP-40, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) e a captura das imagens foi feita por câmera Cool Snap-Pro CS (Media Cybernetics). Os campos foram selecionados em sequencia pelo método da linha grega para evitar sobreposição de imagens (30), com uma média de 25 campos para cada fragmento. A contagem dos eventos positivos foi realizada com magnitude de 400X e uma resolução de 2560X1920 pixels, onde 1 mm correspondia a 5.900 pixels. As áreas (em pixels) sem tecido foram subtraídas da área total, corrigindo o número de eventos positivos por área de tecido renal, em cada campo. Para diferenciar da imagem de fundo, foi estabelecido um *threshold* específico de cor para marcação de células positivas, de distribuição nodular ou difusa em cortical, áreas perivasculares e nos agregados da junção córtico-medular. O *threshold* teve seus valores de cor gravados para padronização, sendo aplicado a cada arquivo de imagem, gerando escores corrigidos para a área de superfície do fragmento, em mm<sup>2</sup>.

## Detecção de plasmócitos CD138<sup>+</sup>

A recuperação antigênica foi realizada em micro-ondas por 15 minutos com hidratação em TBS (salina-tris tamponada, contendo NaCl 0,015M e Tris 0,05M, pH 7,6). A peroxidase endógena foi bloqueada com a *Peroxidase Blocking Solution* do kit. Utilizou-se anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD138 (DAKO, Glostrup, Dinamarca) com o sistema de detecção NovoLink Compact Polymer (Novocastra Reagents, Newcastle, Reino Unido) *overnight*. O tecido foi incubado por 30 minutos com a solução *Post Primary Block* do kit, seguido do complexo *NovoLink Polymer* por 30 minutos. Para a revelação, as lâminas foram incubadas com solução de 3-amino-9-etil-carbazol a 0,01% diluído em tampão acetato 200mM contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,015%. A revelação foi realizada sob microscopia em aumento de 100 X e as células positivas apresentavam coloração acastanhada. As lâminas foram contra-coradas com Hemalunbre de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) e montadas com glicergel (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foi realizada a contagem das células positivas por mm<sup>2</sup> em relação à área total da biópsia, corrigida pelo fator 5,096 previamente estabelecido (31).

## *Determinação dos anticorpos anti-doador específicos (DSA)*

A detecção de anticorpos anti-HLA de classe I e classe II em soro coletado concomitante a biópsia foi realizada pela plataforma Luminex com o kit LABScreen<sup>®</sup> Single Antigen (One Lambda, Los Angeles, CA, EUA) através de citometria de fluxo. Em resumo, foi feita marcação com IgG de cabra anti-humano conjugado com R-ficoeritrina (PE), sendo as amostras transferidas

para placa de leitura e aquisição dos dados no Analisador de Fluxo LabScan 100 (One Lambda, Los Angeles, CA, USA) para detecção da emissão fluorescente de cada microesfera. Após a aquisição dos dados, os resultados foram analisados em software HLA Fusion 2.0<sup>®</sup> (One Lambda, CA, USA). Considerou-se positivo a presença de anticorpos anti-HLA classe I ou classe II com média da intensidade de fluorescência (MFI) maior que 500.

### *Análise estatística*

As estatísticas descritivas são apresentadas como porcentagens para dados qualitativos e como média $\pm$ DP ou mediana e intervalos interquartis para dados quantitativos. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade das variáveis contínuas. Foram empregados os testes do Qui quadrado de Pearson para dados categóricos e ANOVA com correção de Bonferroni ou Kruskal-Wallis para comparação entre grupos. Correlações entre os marcadores de RMA (C4d e DSA) com variáveis demográficas, clínicas e com as células B CD20 e CD138 foram calculadas pelo coeficiente de Pearson ou Spearman.

O ponto de corte para positividade de células CD20<sup>+</sup> (para diagnóstico de RCA) e de células CD138<sup>+</sup> (para diagnóstico de RMA) foi estabelecido por curva ROC (*Receiver Operating Characteristic curve*). A evolução da creatinina sérica do momento da biópsia ao final do seguimento foi avaliada pela Equação de Estimativas Generalizadas (GEE), utilizando a distribuição Gama com função de ligação logarítmica. Foram analisados sete pontos no tempo, comparando pacientes positivos e negativos para C4d, DSA, C4d e DSA em conjunto, CD20,

CD138 e CD20 e CD138 em conjunto. A sobrevida do enxerto foi analisada pelo método de Kaplan Méier pelo teste *log-rank*.

A associação entre risco de perda do enxerto e variáveis explanatórias (positividade para C4d, DSA, C4d e DSA em conjunto, células CD20 e CD138) foi estimada pelo modelo de regressão proporcional de Cox. As razões de risco (*Hazard ratio*, HR) foram calculadas com intervalo de confiança de 95%, após ajuste para idade, etnia, tipo de doador, incompatibilidade HLA, categoria de Banff e nível de TFGe.

Os dados foram processados e analisados através do programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) para *Windows*, versão 18.0. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### *Dados demográficos, clínicos e histopatologia de Banff*

Foram incluídas 110 biópsias de 110 receptores de transplante renal para diagnóstico de disfunção aguda (< 6 meses) ou crônica (> 6 meses) do enxerto, com um tempo médio de seguimento de  $33 \pm 16$  meses.

Dos 110 pacientes, 68(61,3%) eram do sexo masculino e 105(95,5%) brancos. A média de idade dos pacientes foi  $42 \pm 12$  anos, variando de 15 anos a 64 anos. Quanto ao tipo de doador, 64(58,2%) eram transplantes de doador falecido, e 10 (9,1%) retransplantes. Ocorreu função retardada do enxerto em 58(52,7%) casos. Noventa e cinco por cento dos pacientes estavam recebendo IC (ciclosporina ou tacrolimus), 94% micofenolato mofetil ou sódico, 69 (62,7%)

receberam terapia de indução: Basiliximab em 25,5%, globulina antitimócito em 27,3% e OKT3 em 10%.

Os diagnósticos histopatológicos foram sem rejeição (SR) (N=24, 21,8%), rejeição aguda celular (RAC) (N=50, 45,5%), rejeição mediada por anticorpos (RMA) (N=20, 18,2%) ou fibrose intersticial e/ou atrofia tubular (FIAT) (N=16, 14,5%). Cinco biópsias com RMA tinham rejeição mista (RAC+RMA) com predomínio do componente humoral, sendo incluídas no grupo RMA.

Não houve diferença significativa entre os grupos com relação a variáveis demográficas e clínicas (Tabela 1), exceto o maior intervalo de tempo entre transplante e biópsia no grupo FI/AT ( $p < 0,001$ ). Em relação a aspectos do transplante, a incompatibilidade HLA A, B, DR foi significativamente maior no grupo RAC (vs. SR,  $p = 0,042$ ). Paineis pico anti-classe II e último PRA  $> 20\%$  pré transplante foram mais elevados no grupo RMA ( $p < 0,001$  e  $p < 0,015$ , respectivamente) quando comparados aos demais grupos.

#### *Correlação entre histopatologia e marcadores imunológicos de rejeição*

Na Tabela 2 são apresentadas as prevalências de C4d, DSA, CD20 e CD138 de acordo com o tipo histológico. Para definir positividade para CD20, foi estabelecido um ponto de corte para o diagnóstico de RAC, e para CD138 um ponto de corte para diagnóstico de RMA, calculados pela área sob a curva e pela convergência do melhor valor de sensibilidade e especificidade. A área sob a curva para CD20 foi 0,77, e o ponto de corte 5 células/mm<sup>2</sup> (CD20<sup>+</sup>:  $\geq 5$  céls./mm<sup>2</sup>), com uma sensibilidade de 70% e especificidade de 79%. Para CD138, a área sob a curva foi 0,820, e o ponto de corte 5 células/mm<sup>2</sup> (CD138<sup>+</sup>:  $\geq 5$  céls./

mm<sup>2</sup>), com uma sensibilidade de 72% e especificidade de 90%. A marcação imunohistoquímica para linfócitos CD20<sup>+</sup> e plasmócitos CD138<sup>+</sup> está ilustrada na Figura 1.

A prevalência global de C4d nas biópsias foi de 50%, e dos 110 pacientes estudados 34,5% tinham DSA circulantes. DSA anti-HLA classe I ocorreu em 45% dos casos com RMA ( $p=0,006$  vs. demais categorias), mas a proporção de DSA anti-HLA classe II foi similar aos demais grupos. Pacientes com RMA apresentaram 100% e 70% de positividade para C4d na biópsia e DSA circulantes, respectivamente (Tabela 2), enquanto que nas demais categorias histológicas este índice foi significativamente menor, variando entre 31% e 42% para C4d<sup>+</sup> ( $p<0,001$ ) e 20% a 30% para DSA<sup>+</sup> ( $p=0,003$ ). O número de células CD20<sup>+</sup> foi significativamente mais elevado na RAC ( $p=0,001$ ), mas não diferiu dos pacientes com FIAT. Em relação a infiltração por plasmócitos, o grupo com RMA mostrou maior número de células CD138<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> comparado a SR e FIAT (Tabela 2). A proporção de biópsias com positividade para CD20 ( $\geq 5$  céls./ mm<sup>2</sup>) foi maior nos grupos RAC e FIAT ( $p=0,001$ ), assim como a positividade para CD138 ( $\geq 5$  céls./ mm<sup>2</sup>) foi mais elevada no grupo RMA ( $p=0,004$ ).

#### *Associação entre marcadores imunológicos, dados do transplante e morfologia de Banff*

Os pacientes com C4d<sup>+</sup> na biópsia eram mais jovens ( $38\pm 12$  vs.  $44\pm 11$  anos,  $p=0,011$ ), mas não houve diferença no sexo, etnia, prevalência de transplante de doador falecido e função retardada do enxerto, incompatibilidade HLA e intervalo de tempo entre transplante e desfecho. A maioria das biópsias

positivas para C4d (87,3%) foram realizadas nos primeiros seis meses após o transplante, e 7(12,7%) após seis meses ( $p=0,027$ ). Comparando pacientes DSA<sup>+</sup> vs. DSA<sup>-</sup> não se verificou diferença em nenhum parâmetro clínico. Pacientes com marcação positiva para C4d tiveram último PRA anti-HLA classe I e anti-HLA classe II significativamente mais elevados do que os casos C4d<sup>-</sup> (Tabela 3). A presença de DSA circulantes esteve associada com maior painel anti-HLA classe I ( $p=0,038$ ). Dos pacientes com DSA, 66% (vs. 18% DSA<sup>-</sup>) apresentaram C4d positivo na biópsia ( $p=0,016$ ). Separando DSA anti-HLA classe I e DSA anti-HLA classe II, verificou-se que pacientes C4d<sup>+</sup> apresentaram maior proporção apenas de DSA anti-HLA classe I ( $p=0,032$ ), e não de classe II ( $p=0,495$ ) (Tabela 3).

A comparação entre pacientes CD20<sup>+</sup> vs. CD20<sup>-</sup> e CD138<sup>+</sup> vs. CD138<sup>-</sup> não mostrou diferença na idade, sexo, etnia, prevalência de função retardada do enxerto, tempo entre transplante e biópsia ( $\leq 6$  meses vs.  $> 6$  meses) e tempo entre transplante e desfecho. Entretanto, houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos CD20<sup>+</sup> e CD20<sup>-</sup> nos seguintes parâmetros: maior prevalência de doador falecido (61,2% vs. 54,0%,  $p=0,043$ ) e de transplante prévio (14,8% vs. 2,1%,  $p=0,023$ ), e maior incompatibilidade HLA ( $3,91 \pm 1,26$  vs.  $3,20 \pm 1,27$ ,  $p=0,005$ ), respectivamente. Na comparação dos grupos CD138<sup>+</sup> e CD138<sup>-</sup> houve diferença estatística na proporção de casos com último PRA pré transplante  $> 20\%$  (36,4% vs. 13,6% respectivamente,  $p=0,011$ ). Pacientes com CD138  $\geq 5$  céls./mm<sup>2</sup> tiveram maior proporção da DSA<sup>+</sup> (51,5% vs. 23,7%,  $p=0,007$ ). Não houve associação entre CD20<sup>+</sup> e DSA anti-HLA classe I ou II, mas a proporção de DSA anti-HLA classe I ou II tendeu a ser maior nos pacientes CD138<sup>+</sup> (28% vs. 13,6%,  $p=0,09$  e 30% vs. 16%,  $p=0,10$ ).

Em relação aos achados morfológicos de Banff (Tabela 3), 26(47,2%) dos pacientes que apresentavam marginação de neutrófilos em CPT e 13(23,6%) daqueles com glomerulite aguda tinham marcação para C4d na biópsia ( $p=0,039$  e  $p<0,001$  respectivamente, vs. C4d<sup>-</sup>). Dos casos com DSA<sup>+</sup>, 18(47,4%) tinham pericapilarite ( $p<0,001$ , vs. DSA<sup>-</sup>), mas uma menor prevalência de arterite ( $p=0,029$ , vs. DSA<sup>-</sup>). Dos pacientes com tubulite, 42(62,7%) tinham CD20  $\geq 5$  céls./mm<sup>2</sup> (vs. 25[37,3%] CD20<sup>-</sup>,  $p=0,05$ ), sem diferir nos demais parâmetros. Em relação ao grupo CD138<sup>+</sup>, marginação de neutrófilos em CPT foi verificada em 14(70%) dos casos CD138<sup>+</sup> (vs. 6[30%] CD138<sup>-</sup>,  $p<0,001$ ) e glomerulite aguda em 11(73,3%) vs. 4(26,7%) respectivamente ( $p=0,001$ ).

#### *Correlações entre os marcadores imunológicos*

A presença de C4d na biópsia do enxerto não se correlacionou com positividade para células B CD20<sup>+</sup> ( $r=0,09$ ,  $p=0,342$ ) ou CD138<sup>+</sup> ( $r=0,01$ ,  $p=0,926$ ), mas correlacionou-se com presença de DSA circulantes ( $r=0,31$ ,  $p=0,016$ ). Sessenta e seis por cento dos pacientes C4d<sup>+</sup> tinham DSA<sup>+</sup>, e 76,4% daqueles sem marcação para C4d tinham DSA<sup>-</sup>. Considerando o grau de marcação para C4d, a prevalência de DSA<sup>+</sup> aumentou de 32% para 55% da distribuição focal para a difusa, e foi 23% no grupo C4d<sup>-</sup> ( $p=0,012$ ). DSA não se correlacionou com infiltrado de células CD20<sup>+</sup> ( $r=-0,157$ ,  $p=0,102$ ), mas apresentou uma correlação positiva e significativa com plasmócitos CD138<sup>+</sup> ( $r=0,32$ ,  $p=0,006$ ). Não houve correlação entre positividade para células CD138<sup>+</sup> e CD20<sup>+</sup> ( $r=0,003$ ,  $p=0,978$ ). Analisando somente os casos de rejeição aguda, verificou-se correlação negativa e significativa entre DSA e células CD20<sup>+</sup> ( $r=-0,35$ ,  $p=0,003$ ). A mediana de células

CD20<sup>+</sup> foi maior nos pacientes DSA<sup>-</sup> ( $p=0,007$ ), e houve uma tendência de maior número de células CD138<sup>+</sup> nos pacientes com DSA<sup>+</sup> ( $p=0,083$ ), como mostra a Tabela 3.

#### *Função do enxerto e positividade para C4d, DSA, CD20 e CD138*

A análise da evolução funcional do enxerto de acordo com positividade para os marcadores imunológicos é apresentada na Figura 2. Foram excluídos os pacientes sem rejeição ou com FIAT, e analisados os casos com rejeição aguda (RAC e/ou RMA). As médias de creatinina sérica no grupo C4d<sup>+</sup> foram significativamente mais elevadas na biópsia ( $4,7\pm 2,6$  vs.  $3,6\pm 2,3$ ;  $p=0,028$ ), aos 6 meses ( $2,1\pm 0,9$  vs.  $1,7\pm 10,8$ ;  $p=0,047$ ), aos 12 meses ( $2,0\pm 1,0$  vs.  $1,6\pm 0,6$ ;  $p=0,015$ ), no segundo ano ( $2,3\pm 1,7$  vs.  $1,6\pm 0,6$ ;  $p=0,03$ ) e no último seguimento ( $3,7\pm 2,7$  vs.  $2,5\pm 2,3$ ;  $p=0,014$ ). A análise da EEG mostrou que a evolução da creatinina foi pior nos pacientes C4d<sup>+</sup> até o final do seguimento, independente do momento em que foi medida (C4d<sup>+</sup> vs. C4d<sup>-</sup>: Wald Chi-Square: 7,045,  $p=0,006$ ; momento-C4d Wald Chi-Square: 6,343,  $p=0,727$ ). Comparando pacientes DSA<sup>+</sup> e DSA<sup>-</sup>, não houve diferença significativa nos períodos analisados, mas a análise de C4d/DSA em conjunto mostrou que a evolução da creatinina sérica foi pior em 3 anos no grupo com ambos os marcadores positivos, independente do momento da medida (C4d<sup>+</sup>/DSA<sup>+</sup> vs. C4d<sup>-</sup>/DSA<sup>-</sup>: Wald Chi-Square: 5,185,  $p=0,029$ ; momento-C4d/DSA Wald Chi-Square: 6,343,  $p=0,446$ ). A análise dos grupos CD20<sup>+</sup> (vs. CD20<sup>-</sup>) e CD138<sup>+</sup> (vs. CD138<sup>-</sup>) não mostrou diferença na evolução da função do enxerto em todos os períodos. Quando CD20/CD138 foram analisados em conjunto, a creatinina sérica foi sistematicamente menor no grupo com ambos os

marcadores. No entanto, houve interação entre momento-CD20/CD138 mostrando que o grupo é dependente do momento em que a creatinina foi medida (CD20<sup>+</sup>/CD138<sup>+</sup> vs. CD20<sup>-</sup>/CD138<sup>-</sup>: Wald Chi-Square: 6,368, p=0,005; momento-C4d/ DSA Wald Chi-Square: 20,409, p<0,001).

#### *Sobrevida do enxerto e positividade para C4d, DSA, CD20 e CD138*

A análise pelo Kaplan-Meier mostrou associação entre positividade para C4d na biópsia e perda do enxerto em 3 anos de transplante (Figura 3). A sobrevida do enxerto foi significativamente pior nos pacientes com deposição ≥25% de C4d em CPT quando comparado ao grupo C4d<sup>-</sup> (62% vs 86%, p=0,022). Igualmente, no grupo DSA<sup>+</sup> a sobrevida do enxerto foi significativamente pior comparado aos pacientes DSA<sup>-</sup> (61% vs 81%, p=0,045). Positividade para linfócitos B CD20<sup>+</sup> ou para plasmócitos CD138<sup>+</sup> não teve associação com sobrevida do enxerto: CD20<sup>+</sup> vs. CD20<sup>-</sup> (72% vs. 75,5%, p=0,906) e CD138<sup>+</sup> vs. Cd138<sup>-</sup> (76% vs. 80%, p=0,679 (Figura 3).

A análise de regressão de Cox não ajustada mostrou que positividade para C4d ou para DSA circulantes foi preditiva de perda do enxerto, com HR=2,51(IC:1,11-5,69; p=0,028) e HR=2,15(IC:1,01-4,41; p=0,048), respectivamente (Tabela 4). Uma maior taxa de filtração glomerular (TFGe) no momento da biópsia foi fator protetor contra perda do enxerto, tanto na análise univariada (HR=0,83(IC 0,75-0,91); p<0,001) quanto na multivariada (HR=0,84(IC 0,77-0,92; p<0,001). Na análise multivariada com ajuste para função do enxerto no momento da biópsia, apenas positividade para C4d permaneceu preditivo de perda do enxerto em 3 anos de transplante.

## DISCUSSÃO

A rejeição aguda do enxerto renal ainda é causa de disfunção e perda precoce e tardia do transplante. Durante a rejeição aguda respostas imunes celulares e humorais operam de forma independente ou concomitante, ocasionando dano ao rim transplantado muitas vezes de forma irreversível. Antígenos endoteliais de classe I e classe II de capilares e artérias atuam como alvos para esta resposta imune, onde coexistem diversas assinaturas moleculares que desencadeiam rejeição celular e/ou mediada por anticorpos, influenciando negativamente a sobrevida dos enxertos (12,13,16,18,32). O papel central dos linfócitos T na rejeição celular está bem estabelecido, porém com a ocorrência de formas graves de rejeição e a crescente evidência de que mecanismos humorais estão envolvidos, uma maior atenção tem sido dada a RMA (4-9,12-15,33).

Este estudo investigou marcadores imunológicos de rejeição aguda, especialmente RMA, e sua associação com alterações morfológicas e evolução do enxerto em 3 anos de transplante. A prevalência global de C4d e DSA circulantes foi 50% e 38% respectivamente, e dos pacientes com depósitos de C4d 66% foram DSA<sup>+</sup>, achados similares ao relatado por Gaston et al (4). Ambos marcadores estiveram associados a risco imunológico, representado por maior painel de anticorpos pré transplante e alterações morfológicas de RMA, como pericapilarite e glomerulite, como já demonstrado em outras publicações (9,34).

Depósitos de C4d são descritos não só na RMA, mas também na rejeição celular, toxicidade por IC e mesmo em enxertos histologicamente normais, e o

significado deste achado ainda não é bem compreendido (9,12,35). Apesar da prevalência de C4d variar conforme técnica utilizada e contexto da biópsia (indicação ou de protocolo), o critério para positividade de C4d também influencia esta prevalência. Neste estudo foi considerada marcação positiva  $\geq 25\%$  dos CPT pois a imunohistoquímica (IHC) é menos sensível que a imunofluorescência (IF) na definição de presença e escore de C4d (28,36,37), e também com base em que toda a marcação para C4d por IHC superior a 10% é considerada positiva pelos atuais critérios de Banff (28). Um achado interessante do estudo foi a proporcionalidade entre a prevalência de DSA circulantes e o escore de marcação de C4d: 23% no grupo negativo, 32% no focal e 55% no difuso ( $p=0,012$ ). Deve-se ressaltar, entretanto, que o critério de positividade de 25% pode ter classificado erroneamente como C4d focal casos que teriam marcação difusa pela IF. Então, esta diferença poderia ser ainda maior, considerando que a IHC pode ter subestimado a extensão do C4d com o viés de identificar DSA circulantes em casos C4d negativos ou com marcação focal (38).

Diversos estudos têm mostrado que a deposição de C4d, tanto focal como difusa, influenciam negativamente os resultados do transplante, sendo um marcador preditivo de pior função e sobrevida do enxerto (3,4,9-12). Neste estudo o C4d foi o único marcador prognóstico consistente, mesmo após ajuste para função do enxerto na biópsia e presença de DSA. Em biópsias sem rejeição e em enxertos funcionalmente estáveis, entretanto, ainda não é claro o quanto o manejo clínico é influenciado pela presença de C4d. No estudo de

Nickeleit et al (39), por exemplo, não houve diferença na evolução de pacientes com e sem C4d na biópsia que não foram tratados para rejeição.

Estudos demonstram que 20 a 90% dos pacientes com rejeição aguda tem DSA formados pós-transplante, e os DSA *de novo* estão associados ao desenvolvimento de rejeição crônica e pior sobrevida tardia do enxerto (4,7,8,12,34). Estudos iniciais (5,40) atribuíram aos anticorpos anti-HLA classe I um papel predominante na rejeição humoral, mas posteriormente verificou-se que os anti-HLA classe II parecem também contribuir para este processo (7,8). No presente estudo, RMA e C4d foram associados somente a DSA anti-HLA classe I, mas o número de pacientes avaliados foi pequeno.

A contribuição desses marcadores isoladamente ou em conjunto na evolução do rim transplantado tem sido discutida, mas parece claro que o C4d reflete atividade dos DSA, produzindo depósito de anticorpos, dano endotelial e injúria ao enxerto. Em pacientes sem DSA circulantes, postula-se que a injúria ocorra por anticorpos não-HLA (ex., anti-endotélio) ou concentração dos DSA intraenxerto (41). Gaston et al (4) relataram que 57% dos pacientes com disfunção tardia do enxerto tinham C4d e DSA detectáveis, e que C4d, com ou sem DSA, foi associado com risco 3 a 4 vezes maior de perda do enxerto. Worthington et al (10) observaram que pacientes com C4d<sup>+</sup> difuso e sem DSA responderam ao tratamento convencional para rejeição, e aqueles com ambos marcadores tiveram maior perda do enxerto, sugerindo maior importância dos DSA circulantes. Em nosso estudo, ambos marcadores resultaram em pior sobrevida do enxerto e maior nível de creatinina ao final de 3 anos, mas na análise multivariada esse

efeito só se manteve para C4d, sugerindo que independente dos DSA, o C4d possa ter maior valor prognóstico.

Os linfócitos B ativados expressam antígenos HLA classe II e atuam como células apresentadoras de antígenos, co-localizando com células T CD4<sup>+</sup>. Diferenciam-se em células produtoras de anticorpos e em células de memória, interagindo com linfócitos T na rejeição aguda (26). A associação entre células B e plasmócitos com deposição de C4d e produção de DSA na rejeição do enxerto renal ainda é alvo de controvérsia, mas sua importância na rejeição aguda (42) e na rejeição crônica mediada por anticorpos (26) tem sido reconhecida.

Sarwal et al (18) observaram que a densidade de células B CD20<sup>+</sup> durante a rejeição aguda correlacionou-se com resistência a corticosteroides e menor sobrevida do enxerto. Hippen et al (23) descreveram desfechos semelhantes de enxertos com rejeição aguda que apresentavam marcação forte e difusa para CD20, e no estudo de Tsai et al (21) pacientes com >2 células CD20<sup>+</sup>/campo de grande aumento na biópsia apresentaram um risco 4,5 maior de perda do enxerto comparado a aqueles com 0-1 células CD20<sup>+</sup>. Nesse estudo, 100% das biópsias com RAC tinham infiltrados nodulares de CD20, e os controles apenas 17%. Martins et al (31) também correlacionaram o infiltrado nodular de células B CD20<sup>+</sup> (e não o difuso) com pior função do enxerto na rejeição aguda. Outros estudos, entretanto, não associaram infiltrados ricos em células CD20<sup>+</sup> com resistência ao tratamento ou desfechos desfavoráveis, tanto na rejeição aguda (19,20) quanto em enxertos clinicamente estáveis (43). No presente estudo, positividade para CD20 foi associada a doador falecido, re-transplantes, maior incompatibilidade HLA e tubulite na biópsia, mas não com C4d e DSA classe I ou classe II, em

acordo com outros autores (18,44). Observou-se um maior número de células CD20<sup>+</sup> nas biópsias com rejeição aguda celular, mas não houve correlação entre positividade para CD20 com pior função ou risco de perda do enxerto. É possível que o limiar de positividade adotado para células B CD20<sup>+</sup> tenha sido baixo, se comparado a 300 células/campo no estudo de Muorah et al (45) e 275 células/campo no estudo de Hwang et al (22), ambos mostrando associação com pior evolução clínica do enxerto. Optou-se pela contagem por análise digital, um método acurado e amplamente difundido, pela variabilidade de distribuição e densidade das células CD20<sup>+</sup> no infiltrado celular. O número absoluto de células CD20<sup>+</sup> foi corrigido por mm<sup>2</sup> de tecido cortical, o que produz um escore final de menor magnitude. Por outro lado, a distribuição intersticial das células CD20<sup>+</sup> – como infiltrado nodular ou difuso – pode ter importância prognóstica e, portanto, deveria ser quantificada separadamente (18,23,31), o que constitui uma limitação do presente estudo.

Um número significativo de células B CD20<sup>+</sup> foi observado no infiltrado de biópsias sem rejeição, mas com dano crônico predominante. Este estudo não avaliou especificamente este subgrupo no qual foi incluído um número pequeno de pacientes, e também não foi definida a presença de rejeição crônica celular ou humoral pelos critérios de Banff. Postula-se que células B residentes permanecem no enxerto com capacidade de apresentação antigênica (42), mantendo uma resposta imune celular e/ou humoral danosa ao enxerto. Chama a atenção o dado de 31% dos pacientes com FIAT terem C4d<sup>+</sup> na biópsia e DSA<sup>+</sup> circulantes.

A infiltração por plasmócitos durante a rejeição não é um achado comum, e quando presente tem sido associada a um pior prognóstico do enxerto

renal (21,22,26,44,46,47). Martin et al (46), comparando pacientes estáveis com os que apresentavam perda progressiva de função do enxerto, observaram neste grupo um aumento significativo de células plasmáticas em associação com C4d e anticorpos anti-HLA específicos. Tsai et al (21) estabeleceram como limiar de positividade seis ou mais células CD138<sup>+</sup>/campo funcionalmente ativas, verificando associação apenas com rejeição celular aguda, e um risco 3,4 vezes maior de piora funcional e perda do enxerto. No entanto, apenas um caso de RMA pura e 4 de rejeição mista foram incluídos naquele estudo. Utilizamos um limiar semelhante para positividade de CD138<sup>+</sup> ( $\geq 5$  céls/mm<sup>2</sup>), e estas células predominaram na RMA associadas a maior PRA pré transplante, pericapilarite e glomerulite, e uma tendência de maior frequência de DSA classe I ou II, sugerindo um papel preponderante na resposta humoral ao enxerto. Entretanto, não foi encontrada associação com C4d. Novamente poderia se questionar se o limiar de positividade adotado para CD138 foi baixo, insuficiente para detectar uma associação com pior evolução do enxerto. Poucos estudos avaliaram especificamente células plasmáticas (ex., CD38 e CD138) em transplante renal, e o critério de positividade tem sido variável, como >30% do infiltrado com marcação positiva (22) ou, em uma escala de 0 a 4, escore 3 (marcação multifocal) ou 4 (marcação difusa) (21). Apesar da ausência de definições, sugere-se que diferentes linhagens de células B atuam na rejeição aguda e crônica do transplante, associando-se células B imaturas e maduras com resposta celular e humoral, respectivamente. Neste contexto, o uso terapêutico de rituximab ou bortezomib tem sido explorado (48), mas a definição prognóstica destes marcadores ainda é inconclusiva.

Este estudo apresenta limitações, pelo delineamento retrospectivo e pelo número relativamente pequeno de pacientes, com curto tempo de seguimento. A ausência de um padrão ouro como critério diagnóstico para positividade de células B pode constituir um viés, dificultando uma análise prognóstica mais acurada. De outra forma, nossos resultados confirmam o valor prognóstico do C4d para uma pior função e sobrevida do enxerto renal, e dos anticorpos anti-HLA doador específicos para perda do enxerto em três anos de transplante. A associação das células B CD20<sup>+</sup> com parâmetros de rejeição aguda celular e de plasmócitos CD138<sup>+</sup> com marcadores de resposta humoral sugerem um maior envolvimento dessas células na RAC e RMA, respectivamente, mas a sua presença no infiltrado celular não foi determinante de pior função ou sobrevida do enxerto. O valor prognóstico do infiltrado de células B no enxerto renal ainda necessita ser investigado.

### **Reconhecimentos**

Este trabalho obteve suporte financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e do Programa de Fomento à Pós-Graduação (PROF) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Virna Carpio recebeu bolsa de doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **Referências**

1. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003; 3: 708-714.
2. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE et al. Banff'05 Meeting Report: Differential Diagnosis of Chronic Allograft Injury and Elimination of Chronic Allograft Nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7: 518-526.
3. Regele H, Exner M, Watschinger B, Wenter M, Osterreicher C, Säemann MD, et al. Endothelial C4d deposition is associated with inferior kidney allograft outcome independently of cellular rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 2058–2066.
4. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, Fieberg AM, Leduc R, Cosio FC, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation* 2010; 90: 68-74.
5. Halloran PF, Wadgymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response. Clinical and pathological features of anti-class I mediated rejection. *Transplantation* 1990; 49: 85-91.
6. Lederer SR, Kluth-Pepper B, Schneeberger H, Albert E, Land W, Feucht HE.: Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long-term survival of renal allografts. *Kidney Int* 2001; 59: 334-341.
7. Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Servetti S, Monaco PI, Buonomo O, et al. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation* 2001; 71: 1106-1112.

8. Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Mauiyyedi S, Collins AB, Fitzpatrick D, et al. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: Incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation* 2001; 71: 652-658.
9. Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL et al. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 779-787.
10. Worthington JE, McEwen A, McWilliam LJ, Picton ML, Martin S. Association Between C4d Staining in Renal Transplant Biopsies, Production of Donor-Specific HLA Antibodies, and Graft Outcome. *Transplantation* 2007; 83: 398–403.
11. Herzenberg AM, Gill JS, Djurdjev O, Magil AB. C4d deposition in acute rejection: an independent long-term prognostic factor. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 234-241.
12. Haririan A, Kiangkitiwan B, Kukuruga D, Cooper M, Hurley H, Drachenberg C, et al. The impact of C4d pattern and donor-specific antibody on graft survival in recipients requiring indication renal allograft biopsy. *Am J Transplant* 2009; 9: 2758-2767.
13. Colvin RB. Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection: Diagnosis and Pathogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol* 2007; 18: 1046-1056.
14. Changa AT, Platt J. Role of Antibodies in Transplantation. *Transplant Rev* 2009; 23: 191-198.
15. Mauiyyedi 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; 12: 574-582.

16. 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; 13: 2371-2380.

17. Bartel G, Regele H, Wahrmann M, Huttary N, Exner M, Hörl WH, Böhmig GA. Posttransplant HLA Alloreactivity in Stable Kidney Transplant Recipients — Incidences and Impact on Long-Term Allograft Outcomes. *Am J Transplant* 2008; 8: 2652–2660.

18. Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Masek M, et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 2003; 349: 125-138.

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

20. Scheepstra C, Bemelman FJ, van der Loos C, Rowshani AT, van Donselaar-Van der Pant KA, Idu MM, et al. B cells in clusters or in scattered pattern do not correlated with clinical outcome of renal allograft rejection. *Transplantation* 2008; 86: 772-778.

21. Tsai EW, Wallance WD, Gjertson DW, Reed EF, Ettenger RB. Significance of intragraft CD138+ lymphocytes and p-S6RP in pediatric kidney transplant biopsies. *Transplantation* 2010; 90: 875-881.

22. Hwang HS, Song JH, Hyoung BJ, Lee SY, Jeon YJ, Kang SH, et al. Clinical impact of CD38+ B cells on acute cellular rejection with CD20+ cells in renal allograft. *Transplantation* 2010; 89: 1489-1495.
23. Hippen BE, DeMattos A, Cook WJ, Kew CE, Gaston RS. Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute rejection of renal allografts. *Am J Transplant* 2005; 5: 2248-2252.
24. 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 Transplant* 2007; 7: 1968-1973.
25. Stegall M, Raghavaiah S, Gloor JM. The (re)emergence of B cells in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 451-455.
26. Colvin RB, Hirohashi T, Farris AB, Minnei F, Collins, Smith N. Emerging role of B cells in chronic allograft dysfunction. *Kidney Int Suppl* 2010; 119:S13-S17.
27. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150: 604-612.
28. 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; 84: 753-760.
29. Lorenz M, Regele H, Schillinger 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; 78: 447–452.

30. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, *et al.* Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 379-394.
31. Martins HL, Silva C, Martini D, Noronha IL. Detection of B lymphocytes (CD20<sup>+</sup>) in renal allograft biopsy specimens. *Transplant Proc* 2007; 39: 432-434.
32. Aquino-Dias EC, Joelsons G, da Silva DM, Berdichevski RH, Ribeiro AR, Veronese FJ, *et al.* Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int* 2008; 73: 877-884.
33. 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; 4: 378-383.
34. Bohmig GA, Exner M, Habicht A, Salchillinger M, Lang U, Kletzmayer J, *et al.* Capillary C4d deposition in kidney allografts: a specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1091-1099.
35. Carpio VN, Rech C, Eickhoff EI, Pegas KL, Edelweiss MI, Veronese FV *et al.* Clinical and pathological correlations of C4d immunostaining and its influence on the outcome of kidney transplant recipients. *J Bras Nefrol* 2011; 33: 1-9.
36. Ludovico-Martins H, Silva C, Teodoro WR, Martini Filho D, Noronha IL. Analysis of different staining techniques for c4d detection in renal allograft biopsies. *Transplant Proc* 2009; 41: 862-865.
37. Seemayer CA, Gaspert A, Nickleit V, Mihatsch MJ. C4d staining of renal allograft biopsies: a comparative analysis of different staining techniques. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 568-576.

38. Kayler LK, Kiss L, Sharma V, Mohanka R, Zeevi A, Girnita A, et al. Acute Renal Allograft Rejection: Diagnostic Significance of Focal Peritubular Capillary C4d. *Transplantation* 2008; 85: 813-820.
39. Nickleit V, Zeiler M, Gudat F, Thiel G, Mihatsch MJ. Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts: diagnostic and therapeutic implications. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 242-251.
40. 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 Bangg grading schema. *Transplantation* 1996; 61: 1586-1592.
41. Bocrine O, Hussein AA, Guignier F, Funes de la Vega N, Rifle G, Mousson C, et al. Distribution of donor-specific antibodies in the cortex and medulla of renal transplants with chronic allograft nephropathy. *Transplant Immunol* 2007; 17: 227-229.
42. Zarkhin V, Li L, Sarwal M. "To B or Not to B?" B-cells and graft rejection. *Transplantation* 2008; 85: 1705-1714.
43. Menguel M, Gwinner W, Schwartz A, Bajeski R, Franz I, Bröcker V, et al. Infiltrates in protocol biopsies from renal allograft. *Am J Transplant* 2007; 7:356-365.
44. Zarkhin V, Kambham N, Li L, Kwork S, Hsieh S-C, Salvatierra O, et al. Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection. *Kidney Int* 2008; 74: 664-673.

45. Muorah MR, Brogan PA, Sebire NJ, Trompeter RS, Marks SD. Dense B cell infiltrates in paediatric renal transplant biopsies are predictive of allograft loss. *Pediatr Transplantation* 2009; 13: 217-222.
46. Martin L, Charon-Barra C, Bocrie O, Guignier F, D'Athis P, Dautin G, et al. Detection of plasma cells, C4d deposits and donor-specific antibodies on sequential graft biopsies of renal transplant recipients with chronic dysfunction. *Transplant Immunol* 2010; 22: 110-114.
47. Desvaux D, Le Gouvello S, Pastural M, Abtahi M, Suberbielle C, Boeri N, et al. Acute allograft rejections with major interstitial oedema and plasma cell-rich infiltrates: high interferon expression and poor clinical outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 933-939.
48. Zarkhin V, Chalasani G, Sarwal MM. The yin and yang of B cells in graft rejection and tolerance. *Transplant Rev* 2010; 24: 67-78.

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos dos receptores de transplante renal

	SR (n=24)	RAC (n=50)	RMA (n=20)	FIAT (n=16)	P
Idade	42,4 ± 11,1 <sup>a</sup>	42,6 ± 12,8	35,8 ± 12,7	41,4 ± 8,4	0,171
Sexo (masculino)	15 (62,5) <sup>b</sup>	34 (68)	11 (55)	8 (50)	0,541
Etnia (branco)	23 (95,8)	47 (94)	19 (95)	16 (100)	0,796
Doador Falecido	10 (41,7)	26 (52)	5 (25)	5 (31,3)	0,158
Transplante prévio	2 (8,3)	3 (6)	3 (15,8)	2 (12,5)	0,607
Incompatibilidade HLA A, B, DR	3,1 ± 1,3	3,9 ± 1,4	3,3 ± 1,3	3,7 ± 0,8	0,034 <sup>c</sup>
Último PRA >20%	5 (20,8)	7 (14)	10 (50)	4 (25)	0,015
PRA pico pré -Tx Classe I	0,0 (0,0-2,3) <sup>d</sup>	0,0 (0,0-2,5)	0,0 (0,0-22,0)	0,0 (0,0-32)	0,347
PRA pico pré -Tx classe II	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	26 (0,0-67)	0,0 (0,0-31)	<0,001 <sup>e</sup>
Indução	15 (62,5)	28 (56)	12 (60)	12 (75)	0,599
DGF	15 (68,2)	22 (44)	12 (63,2)	8 (50)	0,212
Tempo Tx-Bx (dias)	16 (8-24)	10 (7-18)	20 (10-72)	334 (200-643)	<0,001 <sup>f</sup>
Tempo Tx-desfecho (meses)	26,6 ± 11	32,9 ± 13,5	32,5 ± 14,8	41,0 ± 27,0	0,051
Sobrevida do enxerto em 3 anos	3 (12,5)	12 (24,0)	7 (35,0)	7 (43,8)	0,118

PRA: reatividade contra painel; Tx: transplante; DGF: função retardada do enxerto; Bx:

biópsia; <sup>a</sup>Média ± DP; <sup>b</sup>n(%); <sup>c</sup>RAC vs. SR, p=0,042; <sup>d</sup>Mediana(IIQ)

<sup>e</sup>RMA vs. SR, p=0,002; RMA vs. RAC, p<0,001; RMA vs FIAT, p=0,016

<sup>f</sup>FIAT vs. SR, p<0,001; FIAT vs. RAC, p<0,001; FIAT vs. RAH, p=0,026

Tabela 2. Prevalência dos marcadores imunológicos de rejeição do enxerto conforme a categoria histológica

	SR (n=24)	RAC (n=50)	RMA (n=20)	FIAT (n=16)	P
C4d Positivo	9 (37,5) <sup>a</sup>	21 (42)	20 (100)	5 (31,3)	<0,001
C4d focal	3 (12,5)	8 (16,0)	8 (40)	3 (18,8)	
C4d difuso	6 (25,0)	13 (26,0)	12 (60)	2 (12,5)	
DSA classe I ou II	5 (20,8)	14 (28,0)	14 (70,0)	5 (31,2)	0,003
DSA classe I	1(4,2)	4(8,0)	9(45,0)	3(18,7)	0,006
DSA classe II	4(16,6)	10(20,0)	5(25,0)	2(12,5)	0,829
CD20 (cél/s/mm <sup>2</sup> )	1 (0,0-8,5) <sup>b</sup>	19 (2,0-84,7)	2 (0,26-53,5)	9,5 (5,75- 18,0)	0,001 <sup>c</sup>
CD20 ≥ 5 (cél/s/mm <sup>2</sup> )	6 (25,0)	33 (66,0)	9 (45,0)	13 (81,3)	0,001
CD138 (cél/s/mm <sup>2</sup> ) <sup>d</sup>	0,5 (0,0-1,8)	3 (0,0-21,3)	7,9 (2,5-21,1)	1,3 (0,0-4,3)	0,013 <sup>e</sup>
CD138 ≥ 5 (cél/s/mm <sup>2</sup> )	2 (10,0)	17(40,5)	11(64,7)	3(21,4)	0,004

DSA: anticorpos doador específico; <sup>a</sup>n(%); <sup>b</sup>Mediana e intervalo interquartil

<sup>c</sup>RAC vs. SR: p<0,001; RAC vs. RMA: p=0,051; RAC vs. FIAT: p=0,178; <sup>d</sup>n=92

<sup>e</sup>RMA vs. SR: p=0,001; RMA vs. RAC: p=0,238; RMA vs. FIAT: p=0,010

Tabela 3. Marcadores imunológicos e morfológicos dos pacientes com C4d +/- e DSA +/-

	C4d <sup>+</sup> (n=55)	C4d <sup>-</sup> (n=55)	P	DSA <sup>+</sup> (n=38)	DSA <sup>-</sup> (n=72)	P
Último painel pré Tx classe I (%)	0,0(0,0-22,0)	0,0(0,0-0,0)	0,004	0,0(0,0-16,5)	0,0(0,0-0,0)	0,038
Último painel pré Tx classe II (%)	0,0(0,0-31)	0,0(0,0-0,0)	<0,001	0,0(0,0-11,2)	0,0(0,0-0,0)	0,096
C4d positivo	-	-	-	25(66,0%)	13(18,0%)	0,016
DSA <sup>+</sup> classe I	15(27,3)	6(11,1)	0,032	-	-	-
DSA <sup>+</sup> classe II	12(21,7)	9(16,7)	0,495	-	-	-
Glomerulite	13(23,6%)	5(9,1%)	0,039	8(21,0%)	10(13,9%)	0,334
Neutrófilos em CPT	26(47,2%)	1(1,8%)	<0,001	18(47,4%)	9(12,5%)	<0,001
Tubulite	33(60,0%)	34(61,0%)	0,845	24(63,1%)	43(59,7%)	0,725
Arterite	11(20,0%)	7(12,7%)	0,303	2(5,2%)	16(22,2%)	0,029
CD20 (céls/mm <sup>2</sup> )	12(1-45)	5 (1-25)	0,401	2(0-18,4)	10(2,0-63,8)	0,007
CD138 (céls/mm <sup>2</sup> )	3,1(0-11,4)	1,6(0-8,9)	0,381	7(0-12,0)	1,5(0-6,4)	0,083

Tx: transplante; CPT: capilares peritubulares

Tabela 4. Fatores independentes associados à perda do enxerto pelo modelo de regressão de Cox para taxas proporcionadas

Variável	<i>Hazard Ratio</i> bruta (95% IC)	P	<i>Hazard Ratio</i> ajustada (95% IC)	P
Idade (anos)	1,01(0,98-1,04)	0,703	NI	
Etnia (branco)	0,37(0,11-1,23)	0,104	NI	
Tipo de doador (falecido)	1,1(0,52-2,33)	0,810	NI	
Incompatibilidade HLA	1,1(0,80-1,45)	0,654	NI	
CKD-EPI na biópsia (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	0,83(0,75-0,91)	<0,001	0,84(0,77-0,92)	<0,001
Banff 2007				
Sem rejeição	1.0		NI	
RAC	1,62(0,45-5,78)	0,458	NI	
RMA	2,16(0,55-8,47)	0,269	NI	
FI/AT	1,49(0,33-6,66)	0,603	NI	
C4d positive	2,51(1,11-5,69)	0,028	2,24(1,02-5,17)	0,047
DSA positive	2,15(1,01-4,41)	0,048	1,79(0,84-3,83)	0,130
CD20 ≥ 5 (céls/mm <sup>2</sup> )	1,05(0,49-2,25)	0,906	NI	
CD138 ≥ 5 (céls/mm <sup>2</sup> )	1,21(0,48-3,04)	0,682	NI	

IC: Intervalo de Confiança; NI: não incluído no modelo de regressão; DSA: anticorpos dador específico; RAC= Rejeição Aguda Celular; RMA= Rejeição Mediada por Anticorpos; FIAT=Fibrose Intersticial e/ou Atrofia Tubular

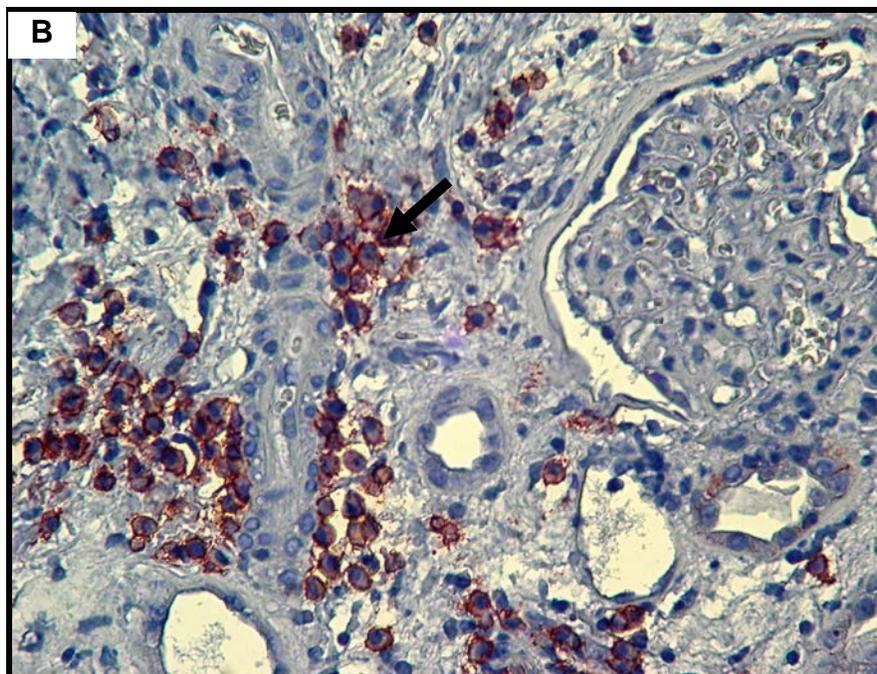
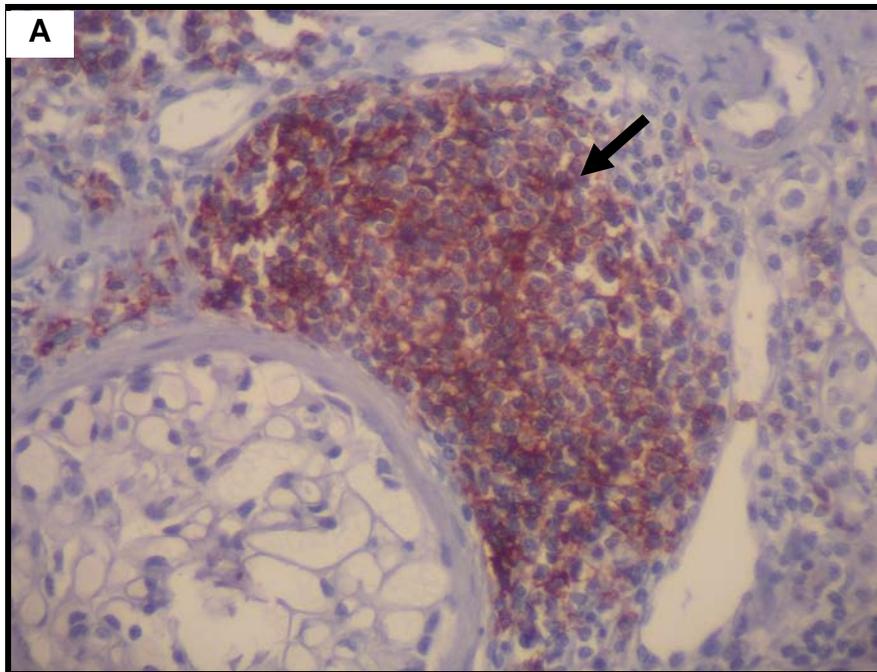


Figura 1. (A) Infiltrado túbulo-intersticial de localização periglomerular com distribuição nodular, constituindo um agregado de células B CD20<sup>+</sup> (aumento original 200x). (B) Infiltrado túbulo-intersticial de distribuição difusa constituído de plasmócitos CD138<sup>+</sup> (aumento original de 200x).

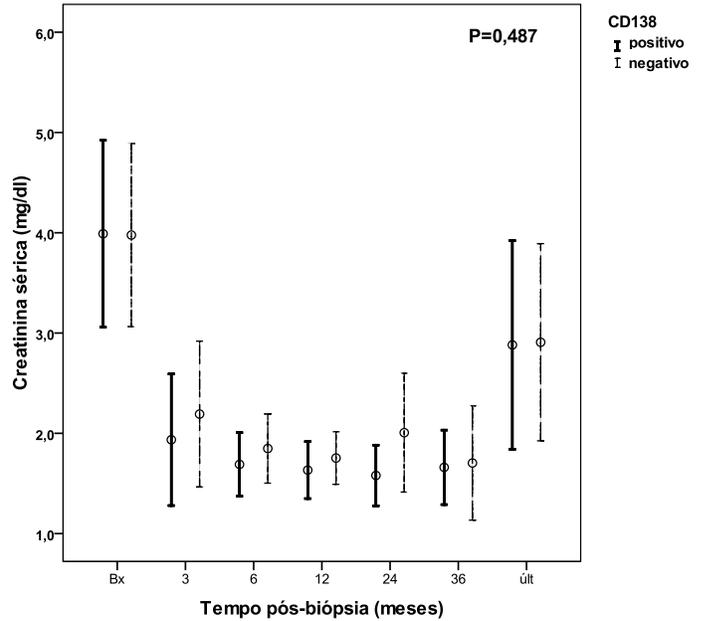
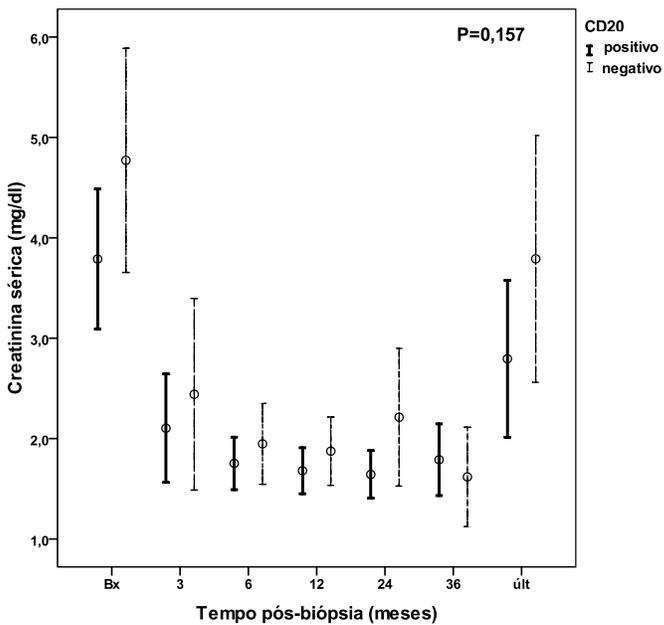
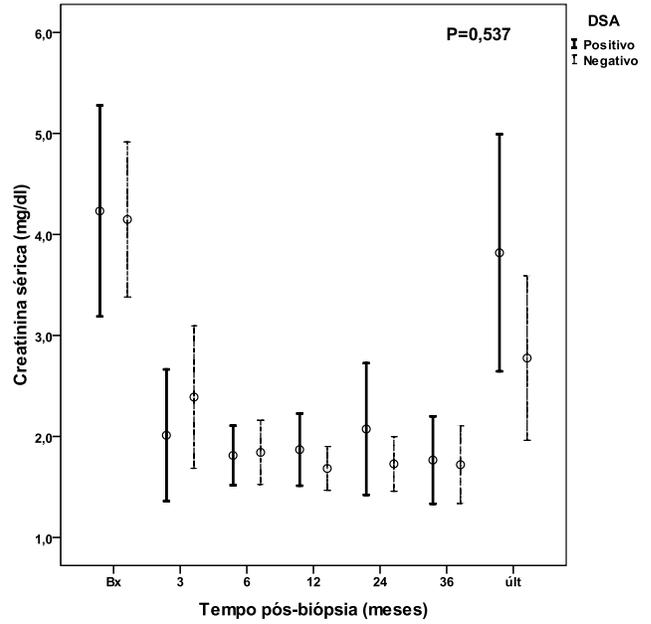
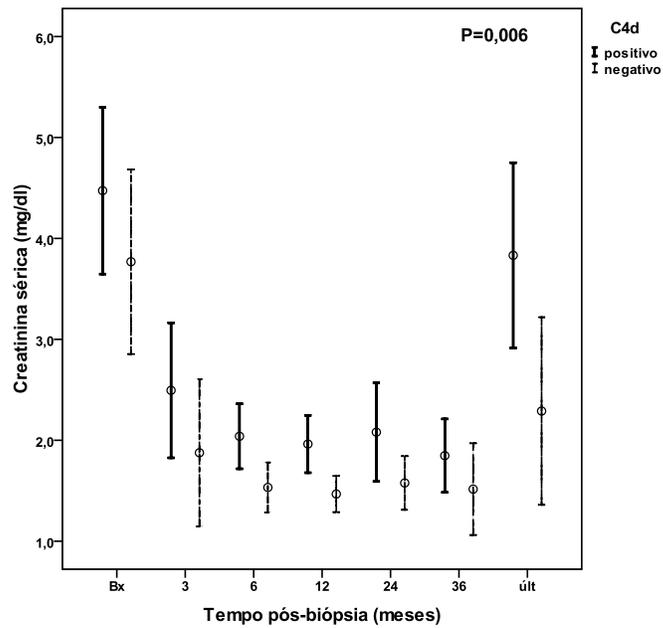
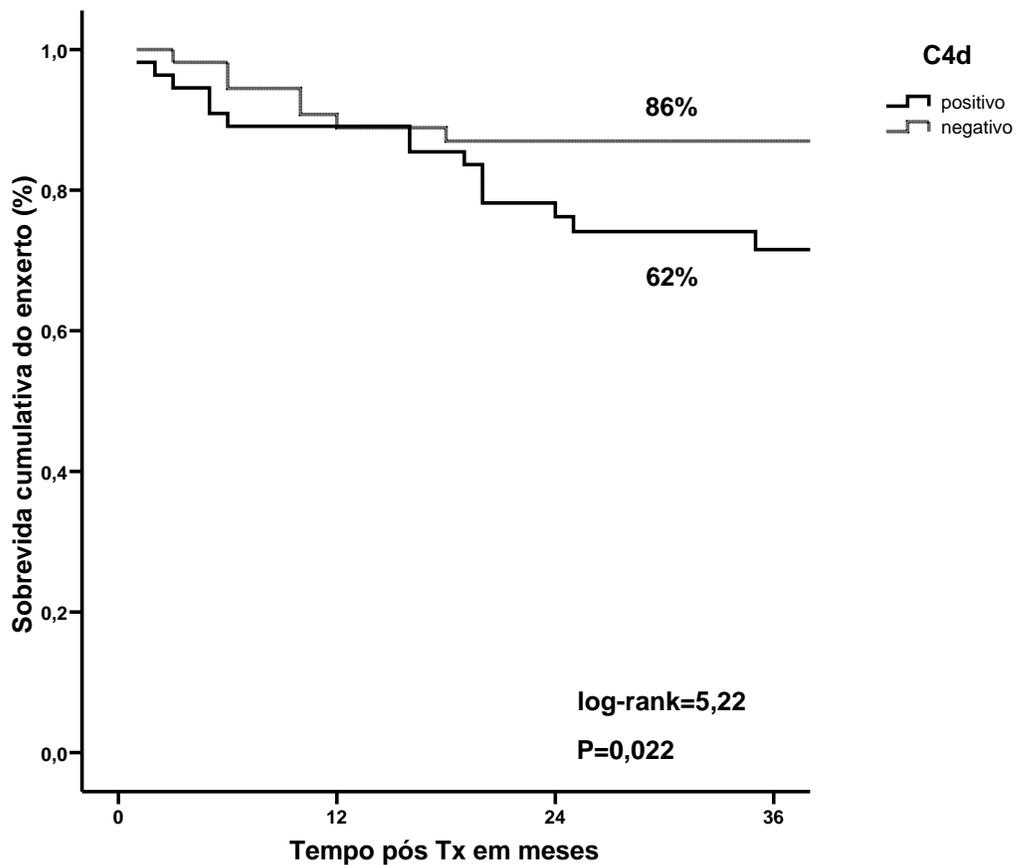


Figura 2. Evolução da creatinina sérica (mg/dl) do momento da biópsia do enxerto até o desfecho (média de tempo de seguimento: 33±16 meses) de acordo com positividade para C4d, DSA, CD20 e CD138.

(A)

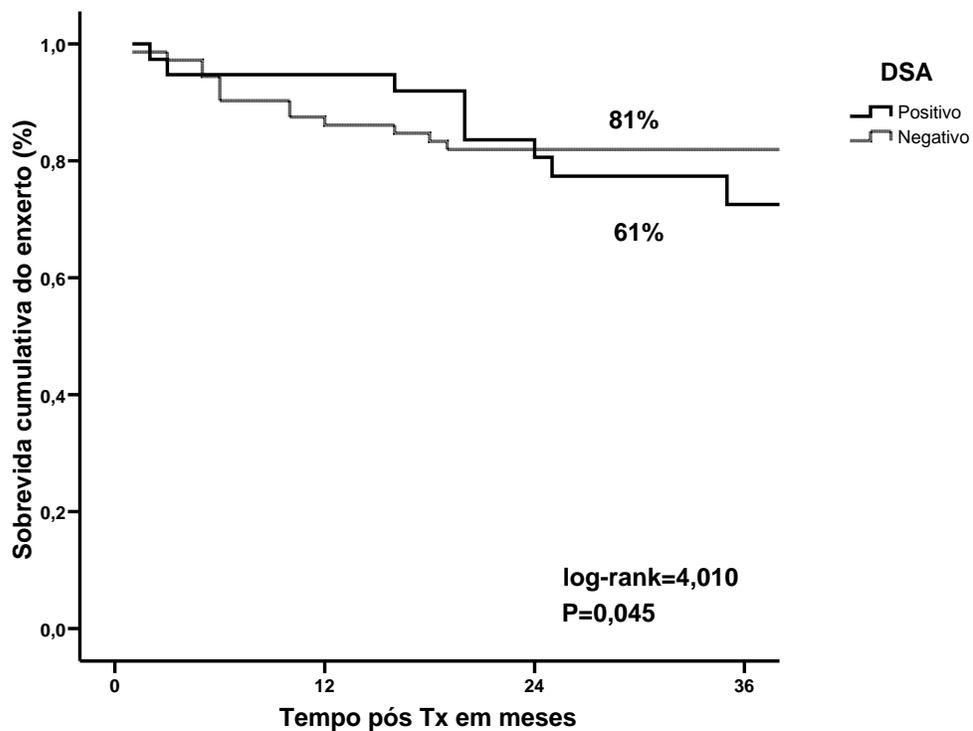


C4d positivo: n=55; eventos=21

C4d negativo: n=55; eventos=8

Número de casos (meses)	12	24	36
C4d positivo	48	39	19
C4d negativo	43	31	19

(B)



DSA positivo: n=38; eventos=15

DSA negativo: n=72; eventos=14

Número de casos (meses)	12	24	36
DSA positivo	34	26	13
DSA negativo	62	52	36

Figura 3. Sobrevida cumulativa do enxerto renal de acordo com a positividade para C4d (A) e DSA (B).



A presença da deposição de C4d em capilares peritubulares, associada às concentrações séricas detectáveis de anticorpo doador-específico em pacientes com disfunção do rim transplantado são critérios indispensáveis para o diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos. Os anticorpos anti-antígeno leucocitário humano (anti-HLA) previamente formados, e a produção *de novo* de anticorpos anti-HLA doador-específico constituem um grande desafio imunológico relacionado com rejeição e risco de perda do enxerto. As células B desempenham um papel chave na regulação do sistema imune através da ação como células apresentadoras de antígenos, cooperação com os linfócitos T e produção de anticorpos, contribuindo diretamente para o desenvolvimento da rejeição celular e/ou humoral. Historicamente, o foco principal das pesquisas sobre células B no transplante foi na fase final de diferenciação das células plasmáticas e seu papel na rejeição mediada por anticorpos, com a produção de DSA circulantes. Estudos recentes descrevem o papel anticorpo-independente das células B, devido à capacidade destas células secretarem citocinas e quimiocinas pró inflamatórias e participarem na apresentação de antígenos.

Neste cenário, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar a associação de marcadores imunológicos de rejeição, como o C4d, células CD20+, plasmócitos CD138+ e os anticorpos doador específicos com o diagnóstico histopatológico, a função e a sobrevida do aloenxerto em receptores de transplante renal. Os resultados do presente estudo permitem as seguintes considerações:

1. A fração do complemento C4d detectado por imunohistoquímica em biópsias do enxerto por indicação foi o único fator prognóstico dentre os analisados para pior função e sobrevida do enxerto renal em três anos de transplante.
2. Pacientes com DSA<sup>+</sup> circulantes pós transplante também apresentaram pior sobrevida do enxerto, mas a função renal no final do seguimento não diferiu do grupo sem rejeição ou daqueles com fibrose intersticial/atrofia tubular.
3. A positividade e a densidade dos linfócitos B CD20<sup>+</sup> no infiltrado celular das biópsias do enxerto por indicação não tiveram impacto sobre a evolução da função e sobrevida do enxerto renal.
4. A positividade e a densidade dos plasmócitos CD138<sup>+</sup> no infiltrado celular das biópsias do enxerto por indicação não tiveram impacto sobre a evolução da função e sobrevida do enxerto renal.
5. As células B predominaram na rejeição aguda celular, enquanto que o número de plasmócitos CD138<sup>+</sup> foi maior na rejeição mediada por anticorpos.
6. A presença de C4d nas biópsias correlacionou-se com a presença de DSA circulantes, assim como os DSA também se correlacionaram positiva e significativamente com plasmócitos CD138<sup>+</sup>.
7. Não houve correlação entre células CD20<sup>+</sup> e plasmócitos CD138<sup>+</sup> nas biópsias do enxerto.
8. A ausência de um ponto de corte pré estabelecido, a ser adotado para definir positividade para células B – tanto linfócitos CD20<sup>+</sup> quanto plasmócitos CD138<sup>+</sup> - na rejeição aguda do enxerto renal com disfunção pode ter

produzido um viés no presente estudo, impedindo uma análise de prognóstico mais acurada.



Anexo A. Protocolo de coleta de dados

DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E DO TRANSPLANTE RENAL:

Nome: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_  
Idade: \_\_\_\_\_ anos Sexo: ( )M ( )F Etnia: ( )B ( )P  
Data do transplante: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Data da biópsia do enxerto: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Doador: Falecido ( ) Vivo relacionado ( ) Vivo não relacionado ( )  
Limítrofe ( )  
HLA: A \_\_\_/\_\_\_ ; B \_\_\_/\_\_\_ ; Dr \_\_\_\_, \_\_\_\_\_

Receptor: HLA: A \_\_\_/\_\_\_ ; B \_\_\_/\_\_\_ ; Dr \_\_\_\_, \_\_\_\_\_  
Cross-matching: Pré Tx \_\_\_\_\_; Pós Tx: \_\_\_\_\_  
Anticorpos anti-HLA: Pós Tx: ( ) positivo ( ) negativo  
Especificidade: \_\_\_\_\_  
Infecção: CMV ( ) ; Hepatite B ( ) ; Hepatite C ( ) ; Polioma ( )  
Tempo de isquemia fria: \_\_\_\_\_  
Tempo de anastomose vascular: \_\_\_\_\_  
Gestações prévias: \_\_\_\_\_  
Transfusões sanguíneas: \_\_\_\_\_

Transplante:

DIE (diálise na primeira semana): ( ) Sim	( ) Não
Imunossupressão: Indução	Manutenção:
Basilixmab ( )	Prednisona ( )
AC Anti-linfocitário Policlonal ( )	MMF/MFS ( )
Globulina anti-timocitária ( )	Ciclosporina ( )
OKT3 ( )	Tocrolimus ( )
	Rapamicina ( )

Rejeição aguda clínica: ( ) Sim ( ) Não  
Banff: Suspeita RA ( ) IA ( ) IB ( ) IIA ( ) IIB ( ) III ( ) Humoral ( ) NTA ( )  
Toxicidade CYA: Tacro ( ) NCE I ( ) NCE II ( ) NCE III ( )  
Creatinina sérica (mg/dl): 6 meses: \_\_\_\_\_; 1 ano: \_\_\_\_\_; 2 anos: \_\_\_\_\_; 3  
anos: \_\_\_\_\_; última creatinina: \_\_\_\_\_

## Anexo B. Critérios morfológicos para a interpretação histopatológica de Banff 2007

### INTERPRETAÇÃO DA BIÓPSIA RENAL

Nome:

Nº Lamina:

AMOSTRA:

- Insatisfatória – menos de 7 glomérulos e sem artérias
- Marginal – 7 glomérulos e 1 artéria
- Adequada 10 ou mais glomérulos com pelo menos 2 artérias

TUBULITE:

- t0: Nenhuma célula mononuclear
- t1: 1 a 4 cels por secção tubular ( ou por 10 cels tubulares)
- t2: 5 a 10 cels por secção tubular
- t3: > 10 cels por secção tubular, ou presença de pelo menos 2 áreas de destruição da MTB acompanhada por i2/i3 e t2 em outro lugar da biópsia

ARTERITE:

- v0: Sem arterite
- v1: Leve a moderada arterite intimal ( com linfócitos/edema reduzindo o lúmen em < 25%) em pelo menos 1 corte
- v2: Severa arterite intimal com pelo menos 25% de redução luminal em pelo menos 1 corte
- v3: Arterite transmural e/ou alteração fibrinóide arterial e necrose muscular lisa da média com infiltrado linfócito no vaso.

\*Indica infarto ou hemorragia intersticial

INFLAMAÇÃO INTERSTICIAL:

- i0: Nenhuma ou < 10% infiltrado intersticial em parênquima não cicatrizado
- i1: 10 a 25% do parênquima inflamado
- i2: 26 a 50% do parênquima inflamado
- i3: > 50% do parênquima inflamado

\* Indica presença de > 10% de eosinófilos, neutrófilos ou céls plasmáticas (especificar qual)

GLOMERULITE:

- g0: Sem glomerulite
- g1: Glomerulite em menos de 25% dos glomérulos
- g2: Glomerulite segmentar ou global em 25 a 75% dos glomérulos
- g3: Glomerulite (basicamente global) em 75% dos glomérulos

ESPESSAMENTO HIALINO ARTERIOLAR

- ah0: Sem espessamento hialino PAS-positivo
- ah1: Leve a moderado espessamento hialino PAS-positivo em ao menos 1 arteríola
- ah2: Moderado a severo PAS- positivo espessamento hialino em mais de 1 arteríola
- ah3: Severo espessamento hialino em muitas artérias

AUMENTO DA MATRIZ MESANGIAL:

- ( ) mm0: sem aumento da matriz mesangial
- ( ) mm1: até 25% dos glomérulos não-escleróticos afetados (ao menos moderado aumento da matriz mesangial)
- ( ) mm2: 26 a 50% dos glomérulos não-escleróticos afetados (ao menos moderado aumento da matriz mesangial)
- ( ) mm3: mais de 50% dos glomérulos não-escleróticos afetados (ao menos moderado aumento da matriz mesangial)

CÉLULAS INFLAMATÓRIAS<sup>1</sup> EM CAPILARES PERITUBULARES:

- ( ) pct0: sem significativo infiltrado de céls inflamatórias
- ( ) pct1: cpt corticais com 3 a 4 céls inflamatórias lumbais
- ( ) pct2: cpt corticais com 5 a 10 céls inflamatórias lumbais
- ( ) pct3: cpt corticais com > 10 céls inflamatórias lumbais

<sup>1</sup>Neutrófilos (polimorfonucleares), mononucleares

Acrescentar o símbolo \* quando as céls forem somente linfócitos

CATEGORIA HISTOLGICA PELA CLASSIFICAÇÃO DE 2007:

Normal ( )

Rejeição mediada por anticorpos ( )

Suspeita de rejeição aguda mediada por células (*borderline*) ( )

Rejeição aguda celular: tipo IA( ) tipo IB ( ) tipo IIA( ) tipo IIB ( ) tipo III ( )

Fibrose Intersticial e atrofia tubular sem evidência de etiologia específica:

Grau I ( ) Grau II ( ) Grau III ( )

Arteriopatia crônica do enxerto ( )

Necrose tubular aguda ( )

Nefrotoxicidade por inibidor de calcineurina ( )