



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

RODRIGO FONTANIVE FRANCO

**AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DAS BIOPSIAS RENAIIS PROTOCOLARES EM  
RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL COM ALTO RISCO IMUNOLÓGICO**

Porto Alegre

2024

RODRIGO FONTANIVE FRANCO

**AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DAS BIÓPSIAS RENAIIS PROTOCOLARES EM  
RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL COM ALTO RISCO IMUNOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de  
Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul como requisito parcial para a obtenção do título  
de doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Dr. Roberto Ceratti Manfro

Porto Alegre

2024

Franco, Rodrigo Fontanive  
AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DAS BIÓPSIAS RENAIAS  
PROTOCOLARES EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL COM  
ALTO RISCO IMUNOLÓGICO / Rodrigo Fontanive Franco. --  
2024.  
90 f.  
Orientador: Roberto Ceratti Manfro.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2024.

1. Transplante Renal. 2. Biópsia. 3. Rejeição . 4.  
Fatores Imunológicos. I. Manfro, Roberto Ceratti,  
orient. II. Título.

RODRIGO FONTANIVE FRANCO

**AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DAS BIOPSIAS RENAIIS PROTOCOLARES EM  
RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL COM ALTO RISCO IMUNOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Médicas.

Aprovado em: 21 de fevereiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Alvaro Pacheco Silva

Universidade Federal de São Paulo

---

Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Dra. Maria Helena da Silva Pitombeira Rigatto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Dr. Odirlei André Monticielo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Dr. Roberto Ceratti Manfro

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*Trabalhar duro por algo com que não nos importamos é chamado de estresse; trabalhar duro por algo que amamos é chamado de paixão.*

*Simon Sinek*

## **Agradecimentos**

Ao Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de obtenção de minha formação acadêmica

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa da Diretoria de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela disponibilização dos recursos para a execução desse projeto.

Ao Serviço de Nefrologia Unidade de Transplante Renal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por permitir o acesso aos seus pacientes.

Ao Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro, pela oportunidade, ensinamentos, tempo dispensado em orientações, revisões e auxílio na elaboração deste trabalho.

À minha esposa, Jalusa e filho, João Pedro, pela compreensão e estímulo em continuar, apesar das adversidades.

Aos meus Pais, Carlos e Maria, pelo incentivo a buscar sempre meus objetivos.

Aos colegas que sempre me incentivaram a alcançar o meu objetivo.

## RESUMO

**Base Teórica:** A biópsia renal protocolar (BRP) é utilizada para detecção de alterações histopatológicas subclínicas do enxerto renal. Atualmente, com o avanço nas terapias imunossupressoras, a utilidade das BRP é questionada.

**Objetivos:** Avaliar se a realização de biópsias renais protocolares, no 3º mês pós-transplante, em pacientes considerados como de alto risco imunológico para perda do enxerto, levam a condutas que possam proporcionar melhora na função e na sobrevida dos rins transplantados neste grupo de pacientes.

**Métodos:** Estudo longitudinal, prospectivo e controlado, executado na Unidade de Transplante Renal do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, tendo o suporte do Serviço de Imunologia e do Serviço de Patologia do mesmo hospital. Foram realizadas biópsias protocolares na 12ª semana pós-transplante em pacientes de alto risco imunológico submetidos a transplante renal. Nos fragmentos de biópsia foram avaliados aspectos de agressão tecidual imunológica (rejeições celular e mediada por anticorpos). A amostra foi constituída por 105 pacientes considerados como de alto risco imunológico, definido pela presença de pelo menos um dos seguintes critérios: (a) prova cruzada por Citometria de Fluxo (CF) positiva para linfócitos T e/ou B pré-transplante, (b) reatividade calculada contra painel (cPRA) superior a 50% para antígenos de classe I e/ou II do HLA humano ou (c) presença de anticorpos contra antígenos HLA do doador no soro pré-transplante do receptor. Os pacientes foram divididos em 2 grupos, sendo um grupo submetido à biópsia e avaliação não invasiva e outro à avaliação não invasiva. Foram analisadas a incidência de alterações histológicas compatíveis com rejeição, no grupo submetido à biópsia, a taxa de filtração glomerular estimada (eTFG) pela equação CKD-EPI, proteinúria de 24 horas aos 6, 12, 18 e 24 meses após o transplante e a sobrevida dos enxertos até 24 meses de seguimento, comparativamente, nos dois grupos. Foram realizadas análises descritivas com cálculo da média e desvio padrão para variáveis quantitativas paramétricas, mediana e intervalo interquartil para variáveis não paramétricas, e frequência/percentual para variáveis categóricas.

Os dados longitudinais foram acompanhados até a perda do enxerto, óbito ou até 2 anos de seguimento. Empregamos a análise GEE (Generalized Estimating Equation) para comparar marcadores clínicos nos períodos de 6, 12, 18 e 24 meses entre os grupos.

Foram realizadas análises referentes aos dados do receptor, do doador e do transplante. Foi utilizado o teste do Qui-quadrado ou exato de Fisher para variáveis categóricas cruzadas, bem



como testes não paramétricos de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis, conforme apropriado.

Correlação de Spearman, foi utilizada para avaliação conjunta de variáveis quantitativas. O nível adotado para a significância estatística foi  $p < 0,05$ .

**Resultados:** Incluídos 53 pacientes no grupo biópsia e 52 no grupo controle. A demografia dos receptores, dos doadores e dados do transplante não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, exceto pela maior compatibilidade em locus DR no grupo controle. Quatorze biópsias (26,4%) apresentaram resultados alterados, entre eles, 9,4% apresentaram IFTA superior a 20%, 7,5% capilarite peritubular com C4d negativo, 5,7% esclerose glomerular e 3,8% nefropatia por Poliomavírus. Os resultados das biópsias não levaram a intervenções terapêuticas. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à sobrevida de enxertos e pacientes, na taxa de filtração glomerular ou na relação proteína/creatinina na urina no tempo de seguimento do estudo.

**Conclusão:** Concluimos que a realização de biópsias protocolares com os critérios utilizados no presente estudo para a definição de alto risco imunológico é útil na detecção precoce de alterações histológicas do enxerto mas de utilidade limitada em propiciar terapias que possam impactar positivamente a sobrevida do enxerto em médio e longo prazos.

**Palavras chave:** Transplante Renal, Biópsias protocolares, Rejeição Celular, Rejeição mediada por Anticorpos, Transplante Renal de Alto Risco Imunológico.

## ABSTRACT

**Background:** Protocol renal biopsy (PRB) is used to detect subclinical histopathological changes in the renal graft. Currently, with advances in immunosuppressive therapies, the usefulness of PRBs is questioned.

**Objectives:** To evaluate whether performing protocol kidney biopsies in the 3rd month post-transplant in patients considered to be at high immunological risk for graft loss leads to measures that can improve the survival of transplanted kidneys in this group of patients.

**Methods:** Longitudinal, prospective and controlled study, carried out at the Renal Transplant Unit of the Nephrology Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre with the support of the Immunology Service and the Pathology Service of the same hospital. Protocol biopsies were performed in the 12th week post-transplant in patients at high immunological risk undergoing kidney transplantation. Aspects of immunological tissue aggression (cellular and antibody-mediated rejections) were assessed in the biopsy fragments. The sample consisted of 105 patients considered to be at high immunological risk, defined by the presence of at least one of the following criteria: (a) crossmatch by Flow Cytometry (FC) positive for T and/or B lymphocytes pre-transplant, (b) calculated panel reactivity (cPRA) greater than 50% for human HLA class I and/or II antigens or (c) presence of antibodies against donor HLA antigens in the recipient's pre-transplant serum. Patients were divided into 2 groups, with one group undergoing biopsy and non-invasive evaluation and the other only undergoing non-invasive evaluation. The incidence of histological changes compatible with rejection were analyzed in the group undergoing biopsy, the estimated glomerular filtration rate (eGFR) by the CKD-EPI equation, 24-hour proteinuria at 6, 12, 18 and 24 months after transplantation and the graft survival up to 24 months of follow-up, comparatively, in both groups. Descriptive analyzes were performed with calculation of the mean and standard deviation for parametric quantitative variables, median and interquartile range for non-parametric variables, and frequency/percentage for categorical variables. Longitudinal data were followed until graft loss, death, or up to 2 years of follow-up. We used GEE (Generalized Estimating Equation) analysis to compare clinical markers at periods of 6, 12, 18 and 24 months between groups. Analyzes were carried out regarding recipient, donor and transplant data. The Chi-square test or Fisher's exact test was used for crossed categorical variables, as well as non-parametric Mann-Whitney tests or the Kruskal-Wallis test, as appropriate. Spearman correlation

was used to jointly evaluate quantitative variables. The level adopted for statistical significance was  $p < 0.05$ .

**Results:** Fifty three patients were included in the biopsy group and 52 in the control group. The demographics of recipients, donors and transplant data did not show significant differences between the groups, except for greater compatibility at the DR locus in the control group. Fourteen biopsies (26.4%) showed altered results, among them, 9.4% had IFTA greater than 20%, 7.5% peritubular capillaritis with negative C4d, 5.7% glomerular sclerosis and 3.8% polyomavirus nephropathy. Biopsy results did not lead to therapeutic interventions. There was no significant difference between the groups regarding graft and patient survival, glomerular filtration rate or urine protein/creatinine ratio during the study follow-up.

**Conclusion:** We conclude that performing protocol biopsies, with the definition of high immunological risk utilized in the present study, is useful in the early detection of histological changes in the graft but of limited usefulness in providing therapies that can positively impact graft survival in the medium and long term.

**Keywords:** Kidney Transplant, Protocol biopsies, Cellular Rejection, Antibody-mediated rejection, High Immunological Risk Kidney Transplantation.

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1** – Estratégia de busca de revisão bibliográfica, conforme objetivos do estudo.

**Figura 2** – Classificação de Banff 2019

**Figura 3** – Marco conceitual do estudo

**Figura 4** – Desenho do estudo

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HLA	Human Leucocyte Antigens
CF	Citometria de fluxo
cPRA	Reatividade Contra Painei Calculada
DSA	Anticorpos Anti-HLA específicos contra o doador do enxerto
DRC	Doença Renal Crônica
RSCA	Rejeição Subclínica Celular Aguda
IvIg	Imunoglobulina Humana Intravenosa
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
IFN $\gamma$	Interferon Gama
IFTA	Fibrose Intersticial e Atrofia Tubular
GEPs	Genes Expression Profiles
ddcfDNA	Donor derived cell free DNA
eTFG-CKD EPI	Taxa de Filtração Glomerular pela equação CKD – EPI
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
MFI	Intensidade Média de Fluorescência
PRA	Reatividade contra Painei
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
GEE	Generalized Estimating Equation

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>12</b>
<b>2. Revisão da Literatura</b> .....	<b>14</b>
<i>2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações</i> .....	<i>14</i>
<i>2.2. Revisão Bibliográfica</i> .....	<i>15</i>
<i>2.2.1. Contexto atual</i> .....	<i>15</i>
<i>2.2.2. Conceito</i> .....	<i>15</i>
<i>2.2.3. Histórico</i> .....	<i>16</i>
<i>2.2.4. A biópsia renal</i> .....	<i>17</i>
<i>2.2.5. Rejeição celular subclínica</i> .....	<i>17</i>
<i>2.2.6. Rejeição subclínica mediada por anticorpos</i> .....	<i>20</i>
<i>2.2.7. Métodos “não invasivos” de detecção de rejeição</i> .....	<i>24</i>
<b>3. Marco Conceitual do Estudo</b> .....	<b>29</b>
<b>4. Justificativa</b> .....	<b>30</b>
<b>5. Objetivos</b> .....	<b>31</b>
<i>5.1. Objetivo primário</i> .....	<i>31</i>
<i>5.2. Objetivos secundários</i> .....	<i>31</i>
<b>6. Materiais e Métodos</b> .....	<b>32</b>
<i>6.1. Desenho do estudo</i> .....	<i>32</i>
<i>6.2. Local de realização e período de alocação</i> .....	<i>32</i>
<i>6.3. Participantes</i> .....	<i>32</i>
<i>6.3.1. Critérios de inclusão</i> .....	<i>32</i>
<i>6.3.2. Critérios de exclusão</i> .....	<i>33</i>
<i>6.3.3. Origem e método de seleção dos pacientes</i> .....	<i>33</i>
<i>6.4. Variáveis</i> .....	<i>33</i>
<i>6.4.1. Desfechos estudados</i> .....	<i>33</i>
<i>6.4.2. Exposições</i> .....	<i>34</i>
<i>6.5. Métodos</i> .....	<i>34</i>
<i>6.5.1. Análises Histopatológicas</i> .....	<i>34</i>
<i>6.5.2. Análises Imunohistoquímicas</i> .....	<i>35</i>
<i>6.5.3. Análise dos Anticorpos Anti-HLA</i> .....	<i>35</i>
<i>6.5.3.1. Anticorpos Anti-HLA</i> .....	<i>35</i>
<i>6.5.3.2. Reatividade contra painel (PRA)</i> .....	<i>36</i>
<i>6.6. Viés</i> .....	<i>36</i>

<b>6.7. Tamanho da Amostra</b> .....	<b>37</b>
<b>6.8. Análise Estatística</b> .....	<b>37</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>38</b>
<b>8. Artigo</b> .....	<b>48</b>
<b>9. Considerações Finais</b> .....	<b>81</b>
<b>10. Perspectivas Futuras</b> .....	<b>82</b>
<b>11. Anexos e/ou Apêndices</b> .....	<b>83</b>
<i>11.1. Strobe Statement</i> .....	<i>83</i>
<i>11.2. Comprovante de submissão à Revista “American Journal of Transplantation”</i> .....	<i>85</i>
<i>11.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i> .....	<i>88</i>

# 1.INTRODUÇÃO

O transplante renal é o tratamento de escolha para uma significativa porção dos pacientes com perda crônica terminal da função renal (1). No Brasil, atualmente, são realizados em torno de 5000 transplantes renais, em sua maioria com órgãos de doadores falecidos (2). Na última década a incorporação de novas tecnologias para a avaliação pré-transplante tornou possível que se estratifique com maior precisão os riscos imunológicos ao sucesso dos transplantes. Calcula-se que em torno de 30 a 40% dos receptores de rins de doadores falecidos sejam de alto risco. As tipagens moleculares dos antígenos HLA (*Human Leucocyte Antigens*), tecnologias de provas cruzadas por citometria de fluxo (CF) e avaliação da presença de anticorpos anti-HLA pelo teste de reatividade contra painel calculada (cPRA), assim como, e principalmente, a presença no soro do receptor do transplante de anticorpos anti-HLA (DSAs) específicos do doador, permitem que esses pacientes sejam classificados em diferentes extratos de risco imunológico, quais sejam: (a) altíssimo risco (pacientes dessensibilizados); (b) alto risco (provas cruzadas positivas por CF, cPRA elevado e presença de DSAs); (c) risco padrão (sem nenhuma das condições prévias) e (d) baixo risco (receptores HLA-idênticos e idosos) (3,4).

As biópsias protocolares de transplantes renais foram utilizadas por diversos centros de excelência nas décadas de 1990 e 2000. Projetos prévios do grupo de pesquisa em Nefrologia e Transplante Renal na Universidade Federal do Rio Grande do Sul contemplaram a avaliação prospectiva das biópsias dos enxertos renais (5–8) e o desenvolvimento de estratégias não invasivas para o diagnóstico da rejeição de transplantes renais em situações onde este diagnóstico é muito difícil e trabalhoso. Resultantes dos projetos foram publicados artigos em importantes revistas da especialidade (9–12). Nesse período uma elevada incidência de rejeições sub-clínicas foi evidenciada por essa abordagem. A seguir, a utilização dos potentes regimes imunossupressores contemporâneos tornou as biópsias protocolares pouco úteis. No entanto, essa baixa utilidade clínica das biópsias protocolares foi evidenciada em estudos que excluíram pacientes de alto risco imunológico e as recomendações das diretrizes em realizarem-se biópsias protocolares em pacientes de alto risco é apenas intuitiva, não tendo sido testada em estudos clínicos (13–16).

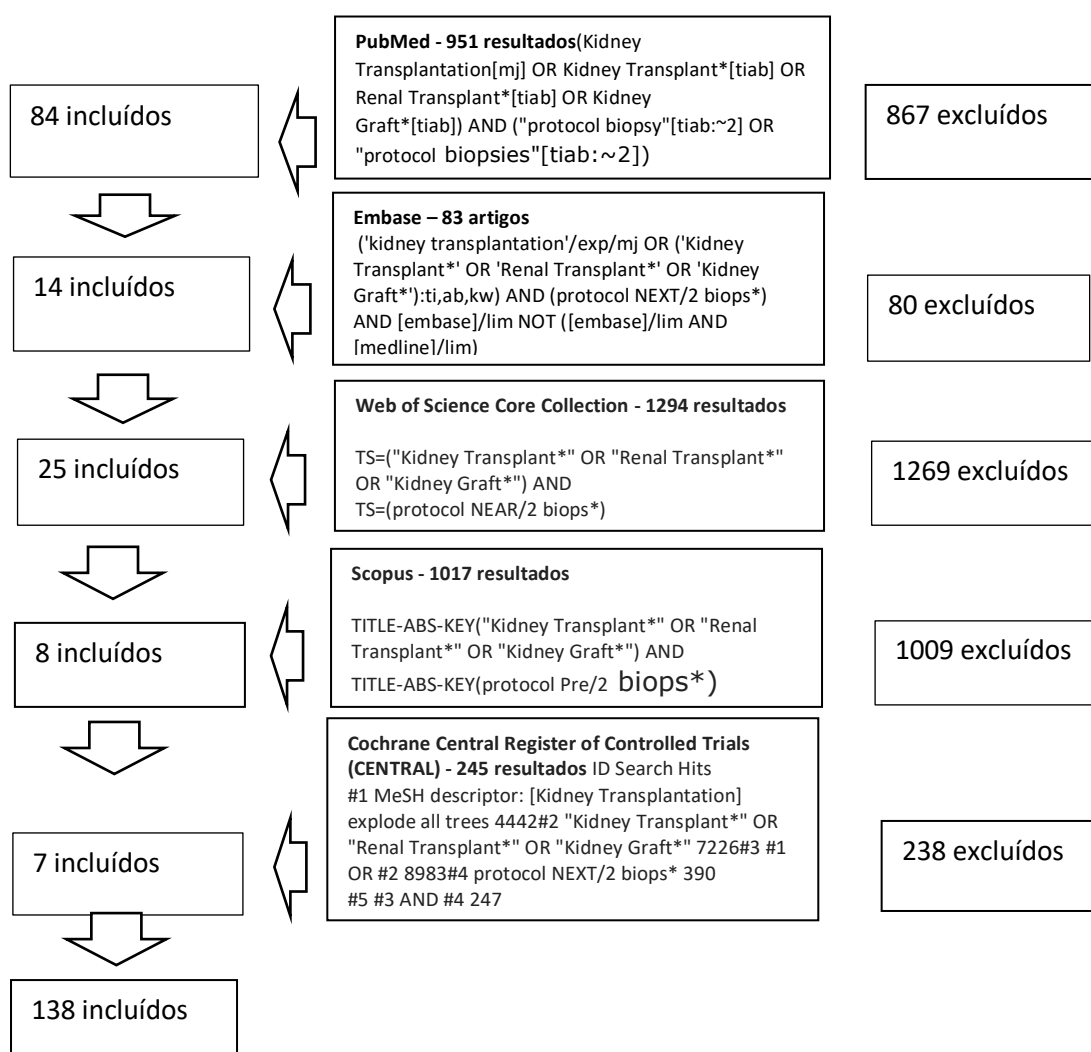


Dessa forma concebemos esse estudo com o objetivo de testar a utilidade das biópsias protocolares em uma coorte de pacientes transplantados renais de elevado risco imunológico.

## 2.REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1.Estratégias para localizar e selecionar as informações

A revisão da literatura foi realizada com o objetivo de atualizar o conhecimento sobre a realização de biopsias renais protocolares desde o início da sua realização, com relatos desde a década de 1980 mas, principalmente, a partir da década de 1990 até a atualidade. A estratégia de busca envolveu os seguintes bancos de dados: Pubmed/Medline, Scopus, Web of Science, Embase (Elsevier) e Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL). Foram realizadas buscas através da combinação dos seguintes termos: “Kidney Transplantation”, “Kidney Transplant”, “Renal Transplant”, “Kidney Graft”, “Protocol Biopsy” e “Protocol Biopsies”, conforme a figura 1.



**Figura 1:** Estratégia de busca de revisão bibliográfica, conforme objetivos do estudo.

## **2.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.2.1. Contexto atual**

Atualmente, a doença renal crônica (DRC) é patologia com elevada incidência e prevalência (17,18). Dentre suas causas mais frequentes, podemos citar o Diabetes Melito, a Hipertensão Arterial Sistêmica, as glomerulopatias, as doenças císticas renais, dentre outras (19). Para os pacientes com falência irreversível da função renal, apresentam-se como opções terapêuticas a terapia dialítica e o transplante renal.

O transplante renal é atualmente o tratamento que proporciona a melhor sobrevida e qualidade de vida para o paciente com DRC (1,20). O avanço na descoberta de novas terapias imunossupressoras, o melhor entendimento sobre os mecanismos de rejeição e as descobertas recentes na imunobiologia dos transplantes, com novos processos para tipificação dos antígenos HLA e identificação e quantificação dos anticorpos anti-HLA, contribuíram fundamentalmente para esse resultado (3,21–23). Como consequência destes avanços, houve uma expressiva melhora da sobrevida de pacientes e enxertos entre o primeiro e o quinto anos pós-transplante (24,25), o que não se identificou, entretanto, nos desfechos de longo prazo (26).

Dentre as causas de perda do enxerto renal, estão as rejeições, tanto as mediadas por anticorpos (humorais) como celulares, glomerulopatias, recorrentes ou *de novo*, fibrose intersticial e atrofia tubular, infecção por Polioma vírus e outras menos frequentes (27–29). A contribuição exata dos episódios de rejeição, celulares ou humorais, agudas ou crônicas, não está claramente estabelecida na literatura mas é, possivelmente, substancial, principalmente se levarmos em consideração que muitos dos casos de atrofia tubular e fibrose intersticial (IFTA) e glomerulopatia do transplante estão associados a eventos imunológicos (30).

### **2.2.2. Conceito**

Consideram-se episódios de rejeição aguda clinicamente manifestos a deterioração na taxa de filtração glomerular associada a alterações histológicas específicas no material de biópsia do enxerto renal (31,32). Sua ocorrência determina uma piora do prognóstico da sobrevida do enxerto renal (33,34).

Rejeição subclínica se caracteriza pela presença de alterações histológicas características de rejeição aguda no material de biópsia renal na ausência de deterioração na função renal,

podendo ser aguda ou crônica, celular ou humoral. O diagnóstico se dá apenas através de biópsias protocolares. (30,35).

### **2.2.3. Histórico**

A presença de infiltrados inflamatórios em biópsias renais de pacientes com função renal estável foi descrita inicialmente em estudos da década de 1980 (36,37), sendo observado que a persistência do infiltrado inflamatório era associado ao desenvolvimento de fibrose intersticial e perda do enxerto (37). Na década de 1990, Rush e colaboradores iniciaram uma série de estudos com biópsias protocolares, baseados no achado de IFTA severa em um paciente com função renal estável, submetido a uma biópsia por indicação, realizada antes da perda do enxerto. Com base neles, os autores, além de cunharem o termo “rejeição subclínica”, comprovam a significativa frequência de achados histológicos compatíveis com rejeição celular em pacientes com função renal estável, submetidos ao regime de imunossupressão da época, baseado em corticosteroide, Azatioprina e Ciclosporina e afirmam a importância da realização de biópsias de protocolo para pesquisa destas alterações (35,38–40). Outros autores também documentaram a importância da realização de biópsias de protocolo para detecção de alterações histológicas com possibilidade de impacto na sobrevida dos enxertos (41–44). Estudos subsequentes demonstraram que o tratamento das alterações subclínicas resultavam em redução dos episódios de rejeição aguda, reduziam a ocorrência de IFTA e proporcionavam melhor função e sobrevida dos rins transplantados, corroborando a importância da realização de biópsias protocolares em pacientes submetidos a esquema de imunossupressão baseado no uso de Ciclosporina (45,46).

O surgimento da preparação “Neoral” de Ciclosporina e a introdução de Micofenolato Mofetil em substituição à Azatioprina levaram a uma redução no número de episódios de rejeições precoces (47,48) sem, no entanto, melhorar a sobrevida dos enxertos em 3 anos (48), comprovação justificada pelo achado de que esta mudança no esquema de imunossupressão não tinha efeito na redução da frequência de rejeição subclínica entre 1 e 6 meses e que a realização de biópsias protocolares ainda tinha importância uma vez que a detecção e tratamento das alterações subclínicas tinha impacto positivo na sobrevida dos transplantes renais (45,49).

A substituição da Ciclosporina por Tacrolimus trouxe impacto significativo na redução da ocorrência de rejeições subclínicas (50–52). A incidência de rejeição subclínica varia entre 2,6 e 25%, dentro do primeiro ano, em pacientes sob regime de imunossupressão composto por Tacrolimus e Micofenolato, sendo influenciada também pelo grau de incompatibilidades (*mismatches*) dos antígenos HLA, momento em que a biópsia de protocolo é realizada, uso de

terapia de indução com anticorpos policlonais e terapia imunossupressora de manutenção (53–55) tornando questionável a realização de biópsias protocolares em todos os pacientes, principalmente os com risco imunológico baixo ou padrão. A conversão de tratamento imunossupressor de manutenção com retirada do inibidor de calcineurina (Tacrolimus ou Ciclosporina) e introdução de medicamentos inibidores da mTOR (Sirolimo ou Everolimo) resultou em um aumento na incidência de rejeição celular subclínica aguda e no surgimento de anticorpos específicos contra antígenos HLA do doador “*de novo*” em diferentes estudos (56,57).

Atualmente, as opiniões da comunidade científica se direcionam à realização de biópsias de protocolo principalmente nos pacientes com alto risco imunológico não havendo, entretanto, estudos clínicos randomizados que demonstrem a necessidade de sua realização (30,40,58–61).

#### **2.2.4. A biópsia renal**

As biópsias renais percutâneas dos enxertos renais são procedimentos seguros. Os dados atuais apontam para uma baixa taxa de complicações maiores associadas à realização da biópsia renal, variando entre 0,4 e 1%. Pacientes anticoagulados, aqueles com rins intra-abdominais, rins pediátricos em bloco e receptores obesos apresentam maior risco de complicações (33,62). Entretanto, a reprodutibilidade das biópsias protocolares tem sido questionada e na avaliação dos seus resultados e da sua utilidade clínica, devem ser considerados, a alta variabilidade inter-observador, o momento no curso do transplante em que a biópsia protocolar é realizada e a utilização de terapia de indução com anticorpos depletadores de linfócitos, que modulam o sistema imune por tempo mais prolongado (5,63,64).

#### **2.2.5. Rejeição celular subclínica**

Assim como na rejeição celular aguda, a rejeição celular subclínica é uma resposta aloimune, onde antígenos do doador são levados por células dendríticas (apresentadoras de antígenos) às células T do receptor via 3 diferentes vias (direta, indireta e semidireta), levando à ativação destas na presença de sinais de co-estimulação, à sua diferenciação em subtipos como Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras e à liberação de citocinas (30,65). A presença de células T reguladoras para FoxP3<sup>+</sup> parece exercer um papel protetor do enxerto. Isto é sugerido pela observação de que, mesmo na presença de IFTA, a sobrevida em longo prazo do enxerto se

aproxima daquela que se observa em enxertos sem rejeição subclínica (66,67). Por outro lado a presença de macrófagos no infiltrado se correlaciona a rejeição clínica e ao desenvolvimento de fibrose intersticial (68–71). Vários estudos apontam para a importância do diagnóstico e tratamento dos episódios de rejeição aguda subclínica para garantir melhor sobrevida dos enxertos (34,72,73), e o significado da infiltração celular presente em biópsias protocolares ainda foi alvo de diversas investigações (14,74,75). O mesmo pode ser dito em relação a presença de infiltrados limítrofes (*borderline*) nos quais a ausência de tratamento está associada à maior incidência de fibrose e atrofia tubular, ocorrência de rejeições celulares, maior taxa de desenvolvimento de DSA “de novo” e piora na sobrevida de enxertos e pacientes (76). A análise da expressão gênica, nestas situações, poderá contribuir para um melhor entendimento sobre os mecanismos atuantes em cada situação e seu manejo específico (77,78).

A presença de incompatibilidade no locus HLA-DR parece ter correlação direta com a ocorrência de rejeição subclínica. Estudos demonstram que o risco da presença de alterações subclínicas em biópsias protocolares aumenta conforme o grau de incompatibilidade neste locus (53,79). Também a ocorrência de incompatibilidade em locus DQ está associado à ocorrência aumentada de rejeição subclínica (80,81). Entretanto a incidência de rejeição associada a incompatibilidade em DQ sofre influência do grau de incompatibilidade em locus DR (80). Adicionalmente, Pacientes com incompatibilidade em locus DR/DQ teriam um maior risco de desenvolvimento de DSA *de novo* com níveis de Tacrolimus inferiores a 5 ng/mL (82). Conforme os critérios de Banff (83), as alterações histológicas encontradas nas biópsias com rejeição celular subclínica, variam de *Borderline* a Banff IA/IB. Banff IIA ou graus maiores de rejeição são relativamente raros em pacientes com rejeição subclínica. Isso provavelmente se deva ao fato de que graus histológicos mais severos de rejeição, e, portanto, de agressão ao enxerto, determinem com maior frequência alterações de função renal, o que em geral leva à realização de uma biópsia por indicação. Como consequência, a principal terapia para o manejo dos casos de rejeição celular subclínica são os corticosteroides. O uso de agentes depletadores, como timoglobulina, seriam reservados para os menos frequentes e mais severos casos envolvendo arterite ou tubulite “t3” (30).

Um sumário da classificação Banff (83) em uso atualmente encontra-se na Figura 2 abaixo.

## **Figura 2 - Classificação de Banff 2019**

**Categoria 1: Biópsia normal ou alterações inespecíficas**

## **Categoria 2: Alterações mediadas por anticorpos**

Rejeição Mediada por Anticorpos ativa: Todos os 3 critérios devem ser preenchidos para o diagnóstico

1. Evidência histológica de lesão tecidual aguda, incluindo 1 ou mais dos seguintes:
  - Inflamação microvascular ( $g > 0$  e/ou  $ptc > 0$ ), na ausência de inflamação recorrente ou glomerulonefrite de novo, embora na presença de TCMR aguda, infiltrado limítrofe, ou infecção,  $ptc \geq 1$  sozinho não é suficiente e  $g$  deve ser  $\geq 1$
  - Arterite intimal ou transmural ( $v > 0$ )<sup>b</sup>
  - Microangiopatia trombótica aguda, na ausência de qualquer outra causa
  - Lesão tubular aguda, na ausência de qualquer outra causa aparente
2. Evidência de interação atual/recente de anticorpos com o endotélio vascular, incluindo 1 ou mais dos seguintes:
  - Coloração linear de C4d em capilares peritubulares ou vasa recta medular (C4d2 ou C4d3 por FI em secções congeladas ou C4d  $> 0$  por IHQ em secções em parafina)
  - Inflamação microvascular pelo menos moderada ( $[g + ptc] \geq 2$ ) na ausência de recidiva ou glomerulonefrite de novo, embora na presença de TCMR aguda, limítrofe infiltrado, ou infecção,  $ptc \geq 2$  sozinho não é suficiente e  $g$  deve ser  $\geq 1$
  - Expressão aumentada de transcritos/classificadores gênicos no tecido da biópsia fortemente associada à rejeição mediada por anticorpos, se validada minuciosamente
3. Evidência sorológica de anticorpos específicos do doador circulante (DSA para HLA ou outros antígenos). Coloração C4d ou expressão de transcritos/classificadores validados conforme observado acima no critério 2 pode substituir o DSA; no entanto, testes de DSA completos, incluindo o teste para anticorpos não-HLA se o teste de anticorpos HLA for negativo é fortemente recomendado sempre que os critérios 1 e 2 forem preenchidos

Rejeição Mediada por Anticorpos crônica ativa: Todos os 3 critérios devem ser preenchidos para o diagnóstico

1. Evidência morfológica de lesão tecidual crônica, incluindo 1 ou mais dos seguintes: Glomerulopatia de transplante ( $cg > 0$ ) se não houver evidência de MAT crônica ou crônica recorrente/de novo glomerulonefrite; inclui alterações evidentes apenas pela microscopia eletrônica (ME) (CG1A) Multicamadas graves da membrana basal capilar peritubular ( $ptcml1$ ; requer ME) Fibrose intimal arterial de início recente, excluindo outras causas; leucócitos dentro da íntima esclerótica favorece a rejeição mediada por anticorpos crônica se não houver história prévia de rejeição mediada por células T, mas não são obrigatórios
2. Idêntico ao critério 2 para a rejeição mediada por anticorpos ativa, acima
3. Idêntico ao critério 3 para a rejeição mediada por anticorpos ativa, acima, incluindo forte recomendação para teste de DSA sempre que os critérios 1 e 2 forem atendidos. **Biópsias que preenchem o critério 1, mas não o critério 2, com evidência atual ou prévia de DSA (pós-transplante) pode ser declarada como mostrando rejeição mediada por anticorpos crônica, no entanto o DSA remoto não deve ser considerado para o diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos crônica ativa ou ativa**

ABMR crônica (inativa)

1.  $CG > 0$  e/ou PTCML grave (PTCML1)
2. Ausência do critério 2 de interação de anticorpos corrente/recente com o endotélio
3. Diagnóstico prévio documentado de rejeição mediada por anticorpos ativa ou crônica ativa e/ou prévia evidência documentada de DSA

Coloração C4d sem evidência de rejeição: Todas as 4 características devem estar presentes para o diagnóstico<sup>c</sup>

1. Coloração linear de C4d em capilares peritubulares (C4d2 ou C4d3 por IF em cortes congelados, ou C4d  $> 0$  por IHC em secções de parafina)
2. Critério 1 para rejeição mediada por anticorpos ativa ou crônica não preenchida
3. Não há evidência molecular para a rejeição mediada por anticorpos, como no critério 2 para rejeição mediada por anticorpos ativa e crônica ativa
4. Sem rejeição mediada por anticorpos aguda ou crônica ativa, ou alterações borderline

## **Categoria 3: Borderline (Suspeito) para rejeição mediada por Células T aguda**

Focos de tubulite (t1, t2 ou t3) com inflamação intersticial leve (I1) ou tubulite **leve (T1) com inflamação intersticial moderada-grave (I2 ou I3)**

Sem arterite intimal ou transmural ( $v = 0$ )

#### **Categoria 4: Rejeição mediada por Células T**

Rejeição mediada por Células T aguda

Grau IA: Inflamação intersticial envolvendo >25% do parênquima cortical não esclerótico (I2 ou I3) com tubulite moderada (T2) envolvendo 1 ou mais túbulos, não incluindo túbulos gravemente atrofícos<sup>d</sup>

Grau IB: Inflamação intersticial envolvendo >25% do parênquima cortical não esclerótico (I2 ou I3) com tubulite grave (T3) envolvendo 1 ou mais túbulos, não incluindo túbulos que são severamente atrofícos<sup>d</sup>

Grau IIA: arterite intimal leve a moderada (v1), com ou sem inflamação intersticial e/ou tubulite

Grau IIB: Arterite intimal grave (v2), com ou sem inflamação intersticial e/ou tubulite

Grau III: Arterite transmural e/ou necrose fibrinoide arterial envolvendo a região medial Músculo liso com arterite intimal de células mononucleares (V3) associada, com ou sem inflamação intersticial e/ou tubulite

Rejeição mediada por Células T crônica ativa<sup>e</sup>

Grau IA: Inflamação intersticial envolvendo >25% do parênquima cortical esclerótico (i-IFTA2 ou i-IFTA3) E > 25% do parênquima cortical total (ti2 ou ti3) com tubulite moderada (t2 ou **t-IFTA2**) envolvendo 1 ou mais túbulos, não incluindo túbulos gravemente atrofícos<sup>d</sup>; outras causas conhecidas de i-IFTA devem ser excluídas

Grau IB: Inflamação intersticial envolvendo >25% do parênquima cortical esclerótico (i-IFTA2 ou i-IFTA3) E > 25% do parênquima cortical total (ti2 ou ti3) com tubulite grave (t3 ou **t-IFTA3**) envolvendo 1 ou mais túbulos, não incluindo túbulos gravemente atrofícos<sup>d</sup>; outras causas conhecidas de i-IFTA devem ser excluídas

Grau II: Arteriopatia crônica do enxerto (fibrose intimal arterial com mononúcleo inflamação celular na fibrose e formação da neointima). Isso também pode ser uma manifestação de rejeição mediada por anticorpos crônica ativa ou crônica ou rejeição mediada por anticorpos/rejeição mediada por Células T mista

#### **Categoria 5: nefropatia por poliomavírus<sup>f</sup>**

PVN Classe 1

PVL 1 e CI 0-1

PVN Classe 2

pvl 1 e ci 2-3 OU

pvl 2 e ci 0-3 OU

pvl 3 e ci 0-1

PVN Classe 3

PVL 3 e CI 2-3

<sup>a</sup> Os escores individuais das lesões de Banff estão definidos na Tabela 5, recomendando-se que sejam incluídos no laudo da biópsia.

<sup>b</sup> Deve-se notar que essas lesões arteriais podem ser indicativas de rejeição mediada por anticorpos, rejeição mediada por Células T ou mista mediada por anticorpos/mediada por Células T. As lesões em "V" e a arteriopatia crônica do enxerto são pontuadas apenas em artérias com média contínua com camadas de músculo liso  $\geq 2$ .

<sup>c</sup> A significância clínica desses achados pode ser bastante diferente nos enxertos expostos aos anticorpos anti-grupo sanguíneo (aloenxertos ABO-incompatíveis), onde não aparecem ser prejudicial ao enxerto e pode representar acomodação. No entanto, com anti-HLA anticorpos, tais lesões podem evoluir para rejeição mediada por anticorpos crônica, e mais dados de desfecho são necessários.

<sup>d</sup> Os túbulos severamente atrofícos são definidos como tendo cada uma das 3 características: diâmetro <25% de túbulos não afetados ou minimamente afetados na mesma biópsia, um epitélio com aspecto indiferenciado, cuboidal ou achatado e enrugamento e/ou espessamento pronunciada da membrana basal tubular.

<sup>e</sup> Foi sentido pela maioria dos participantes da reunião de Banff 2019 que o relato de rejeição mediada por Células T crônica ativa deve ser acompanhada por um segundo diagnóstico de rejeição mediada por Células T Borderline ou aguda (com grau adequado) quando os critérios para ambos os diagnósticos são preenchidos.

<sup>f</sup> Uma amostra adequada para tal pontuação deve incluir 2 biópsias e conter medula. A NPV pode coexistir com a rejeição mediada por anticorpos ou com a rejeição mediada por Células T graus 2 ou 3.

Extraído de Loupy, The Banff 2019 Kidney Meeting Report, American Journal of Transplantation, 2020.



## 2.2.6. Rejeição Subclínica mediada por anticorpos

As rejeições mediadas por anticorpos estão entre as principais causas de perda de enxerto, sendo muito associadas a episódios de não-aderência a terapia imunossupressora (27,28). Nesta situação, observa-se a presença de anticorpos específicos contra antígenos HLA do doador um elemento diagnóstico da rejeição humoral, embora a mesma também possa ser diagnosticada na ausência detectável de tais anticorpos (84–87). Observa-se uma correlação entre a ocorrência de rejeição subclínica celular aguda (RSCA) e o surgimento de DSA, podendo ocorrer simultaneamente ou com formação de anticorpos logo antes ou depois da ocorrência de RSCA (30,64,88,89). A rejeição humoral subclínica é definida na classificação de Banff pela presença de lesão tecidual, evidência de interação recente ou atual entre anticorpos e endotélio e presença de anticorpos específicos contra os antígenos HLA do doador ou outros antígenos (83)

A ocorrência de disfunção do enxerto e/ou proteinúria superior a 500 mg/24, na concomitância dos critérios acima descritos leva ao diagnóstico da rejeição mediada por anticorpos. Entretanto, na ausência das manifestações clínicas, este diagnóstico somente pode ser feito através de biópsias de protocolo, as quais são em geral realizadas em centros transplantadores que utilizam protocolos de dessensibilização pré-transplante ou quando existe DSA pré-transplante conhecido. A realização de biópsias nos pacientes após a detecção do surgimento de DSA “*de novo*” é uma prática menos rotineira, de qualquer maneira, nesta situação, a biópsia passaria à ser classificada como biópsia “por indicação” e não “protocolar” (58). Entretanto, a presença de alterações histopatológicas compatíveis com rejeição humoral é grande neste grupo de pacientes mesmo naqueles com função renal estável (90). As rejeições humorais subclínicas podem ser classificadas em: (a) Tipo 1, quando associadas à presença de DSA pré-transplante e, (b) Tipo 2, quando há formação de DSA “*de novo*”, após o transplante. As rejeições tipo 1 se associam mais à presença de DSA de classe I, estão menos relacionadas a episódios de rejeição celular e à detecção de lesões de cronicidade na biópsia, ocorrem mais cedo e carregam um prognóstico melhor que as do tipo 2, as quais estão mais associadas a anticorpos de classe II e a episódios de rejeição celular, em geral com mais lesões crônicas na biópsia, com ocorrência mais tardia e com pior prognóstico do que as do tipo 1 (91,92). A presença de alterações inflamatórias em biópsias de protocolo realizadas aos 3 meses pós-transplante, é um fator de mau prognóstico para o desenvolvimento de padrão histológico compatível com rejeição mediada por anticorpos crônica-ativa (93).

Vários estudos demonstram a presença significativa de rejeição humoral subclínica em pacientes com DSA pré-transplante em biópsias de protocolo realizadas em diferentes períodos pós-transplante. Gloor e colaboradores encontraram cerca de 22% de alterações compatíveis com glomerulopatia do transplante (cg) em pacientes transplantados com prova-cruzada (*cross-match*) positivo em relação a pacientes transplantados com incompatibilidade ABO e pacientes com risco imunológico convencional (94). Hass e cols analisaram 34 pacientes dessensibilizados pré-transplante, entre estes, dez realizaram biópsias entre oito e 363 dias pós transplante. Tais biópsias apresentaram achados de rejeição humoral subclínica. Biópsias de seguimento, realizadas cerca de um ano após a primeira, mostraram frequência de alterações associadas a cronicidade, pelos critérios de Banff, significativamente maiores do que nos 24 pacientes que não tiveram rejeição humoral subclínica diagnosticada (52). Lerut e colaboradores acompanharam 53 pacientes com biópsias protocolares realizadas no 3º mês e 1 ano pós-transplante, sendo que capilarite peritubular foi identificada em 5. Destes, 3 apresentaram critérios histológicos de rejeição humoral crônica nas biópsias de 1 ano, sugerindo que a presença desta alteração em biópsias protocolares no 3º mês pós-transplante pode ser um fator preditivo importante para o desenvolvimento de lesões histológicas crônicas (95). Loupy e colaboradores compararam 54 pacientes com DSA pré-transplante, dessensibilizados no momento do transplante com Imunoglobulina Humana intravenosa (IVIG) com ou sem Rituximab, com 84 pacientes sem DSA. Biópsias de protocolo realizadas no 3º mês pós-transplante mostraram, entre os pacientes com DSA positivo, 31% com rejeição humoral subclínica C4d<sup>+</sup> e 49% C4d<sup>-</sup>. Os pacientes com rejeição mediada por anticorpos subclínica apresentaram maior frequência de lesões de cronicidade, pelos critérios de Banff, em biópsias de seguimento realizadas 1 ano após o transplante, tendo também apresentado menor taxa de filtração glomerular e presença de DSA contra antígenos HLA de classe II com maior MFI do que os pacientes sem rejeição (96). Orandi et al. compararam 77 pacientes com rejeição mediada por anticorpos subclínica (70 com DSA pré-transplante e 7 com incompatibilidade ABO) submetidos a biópsia em um tempo médio de 29 dias pós-transplante, com 142 pacientes com rejeição humoral clínica e 2097 controles sem rejeição. Os pacientes com rejeição humoral subclínica tiveram risco relativo de perda de enxerto em 5 anos de 2,15 vezes quando comparado ao grupo sem rejeição mas não diferente do grupo com rejeição humoral clínica. Ainda, os pacientes com rejeição subclínica tratados tiveram um risco de perda de enxerto não diferente dos pacientes do grupo controle (97). Contrariamente, Senev et al. analisaram 924 pacientes transplantados, dos quais 107 apresentavam DSA pré-transplante. Destes, 56 tiveram resolução do DSA mesmo sem tratamento. Os pacientes nos quais o DSA persistiu foram principalmente aqueles com MFI mais alto e os com anticorpos anti-DQ. A sobrevida dos enxertos em 10 anos

foi significativamente menor naqueles pacientes nos quais houve persistência do DSA, comparado aos pacientes nos quais houve desaparecimento do DSA ou naqueles sem DSA prévio. A presença de rejeição humoral subclínica nos pacientes com resolução espontânea do DSA não determinou impacto na sobrevida dos enxertos, sugerindo que seria a persistência do DSA pré-transplante e não a detecção de rejeição o fator com maior influência na perda de enxerto (86).

Do ponto de vista do manejo terapêutico, permanece sob investigação a indicação de terapia para redução de anticorpos, usualmente com plasmaferese associada à infusão de imunoglobulina humana, para o tratamento de rejeição humoral subclínica, especialmente com DSA preexistente, o qual pode ter suas taxas reduzidas espontaneamente. Se os títulos do DSA prévio estiverem aumentando e há presença inquestionável de inflamação microvascular e outras injúrias teciduais, a recomendação seria de iniciar tratamento parece mais justificada (58).

O surgimento “*de novo*” de anticorpo específico contra os antígenos HLA do doador constitui fator de risco importante para o aparecimento de inflamação microvascular e redução da sobrevida do enxerto. O grau de incompatibilidade no locus DR e má-aderência ao tratamento, com desenvolvimento de rejeição celular aguda são fatores prognósticos importantes para o desenvolvimento “*de novo*” de DSA (88,98,99). Dados da literatura apontam para a importância da realização de biópsias logo após a detecção de novos anticorpos anti-HLA do doador e cerca de um ano após, devido à elevada frequência da detecção de rejeição humoral subclínica nestes pacientes associada ou não à presença de rejeição celular aguda, com impacto importante na sobrevida do enxerto devido à progressão muitas vezes rápida para lesões crônicas, conforme os critérios de Banff (83,100–102). Importante assinalar que nem todos os anticorpos específicos contra a tipagem HLA do doador, detectados após o transplante, são deletérios (103). Fatores como título, MFI máximo ou a soma dos MFI dos anticorpos, capacidade de fixação do complemento, classe, e locus do antígeno, especificidade, força e subclasse de IgG são elementos que influenciam na capacidade do anticorpo em desencadear o processo inflamatório endovascular (3,104–106). Novamente, do ponto de vista terapêutico, não se indica tratamento quando uma rejeição humoral subclínica crônica ou crônica-ativa é encontrada, devendo-se avaliar a aderência ao tratamento. A concomitância de rejeição celular deve ser tratada, especialmente se há formação de novo DSA (58).

A presença de alterações histológicas compatíveis com rejeição mediada por anticorpos na ausência de DSA detectável gera controvérsia na literatura. Sablik et al. avaliaram 41 pacientes com glomerulopatia do transplante em biópsias por indicação, 17 com DSA positivo e 24 sem,

não havendo diferença significativa entre os grupos quanto aos achados histológicos, condições clínicas de base, perda de função e sobrevida do enxerto (85). Parajulli et al. compararam 25 pacientes com rejeição humoral sem DSA com 155 com DSA e rejeição e 228 com DSA mas sem rejeição. Os autores não observaram diferenças entre os grupos com e sem DSA mas com rejeição e ambos tiveram desempenho pior em termos de taxa de filtração glomerular e sobrevida do enxerto quando comparados aos pacientes com DSA mas sem rejeição (84). Entretanto, Senev e colaboradores estudaram 208 pacientes com diagnóstico de rejeição humoral por biópsia, sendo que 45% dessas eram protocolares. Destes, 123 não apresentavam DSA detectável e tiveram sobrevida do enxerto similar aos controles sem rejeição e significativamente melhor do que os pacientes com DSA detectável (86). Callemeyn et al, em estudo multicêntrico, encontraram 26 pacientes sem DSA, dentre 56 pacientes com rejeição mediada por anticorpos biopsiados, sendo 35,7% dos casos por protocolo. Apesar de não haver diferença entre os grupos em relação à expressão gênica pela análise de RNA e ao infiltrado leucocitário presente nas amostras, o grupo de pacientes com DSA apresentou risco significativamente maior de perda do enxerto (107).

Estudos prévios sugerem que anticorpos contra antígenos não-HLA também possam contribuir para desenvolvimento de rejeição com redução na sobrevida do enxerto. Chamados usualmente de anticorpos anti-células endoteliais, poderiam causar lesão sozinhos ou em associação com anticorpos anti-HLA. Podem se desenvolver antes ou após o transplante e os antígenos correspondentes são expressos no endotélio do aloenxerto. Podem ser polimórficos e capazes de desencadear uma resposta aloimune como as proteínas A e B relacionadas à cadeia do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) classe I (MICA e MICB), glutathione-S-transferase T1 e queratina 1. Eles também podem ser não-polimórficos (autoantígenos), incluindo o receptor tipo 1 da Angiotensina II, vimentina, agrina e peroxisomal-trans-2-enoyl-coenzima A redutase. Ainda não há consenso na literatura sobre o papel dos anticorpos não-HLA no desenvolvimento de rejeição humoral ou sobre a necessidade de início de tratamento visando redução dos títulos destes anticorpos durante episódios de rejeição aguda, principalmente quando não há DSA detectado (108,109). Também existem relatos de resultados de estudos genômicos avaliando a associação de polimorfismos de nucleotídeos únicos não sinônimos (nsSNPs) envolvendo proteínas não-HLA com desfechos do enxerto renal. Os anticorpos contra muitos antígenos não-polimórficos tem sido considerado auto-anticorpos. Entretanto, quando nsSNPs e seus epítomos resultantes são expressos no tecido do doador mas ausentes no receptor, eles podem atuar como aloantígenos e seus respectivos anticorpos, aloanticorpos. Estudos demonstram que

incompatibilidades (*mismatches*) de aminoácidos de proteínas transmembrana estão associados a taxas de filtração glomerular menores (58,110,111).

### **2.2.7. Métodos “não invasivos” de detecção de rejeição:**

Vários métodos não invasivos tem sido testados objetivando o diagnóstico de episódios de rejeição clínica ou subclínica bem como sua monitorização após tratamento sem necessidade de biópsia. Tais métodos incluem biomarcadores moleculares, análise da expressão gênica no sangue, urina ou no tecido, biomarcadores proteômicos séricos e a pesquisa de fragmentos do DNA do doador no sangue do receptor.

A pesquisa e amplificação de mRNA como miR-21 e Granzima A, a determinação dos níveis de quimiocinas como CXCL 9 e CXCL 10 e a pesquisa e quantificação de metabólitos na urina, tem sido associados a episódios de rejeição celular aguda ou subclínica, rejeição mediada por anticorpos, ainda que subclínica, infecção por poliovírus e presença de tubulite mesmo subclínica. O uso desta ferramenta ainda necessita comprovação com estudo prospectivo multicêntrico com grande número de pacientes para sua validação e uso em pacientes com suspeita de rejeição celular subclínica (30,77,112–118).

A avaliação da expressão gênica, usando testes moleculares no sangue ou no tecido renal tem sido estudada para aprimorar a detecção da rejeição. Lipman e colaboradores observaram aumento da expressão de genes de ativação imune em biópsias de pacientes com rejeição borderline e aguda subclínicas (119). Aquino-Dias e colaboradores demonstraram elevada correlação da expressão gênica nos compartimentos sangue, urina e tecido renal de pacientes em disfunção inicial do enxerto renal (9). Sarwal et al identificaram, em pacientes com disfunção do enxerto, através da análise da expressão gênica, ao menos 3 subtipos distintos de rejeição aguda que, embora indistinguíveis do ponto de vista histológico, tinham marcadas diferenças na ativação imunológica e na proliferação celular, sendo que a análise imuno-histoquímica demonstrou associação entre um denso infiltrado de células B CD 20+ e resistência clínica a glicocorticóides e perda de enxerto (120). Hrubá e colaboradores analisaram a expressão gênica em tecido renal de 28 pacientes biopsiados por indicação e protocolarmente aos 3 meses pós-transplante, encontrando diferenças na expressão gênica entre pacientes com alterações clínicas e subclínicas apesar do mesmo aspecto histológico de rejeição *borderline* (121). Desvaux et al. em uma análise de 43 biópsias de enxertos renais, quantificaram a expressão de mRNA para Granzima B, Fas ligante, interferon gama e interleucinas 4 e 6, mostrando que a expressão do gene da Granzima B provou ser confiável na detecção de rejeição aguda, tanto quanto a avaliação histológica e que a

quantificação simultânea aumentada do mRNA para Fas ligante se associa a piores desfechos (122). Hoffmann e colaboradores demonstraram que a expressão gênica em pacientes com rejeição subclínica era semelhante ao dos com rejeição clínica mas expressos em menor grau (123). Roedder et al. relataram que a análise da expressão de um conjunto de 17 genes através da realização de RT-PCR em sangue poderia prever o desenvolvimento de rejeição aguda até 3 meses antes da detecção por biópsia (124). Crespo e colaboradores obtiveram maior capacidade preditiva da ocorrência de rejeição subclínica celular e humoral em biópsias protocolares no 6º mês pós-transplante quando foi utilizada a análise da expressão de um conjunto de 17 genes juntamente com o teste ELISPOT (*donor reactive enzyme linked immunosorbent spot*) para interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (125). Einecke et al. analisaram a expressão de um conjunto de 30 genes em 105 biópsias renais realizadas por disfunção ou proteinúria em pacientes com um tempo de transplante entre 1 e 31 anos. Os genes associados à falência do enxerto eram relacionados à injúria tecidual, remodelamento e desdiferenciação epitelial com pequena sobreposição aos genes associados à rejeição. Os autores sugerem que o escore de risco molecular proposto seria superior aos achados histopatológicos e laboratoriais para predição de perda de enxerto (126). O'Connell e colaboradores analisaram a expressão gênica em 159 biópsias realizadas protocolarmente no 3ª mês pós-transplante e correlacionaram com o desenvolvimento de lesões histopatológicas de cronicidade em biópsias realizadas aos 12 meses, conseguindo identificar um conjunto de 13 genes associados ao desenvolvimento de fibrose, o que possibilitaria a identificação dos pacientes com maior risco de perda de enxerto aos 3 meses seguidos ao transplante, sem lesões histológicas de cronicidade e com possibilidade de mudança na terapia imunossupressora na tentativa de evitar a evolução para fibrose (127). Ainda, a análise da expressão gênica em pacientes com alterações *borderline* e variados graus de fibrose em tecido íntegro ou fibrótico pode auxiliar na identificação daqueles pacientes com maior risco de progressão para perda do enxerto (78). Os pacientes com rejeição subclínica teriam um perfil de transcrição gênica de injúria imunológica de menor magnitude do que os pacientes com rejeição clínica (128) e mesmo pacientes sem diagnóstico de rejeição pelos critérios atuais, clínico e histopatológico, podem apresentar transcritos moleculares sugestivos de rejeição (129). Também, pela avaliação do perfil molecular, foi observado por Modena et al., que a maioria das 81 biópsias que mostravam fibrose intersticial e atrofia tubular (IFTA) de um total de 234 analisadas, apresentavam injúria imune mediada em andamento ou rejeição crônica que foram detectadas de forma mais sensível pela análise da expressão gênica. Esse perfil molecular das biópsias se correlacionou com perda futura do enxerto mesmo em biópsias sem inflamação histológica (130).

O estudo de “*Genes Expression Profiles – GEPs*”, ou seja, a determinação do perfil da expressão gênica em amostras de sangue periférico é outra ferramenta não invasiva que está em desenvolvimento. Friedewald e colaboradores correlacionaram a expressão gênica em amostras de sangue periférico pareadas com a realização de biópsias de protocolo. A análise demonstrou um alto valor preditivo negativo e um valor preditivo positivo menor, o que possibilitaria a não realização de biópsias protocolares em pacientes com risco baixo por esta análise (131). Christakoudi et al. analisaram a expressão de 22 genes associados a rejeição celular em amostras de sangue periférico. Sinais moleculares da rejeição celular foram identificados cerca de 7 semanas antes da disfunção e da decorrente biópsia diagnóstica (132).

Zhang e colaboradores identificaram um conjunto de 17 genes cuja expressão detectada em amostras de sangue periférico apresentou forte correlação com a presença de rejeição subclínica em biópsias protocolares realizadas aos 3 meses pós-transplante, identificando pacientes com alto risco para rejeições clínicas mais tardias e perda do enxerto (133). Van Loon et al analisaram a expressão de um conjunto de oito genes em sangue periférico que demonstrou boa acurácia diagnóstica para rejeição mediada por anticorpos tanto previamente quanto durante o episódio de rejeição, no primeiro ano pós transplante ou mais tardiamente (134).

A presença de níveis elevados de Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) avaliada pela técnica ELISPOT tem sido associada a episódios de rejeição. Pacientes com baixa frequência de células produtoras de IFN-  $\gamma$  no período pós-transplante imediato seriam geralmente livres de episódios de rejeição aguda e exibiriam excelente função aos 6 e aos 12 meses enquanto níveis elevados de reatividade precoce, inclusive pré-transplante, avaliados por este método indicariam um maior risco de disfunção crônica do enxerto (135,136). Entretanto, o teste ELISPOT para rejeição de transplante não foi padronizado e permanece um teste que demanda intenso trabalho. Portanto, a utilidade do ELISPOT na prática clínica permanece questionável e não tem sido correlacionado com rejeição subclínica (30).

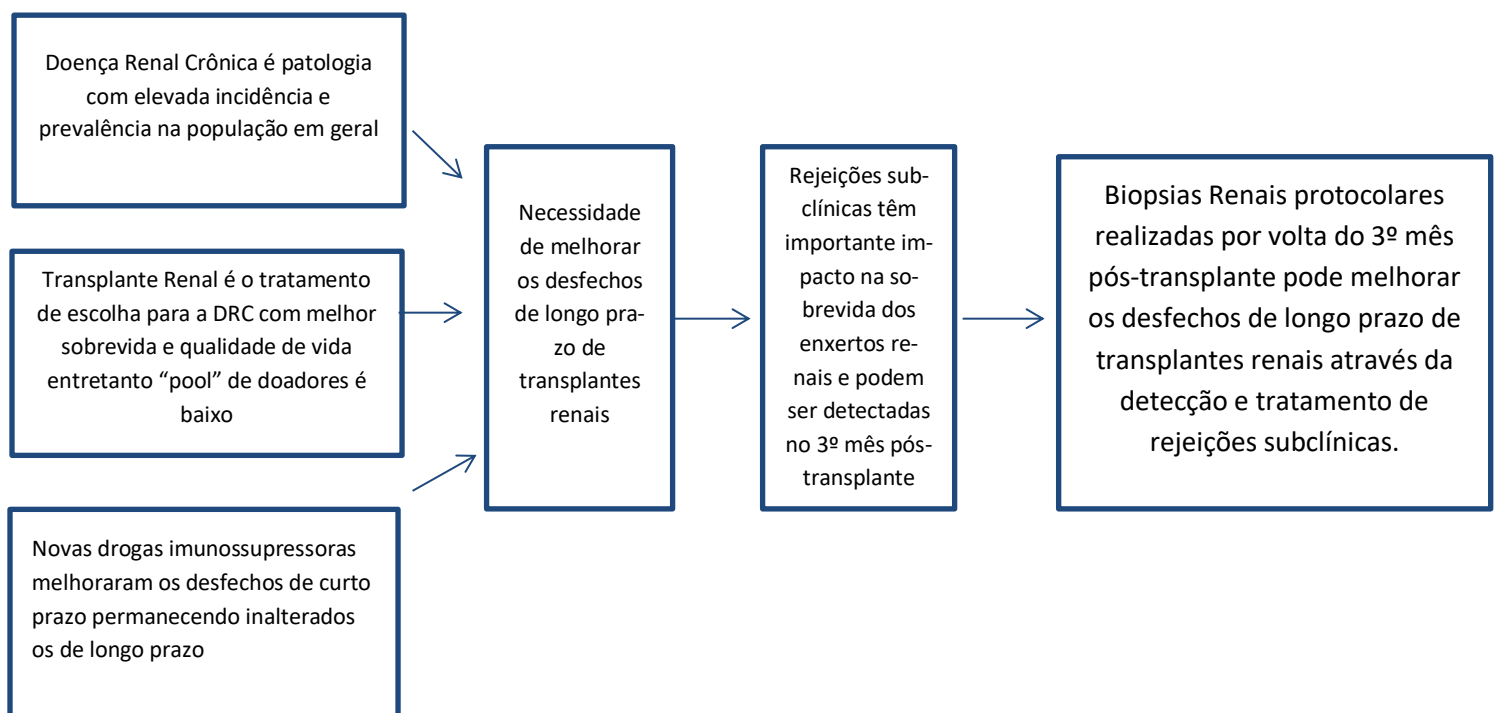
A detecção de DNA livre, derivado do doador, “*donor derived cell free DNA (ddcfDNA)*” em sangue ou urina é outra opção que se apresenta para diagnóstico não invasivo de rejeição, inclusive subclínica. É possível diferenciar ddcfDNA do DNA livre proveniente do receptor em sangue e urina sem a necessidade de genotipagem tanto do receptor quanto do doador. Elevados níveis de ddcfDNA traduzem injúria ao enxerto renal que pode ser secundário a episódios de rejeição, infecção, necrose tubular aguda mas também pode ser encontrado em pacientes estáveis com histologia normal. Sua sensibilidade é maior para rejeição mediada por anticorpos e níveis

normais não afastam, mas diminuem a probabilidade de rejeição celular. A monitorização de pacientes estáveis pode permitir a detecção precoce de rejeição subclínica mas a eficácia desta abordagem ainda permanece por ser determinada. Níveis normais não devem evitar a realização de biópsias protocolares programadas. Embora essa técnica seja utilizada na rotina clínica, em especial no Estados Unidos, a sua validação em estudos clínicos controlados e randomizados robustos é necessária para a avaliação mais segura da aplicabilidade e do custo benefício desta técnica no contexto da rejeição, especialmente levando-se em consideração o seu elevado custo de realização (137,138).

Portanto, no momento atual, na prática assistencial e mesmo na pesquisa translacional ou clínica, a biópsia renal continua sendo o padrão-ouro para o diagnóstico das causas de disfunção dos enxertos renais. Os métodos não invasivos de alto valor preditivo podem, no momento, ser utilizados para diminuir a frequência das biópsias em determinados contextos e conjuntamente com as informações fornecidas pela biópsia, serem utilizados para o melhor entendimento dos processos em andamento no rim transplantado.



### 3.MARCO CONCEITUAL DO ESTUDO



**Figura 3.** Marco conceitual do estudo.

## **4. JUSTIFICATIVA**

Em face da utilidade das biópsias protocolares em estudos prévios, ao substancial encurtamento de sobrevida e perda de função de enxertos observados em pacientes de alto risco imunológico, e ao fato de que tais pacientes não terem sido incluídos de forma representativa em estudos que empregaram biópsias protocolares, torna-se importante estudar seu papel em uma coorte de pacientes com alto risco e avaliar o impacto, nos desfechos relacionados à função e sobrevida dos transplantes, que o conhecimento e tratamento dos achados que as biópsias renais protocolares possam proporcionar.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo primário**

Avaliar a incidência de rejeições sub-clínicas, celulares e mediadas por anticorpos, em biópsias protocolares realizadas em pacientes de elevado risco imunológico, submetidos a transplante renal.

### **5.2. Objetivos secundários**

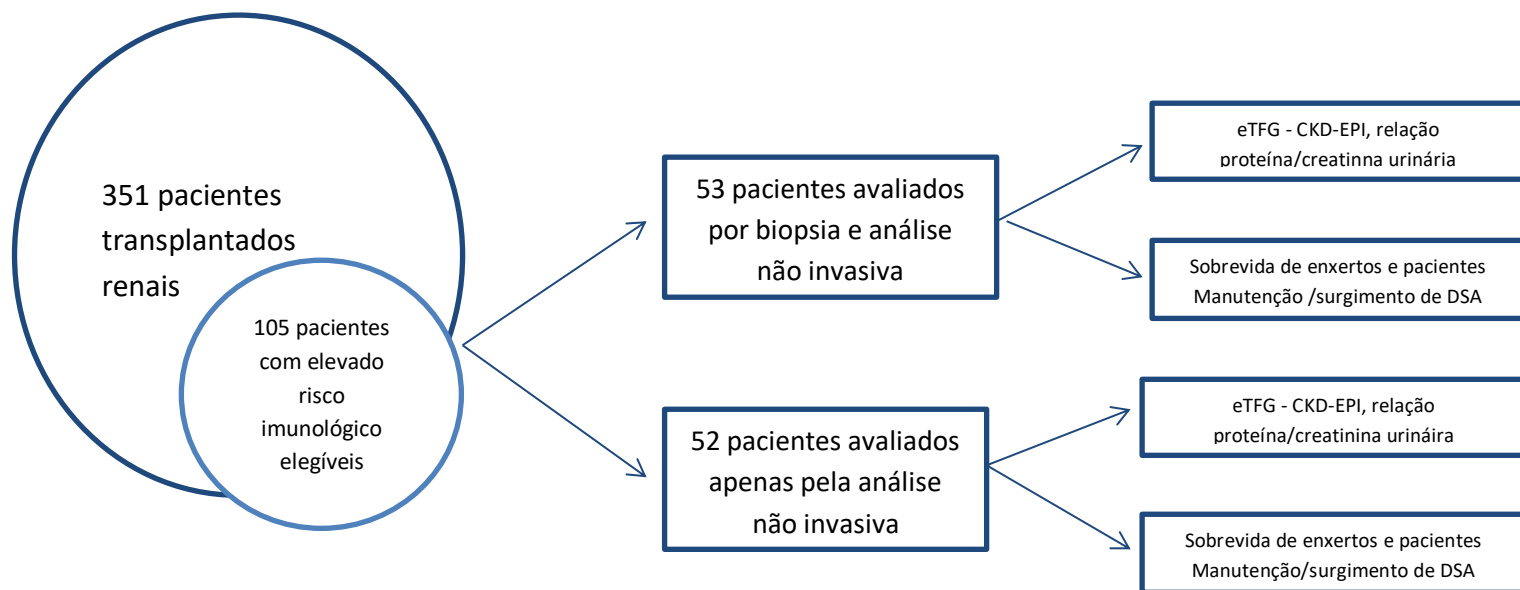
-Avaliar se os achados das biópsias protocolares levam a procedimentos terapêuticos que visem à preservação dos enxertos renais;

-Avaliar se as intervenções decorrentes das informações advindas das biópsias protocolares resultam em melhores desfechos dos enxertos em termos de taxas de filtração glomerular, proteinúria e sobrevida de enxertos.

## 6.MATERIAIS E MÉTODOS

**6.1. Desenho do Estudo:** Estudo longitudinal, prospectivo e controlado.

**Figura 4. Desenho do estudo.**



**6.2. Local de realização e período de alocação:** Serviço de Nefrologia, Unidade de Transplante Renal e Serviços de Imunologia e Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram incluídos pacientes considerados como de alto risco imunológico transplantados submetidos a transplante renal no período entre maio de 2018 e setembro de 2022, seguidos por 2 anos ou até Junho de 2023. Os dados foram coletados nos meses de Junho e Julho de 2023.

**6.3. Participantes:**

**6.3.1 Critérios de Inclusão:**

- Transplantados renais adultos, com elevado risco imunológico, que consentam em participar do estudo, pela assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). O alto risco imunológico é definido por:

(a) Prova cruzada pré-transplante para linfócitos T positiva por citometria de fluxo (desvio de canais superior a 62);

(b) Prova cruzada pré-transplante para linfócitos B positiva por citometria de fluxo (desvio de canais superior a 112);

(c) Reatividade calculada contra painel superior a 50% em classe I e/ou classe II;

(d) Presença, no soro pré-transplante, de anticorpos anti-HLA do doador, de classe I e/ou II com intensidade e fluorescência superior a 1000.

### **6.3.2. Critérios de Exclusão:**

- Pacientes cujos fragmentos de biópsias não sejam representativos;
- Pacientes com disfunção do enxerto nos quais haja indicação de biópsia do enxerto renal nas 4 semanas que antecedem a biópsia protocolar;
- Pacientes com contra-indicação à realização de biópsia protocolar.

### **6.3.3. Origem e Método de seleção dos pacientes:**

O estudo iniciou como um ensaio clínico com randomização 1:1 para a realização da biópsia protocolar. Com o advento da pandemia COVID 19, nos anos de 2020 – 2022, foi necessário interromper a randomização e as biópsias protocolares só foram realizadas quando houvesse segurança para tal, sendo os demais pacientes alocados ao grupo controle. Para alcançar o número proposto de pacientes em cada grupo foram também incluídos os pacientes de um estudo piloto prévio realizado entre 2018 e 2019, que utilizou os mesmos critérios para definição do risco. Na amostra final, foram incluídos 29 pacientes do estudo piloto (todos com biópsia), 11 pacientes o período do estudo randomizado (5 no grupo biópsia e 6 no grupo sem biópsia) e 65 pacientes incluídos no período pós-randomização (19 no grupo com biópsia e 46 no grupo sem biópsia), totalizando 105 pacientes, sendo 53 no grupo com biópsia e 52 no grupo sem biópsia.

## **6.4. Variáveis:**

### **6.4.1. Desfechos Estudados:**

- Incidência de alterações histológicas do tipo rejeição nas biópsias protocolares;
- Incidência de rejeições clinicamente manifestas;
- Incidência de DSAs *de novo*;
- Permanência de DSAs prévios;

- Taxa de filtração glomerular estimada (eTFG) pela equação CKD-EPI e proteinúria de 24 horas aos 6, 12, 18 e 24 meses após o transplante;
- Sobrevida dos enxertos e pacientes até 24 meses de seguimento.

#### **6.4.2. Exposições:**

No grupo submetido às biópsias protocolares, além do manejo clínico usual, os pacientes foram submetidos à realização de biópsia do enxerto na 12<sup>a</sup> semana pós-transplante renal. Nos fragmentos de biópsia foram avaliados aspectos de agressão tecidual imunológica (rejeições celular e medida por anticorpos) e os decorrentes de infecções, em especial pelo poliovírus. No momento da biópsia, foram avaliados também a presença de anticorpos anti-HLA e agentes infecciosos danosos ao enxerto (poliovírus e citomegalovírus), além da avaliação de rotina comumente feita nesse período pós-transplante. As biópsias foram analisadas por patologista com experiência em transplante renal. A classificação de Banff (83) foi utilizada para estadiamento das alterações histopatológicas presentes no material de biópsia (Quadro 1). O grupo controle foi submetido ao mesmo manejo do grupo biópsia, mas sem exposição a esta.

#### **6.5. Métodos:**

As biópsias renais foram realizadas no centro cirúrgico ambulatorial do HCPA. Os pacientes foram admitidos para o procedimento e verificados sinais vitais, assegurando-se o controle da pressão arterial. As biópsias foram realizadas com pistola semi-automática com agulha 16G para biópsia renal, sob controle ecográfico em tempo real. Após o procedimento foi feito controle ecográfico, curativo compressivo e colocação de peso de 2 kg sobre o local do enxerto. O paciente permaneceu em repouso por 12 horas com controle intensivo da pressão arterial e verificação de hematúria, tendo alta após esse período.

Os fragmentos de cada biópsia de enxerto renal foram processados de acordo com técnicas padronizadas de histopatologia e imunohistoquímica descritas abaixo. Nos pacientes proteinúricos (proteinúria e 24 horas  $\geq 1,0$ g ou índice proteína/creatinina  $\geq 1$ ) foi feita também a análise do tecido renal por imunofluorescência. As amostras de sangue periférico para as avaliações hematológicas, bioquímicas e moleculares e urina para avaliações bioquímicas e de infecção, foram processadas logo após a coleta de acordo com a rotina do laboratório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em todos os pacientes do estudo.

##### **6.5.1. Análises Histopatológicas:**

Após a realização da biópsia renal, os fragmentos foram encaminhados ao Serviço de Patologia, fixados em solução aquosa de formaldeído 10% (formalina) e submetidos a protocolo de processamento para inclusão em parafina. Para a microscopia ótica, foram cortados fragmentos entre 2 e 3 µm e realizadas colorações com hematoxilina e eosina, metenamina de prata, ácido periódico de Schiff e tricrômico de Masson. Fragmentos mais espessos foram necessários para estudos específicos com vermelho congo ou para testes de imunoperoxidase.

### **6.5.2. Análises Imunohistoquímicas:**

A partir do material fixado em formalina foram realizados os estudos de imunohistoquímica, pelas técnicas de imunoperoxidase ou imunofluorescência, com anticorpos específicos para C4d para marcação da fração C4 do complemento (C4/C4d Anticorpo (Monoclonal) - Quidel Ortho Corporation, San Diego, CA, USA) e para detecção do antígeno SV 40 (SV40 (MRQ-4) Anticorpo Monoclonal – Cell Marque®- Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) para marcação do vírus poliomax.

### **6.5.3. Análise dos Anticorpos Anti-HLA**

#### **6.5.3.1. Anticorpos Anti-HLA**

Para determinação dos anticorpos anti-HLA foi utilizada a tecnologia Luminex®. Nesse método moléculas HLA solubilizadas são ligadas a uma matriz sólida, esferas de poliestireno (*beads*). Nesses ensaios as *beads* são impregnadas com diferentes proporções de dois corantes fluorescentes (sinais classificadores) para produzir até 100 distintas populações de esferas. O reagente anti-globulina nos ensaios de esferas é rotulado com um terceiro corante fluorescente (o sinal repórter) para que, usando um instrumento de laser duplo, a assinatura de fluorescência de cada esfera possa ser acessada identificando uma população de *beads* por um laser, enquanto a fluorescência repórter avalia simultaneamente a ligação anticorpo – HLA específica. O ensaio baseado em esferas é analisado na plataforma Luminex e é semi-quantitativo. O nível da ligação do anticorpo a um antígeno HLA específico é expresso como a intensidade de fluorescência média (MFI) do sinal repórter. Pacientes com intensidade de MFI superior a 1000 foram considerados como tendo um determinado anticorpo que pode ou não ser específico para o doador, nesse segundo caso denominado DSA.

Três tipos de painéis variam na composição de seus antígenos alvo: (a) **painéis de antígenos agrupados** têm duas ou mais diferentes populações de contas revestidas com afinidade purificada para antígenos HLA de classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) ou moléculas de proteínas

HLA de classe II (HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP) obtidos a partir de múltiplas linhas celulares individuais e são usados como teste de triagem para a detecção do anticorpo HLA; (b) **painéis fenotípicos** nos quais cada população de proteínas HLA classe I ou HLA classe II é de uma linhagem celular derivada de um único indivíduo; e (c) *beads* de antígeno único (SAB = *single antigenbead*) em que cada população de esferas é revestida com uma molécula representando um único antígeno de HLA classe I ou II alélico clonado que permite uma análise precisa da especificidade do anticorpo. Painéis de antígenos agrupados são relativamente baratos e indicam a presença ou ausência de anticorpos para uma determinada classe HLA, mas eles não fornecem especificidade nem representam todos os antígenos possíveis. Os painéis fenotípicos são semelhantes aos ensaios baseados em células nos quais mais de uma especificidade de HLA está presente em cada população de esferas, o que requer maior conhecimento na interpretação dos resultados que painéis agrupados ou de antígeno único. Matrizes SAB são as mais sensíveis e específicas, proporcionando maior grau de resolução de anticorpos anti-HLA, e são particularmente úteis na identificação precisa de anticorpos em pacientes altamente sensibilizados.

#### **6.5.3.2. Reatividade Contra Painel (PRA):**

Uma vez conhecidas as especificidades dos anticorpos presentes no soro de um determinado indivíduo, calcula-se a porcentagem de reatividade contra o painel de antígenos HLA, utilizando-se a frequência conhecida na população dos antígenos contra os quais o paciente tem anticorpos. Essa avaliação é presentemente denominada cPRA (reatividade contra painel calculada).

#### **6.6. Viés:**

A maior possibilidade de viés de seleção decorreu da impossibilidade de manter o estudo randomizado em função da pandemia COVID-19. Isso determinou que a alocação aos grupos fosse feita de acordo com a possibilidade de fazer-se ou não a biópsia ao longo do período do estudo, fator que independeu da vontade dos investigadores, e à inclusão na análise dos pacientes de um estudo piloto prévio. Apesar disso, não houve diferença significativa nos diversos parâmetros demográficas dos pacientes entre o grupo submetido à biópsia protocolar e o grupo controle. Outro aspecto, também determinado pela pandemia por Coronavírus, foi a diferença no tempo de seguimento no grupo controle que foi mais curto, embora essa diferença tenha sido considerada na análise estatística dos resultados e não tenha interferido na hipótese do estudo de que a biópsia de protocolo levaria a condutas que melhorassem os desfechos.



## **6.7. Tamanho da Amostra**

Para que se atingisse uma TFG (Taxa de Filtração Glomerular) de 10 mL/min superior no grupo biópsia protocolar, em decorrência do tratamento de agressões sub-clínicas, foi considerado o poder (erro beta) de 90% e uma possibilidade de erro alfa de 0,01. Desta forma, consideramos suficiente a inclusão de 50 pacientes em cada grupo. Ao final, foram incluídos 105 pacientes no estudo, 53 no grupo biópsia e 52 no grupo controle.

## **6.8. Análise Estatística**

Foram realizadas análises descritivas com cálculo da média e desvio padrão para variáveis quantitativas paramétricas, mediana e intervalo interquartilico para variáveis não paramétricas, e frequência/percentual para variáveis categóricas.

Os dados longitudinais foram acompanhados até a perda do enxerto, óbito ou até 2 anos de seguimento. Empregamos a análise GEE (Generalized Estimating Equation) para comparar marcadores clínicos nos períodos de 6, 12, 18 e 24 meses entre os grupos.

Foram realizadas análises referentes aos dados do receptor, do doador e do transplante. Foi utilizado o teste do Qui-quadrado ou exato de Fisher para variáveis categóricas cruzadas, bem como testes não paramétricos de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis, conforme apropriado.

A análise de sobrevida de enxertos e pacientes foi realizada pelo método de Kaplan-Meier.

Os dados faltantes foram registrados como missing. Perda de seguimento foi tratado com censura.

O nível adotado para a significância estatística foi  $p < 0,05$ .

## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, et al. Systematic Review: Kidney Transplantation Compared With Dialysis in Clinically Relevant Outcomes. *Am J Transplant.* 2011;11(10):2093–109.
2. Registro Brasileiro de Transplantes 2022. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. <https://site.abto.org.br/wp-content/uploads/2023/03/rbt2022>
3. Tambur AR, Bestard O, Campbell P, Chong AS, Crespo M, Ford ML, et al. Sensitization in transplantation: Assessment of Risk 2022 Working Group Meeting Report. *Am J Transplant.* 2023;23(1):133–49.
4. Bestard O, Thaunat O, Bellini MI, Böhmig GA, Budde K, Claas F, et al. Alloimmune Risk Stratification for Kidney Transplant Rejection. *Transpl Int.* 2022;35:10138.
5. Veronese FV, Manfro RC, Roman FR, Edelweiss MI, Rush DN, Dancea S, et al. Reproducibility of the Banff classification in subclinical kidney transplant rejection. *Clin Transplant.* 2005;19(4):518–21.
6. Veronese F, Noronha I, Manfro R, Edelweiss M, Goldberg J, Oliveira S, et al. Protocol biopsies in renal transplant patients: Three-years' follow-up. *Transplant Proc.* 2002;34(2):500–1.
7. Aquino Dias EC, Veríssimo Veronese FJ, Santos Gonçalves LF, Manfro RC. Molecular markers in subclinical acute rejection of renal transplants. *Clin Transplant.* 2004;18(3):281–7.
8. Veronese FV, Gonçalves LF, Edelweiss MI, Manfro RC. Interpretation of surveillance kidney allograft biopsies according to the Banff criteria. *Transplant Proc.* 1999;31(7):3019–20.
9. Aquino-Dias EC, Joelsons G, Silva DM da, Berdichewski RH, Ribeiro AR, Veronose FJV, et al. Non-invasive diagnosis of acute rejection in kidney transplants with delayed graft function. *Kidney Int.* 2008;73(7):877–84.
10. Manfro R, Aquino-Dias E, Joelsons G, Nogare A, Carpio V, Goncalves L. Noninvasive Tim-3 Messenger RNA Evaluation in Renal Transplant Recipients With Graft Dysfunction. *TRANSPLANTATION.* 2008;86(12):1869–74.
11. Nogare AL, Dalpiaz T, Pedroso JA, Montenegro RM, Pegas KL, Veronese FV, et al. Expression of fibrosis-related genes in human renal allografts with interstitial fibrosis and tubular atrophy. *J Nephrol.* 2013;26(6):1179–87.
12. Milhoransa P, Montanari CC, Montenegro R, Manfro RC. Micro RNA 146a-5p expression in Kidney transplant recipients with delayed graft function. *J Bras Nefrol.* 2019;41(2):242–51.
13. Rush D, Arlen D, Boucher A, Busque S, Cockfield SM, Girardin C, et al. Lack of Benefit of Early Protocol Biopsies in Renal Transplant Patients Receiving TAC and MMF: A Randomized Study. *Am J Transplant.* 2007;7(11):2538–45.
14. Loupy A, Vernerey D, Tinel C, Aubert O, Duong van Huyen JP, Rabant M, et al. Subclinical Rejection Phenotypes at 1 Year Post-Transplant and Outcome of Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(7):1721.

15. Ortiz F, Gelpi R, Helanterä I, Melilli E, Honkanen E, Bestard O, et al. Decreased Kidney Graft Survival in Low Immunological Risk Patients Showing Inflammation in Normal Protocol Biopsies. *PLOS ONE*. 2016;11(8):e0159717.
16. García-Carro C, Dörje C, Åsberg A, Midtvedt K, Scott H, Reinholt FP, et al. Inflammation in Early Kidney Allograft Surveillance Biopsies With and Without Associated Tubulointerstitial Chronic Damage as a Predictor of Fibrosis Progression and Development of De Novo Donor Specific Antibodies. *Transplantation*. 2017;101(6):1410.
17. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. Remuzzi G, organizador. *PLOS ONE*. 2016;11(7):e0158765.
18. Thomé FS, Sesso RC, Lopes AA, Lugon JR, Martins CT. Brazilian chronic dialysis survey 2017. *Braz J Nephrol*. 2019;41(2):208–14.
19. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *The Lancet*. 2017;389(10075):1238–52.
20. Augustine J. Kidney transplant: New opportunities and challenges. *Cleve Clin J Med*. 2018;85(2):138–44.
21. Severova-Andreevska G, Grcevska L, Petrushevskva G, Cakalaroski K, Sikole A, Stojceva–Taneva O, et al. The Spectrum of Histopathological Changes in the Renal Allograft - a 12 Months Protocol Biopsy Study. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018;6(4):606–12.
22. Lentine KL, Smith JM, Hart A, Miller J, Skeans MA, Larkin L, et al. OPTN/SRTR 2020 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant*. 2022;22:21–136.
23. Lefaucheur C, Louis K, Morris AB, Taupin JL, Nickerson P, Tambur AR, et al. Clinical recommendations for posttransplant assessment of anti-HLA (Human Leukocyte Antigen) donor-specific antibodies: A Sensitization in Transplantation: Assessment of Risk consensus document. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2023;23(1):115–32.
24. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved Graft Survival after Renal Transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med*. 2000;342(9):605–12.
25. Serur D, Saal S, Wang J, Sullivan J, Bologa R, Hartono C, et al. Deceased-donor kidney transplantation: improvement in long-term survival. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2011;26(1):317–24.
26. Matas AJ, Gillingham KJ, Humar A, Kandaswamy R, Sutherland DER, Payne WD, et al. 2202 Kidney Transplant Recipients with 10 Years of Graft Function: What Happens Next? *Am J Transplant*. 2008;8(11):2410–9.
27. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, et al. Identifying Specific Causes of Kidney Allograft Loss. *Am J Transplant*. 2009;9(3):527–35.
28. Sellarés J, Freitas DG de, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the Causes of Kidney Transplant Failure: The Dominant Role of Antibody-Mediated Rejection and Nonadherence. *Am J Transplant*. 2012;12(2):388–99.

29. Yamamoto I, Yamakawa T, Katsuma A, Kawabe M, Katsumata H, Hamada AM, et al. Recurrence of native kidney disease after kidney transplantation. *Nephrology*. 2018;23(S2):27–30.
30. Mehta R, Sood P, Hariharan S. Subclinical Rejection in Renal Transplantation: Reappraised. *Transplantation*. 2016;100(8):1610.
31. Eckardt KU, Kasiske BL, Zeier MG. Special Issue: KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2009;9:S1–155.
32. Roufousse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, Haas M, Henriksen K, Horsfield C, et al. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation*. 2018;102:1.
33. Hoffman W, Mehta R, Jorgensen DR, Sood P, Randhawa P, Wu CM, et al. The Impact of Early Clinical and Subclinical T Cell–mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2019;103(7):1457.
34. Ters ME, Grande JP, Keddiss MT, Rodrigo E, Chopra B, Dean PG, et al. Kidney Allograft Survival After Acute Rejection, the Value of Follow-Up Biopsies. *Am J Transplant*. 2013;13(9):2334–41.
35. Rush DN, Gibson IW. Subclinical Inflammation in Renal Transplantation. *Transplantation*. 2019;103(6):e139.
36. Burdick JF, Beschoner WE, Smith WJ, McGraw D, Bender WL, Williams GM, et al. CHARACTERISTICS OF EARLY ROUTINE RENAL ALLOGRAFT BIOPSIES. *Transplantation*. 1984;38(6):679.
37. d’Ardenne AJ, Dunnill MS, Thompson JF, McWhinnie D, Wood RF, Morris PJ. Cyclosporin and renal graft histology. *J Clin Pathol*. 1986;39(2):145–51.
38. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation*. 1994;57(2):208–11.
39. Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation*. 1995;59(4):511–4.
40. Rush DN. Subclinical Rejection: a Universally Held Concept? *Curr Transplant Rep*. 2020;7(3):163–8.
41. Legendre C, Thervet E, Skhiri H, Mamzer-Bruneel MF, Cantarovich F, Noël LH, et al. Histologic features of chronic allograft nephropathy revealed by protocol biopsies in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 1998;65(11):1506–9.
42. Serón D, Moreso F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Cañas C, et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int*. 1997;51(1):310–6.
43. Heilman RL, Devarapalli Y, Chakkerla HA, Mekeel KL, Moss AA, Mulligan DC, et al. Impact of Subclinical Inflammation on the Development of Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2010;10(3):563–70.
44. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CLS, O’Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*. 2003;349(24):2326–33.

45. Rush D, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Grimm P, Cheang M, et al. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol JASN*. 1998;9(11):2129–34.
46. Kurtkoti J, Sakhuja V, Sud K, Minz M, Nada R, Kohli HS, et al. The utility of 1- and 3-month protocol biopsies on renal allograft function: a randomized controlled study. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2008;8(2):317–23.
47. Halloran P, Mathew T, Tomlanovich S, Groth C, Hooftman L, Barker C. Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double-blind, clinical studies in prevention of rejection. The International Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups. *Transplantation*. 1997;63(1):39–47.
48. Mathew TH. A blinded, long-term, randomized multicenter study of mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation: results at three years. Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. *Transplantation*. 1998;65(11):1450–4.
49. Nickerson P, Jeffery J, Gough J, Grimm P, McKenna R, Birk P, et al. Effect of increasing baseline immunosuppression on the prevalence of clinical and subclinical rejection: a pilot study. *J Am Soc Nephrol JASN*. 1999;10(8):1801–5.
50. Moreso F, Ibernón M, Gomà M, Carrera M, Fulladosa X, Hueso M, et al. Subclinical Rejection Associated with Chronic Allograft Nephropathy in Protocol Biopsies as a Risk Factor for Late Graft Loss. *Am J Transplant*. 2006;6(4):747–52.
51. Rowshani AT, Scholten EM, Bemelman F, Eikmans M, Idu M, Roos-van Groningen MC, et al. No difference in degree of interstitial Sirius red-stained area in serial biopsies from area under concentration-over-time curves-guided cyclosporine versus tacrolimus-treated renal transplant recipients at one year. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2006;17(1):305–12.
52. Kraus ES, Parekh RS, Oberai P, Lepley D, Segev DL, Bagnasco S, et al. Subclinical Rejection in Stable Positive Crossmatch Kidney Transplant Patients: Incidence and Correlations. *Am J Transplant*. 2009;9(8):1826–34.
53. Shapiro R, Randhawa P, Jordan ML, Scantlebury VP, Vivas C, Jain A, et al. An Analysis of Early Renal Transplant Protocol Biopsies – the High Incidence of Subclinical Tubulitis. *Am J Transplant*. 2001;1(1):47–50.
54. Gloor JM, Cohen AJ, Lager DJ, Grande JP, Fidler ME, Velosa JA, et al. Subclinical rejection in tacrolimus-treated renal transplant recipients. *Transplantation*. 2002;73(12):1965–8.
55. Nankivell BJ, Chapman JR. The Significance of Subclinical Rejection and the Value of Protocol Biopsies. *Am J Transplant*. 2006;6(9):2006–12.
56. Thierry A, Thervet E, Vuiblet V, Goujon JM, Machet MC, Noel LH, et al. Long-term impact of subclinical inflammation diagnosed by protocol biopsy one year after renal transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2011;11(10):2153–61.
57. de Sandes-Freitas TV, Felipe CR, Campos ÉF, de Lima MG, Soares MF, de Franco MF, et al. Subclinical Lesions and Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients Receiving Tacrolimus-Based Immunosuppressive Regimen Followed by Early Conversion to Sirolimus. *Transplantation*. 2015;99(11):2372–81.

58. Filippone E, Farber J. The Problem of Subclinical Antibody-mediated Rejection in Kidney Transplantation. *TRANSPLANTATION*. 2021;105(6):1176–87.
59. Moein M, Papa S, Ortiz N, Saidi R, Moein M, Papa S, et al. Protocol Biopsy After Kidney Transplant: Clinical Application and Efficacy to Detect Allograft Rejection. *Cureus [Internet]*. 2023 [citado 10 de junho de 2023];15(2). Disponível em: <https://www.cureus.com/articles/133529-protocol-biopsy-after-kidney-transplant-clinical-application-and-efficacy-to-detect-allograft-rejection>
60. Huang Y, Farkash E. Protocol Biopsies: Utility and Limitations. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2016;23(5):326–31.
61. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FHJ, et al. Consensus Guidelines on the Testing and Clinical Management Issues Associated With HLA and Non-HLA Antibodies in Transplantation. *Transplantation*. 2013;95(1):19.
62. Furness PN, Philpott CM, Chorbadian MT, Nicholson ML, Bosmans JL, Corthouts BL, et al. Protocol biopsy of the stable renal transplant: a multicenter study of methods and complication rates. *Transplantation*. 2003;76(6):969.
63. Gough J, Rush D, Jeffery J, Nickerson P, McKenna R, Solez K, et al. Reproducibility of the Banff schema in reporting protocol biopsies of stable renal allografts. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(6):1081–4.
64. Moreso F, Carrera M, Goma M, Hueso M, Sellares J, Martorell J, et al. Early subclinical rejection as a risk factor for late chronic humoral rejection. *Transplantation*. 2012;93(1):41–6.
65. Bauer AC, Franco RF, Manfro RC. Immunosuppression in Kidney Transplantation: State of the Art and Current Protocols. *Curr Pharm Des*. 2020;26(28):3440–50.
66. Bestard O, Cruzado JM, Rama I, Torras J, Gomà M, Serón D, et al. Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2008;19(10):2020–6.
67. Bestard O, Cuñetti L, Cruzado JM, Lucia M, Valdez R, Olek S, et al. Intragraft regulatory T cells in protocol biopsies retain foxp3 demethylation and are protective biomarkers for kidney graft outcome. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2011;11(10):2162–72.
68. Grimm PC, McKenna R, Nickerson P, Russell ME, Gough J, Gospodarek E, et al. Clinical Rejection Is Distinguished from Subclinical Rejection by Increased Infiltration by a Population of Activated Macrophages. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(7):1582.
69. Girlanda R, Kleiner DE, Duan Z, Ford E a. S, Wright EC, Mannon RB, et al. Monocyte infiltration and kidney allograft dysfunction during acute rejection. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2008;8(3):600–7.
70. Toki D, Zhang W, Hor KLM, Liuwantara D, Alexander SI, Yi Z, et al. The role of macrophages in the development of human renal allograft fibrosis in the first year after transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2014;14(9):2126–36.
71. Wang YY, Jiang H, Pan J, Huang XR, Wang YC, Huang HF, et al. Macrophage-to-Myofibroblast Transition Contributes to Interstitial Fibrosis in Chronic Renal Allograft Injury. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2017;28(7):2053–67.

72. Rush DN, Gibson IW. The perils of immunosuppression minimization: lessons from protocol biopsies of renal allografts. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015;24(6):582.
73. Naumnik B, Kowalewska J, Hryszko T, Glowinski J, Durlik M, Myśliwiec MC. Single center experience of subclinical rejections and BK nephropathies by kidney allografts' surveillance biopsies. *Adv Med Sci*. 2017;62(1):110–5.
74. Scholten EM, Rowshani AT, Cremers S, Bemelman FJ, Eikmans M, van Kan E, et al. Untreated Rejection in 6-Month Protocol Biopsies Is Not Associated with Fibrosis in Serial Biopsies or with Loss of Graft Function. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(9):2622.
75. Dörje C, Reisæter AV, Dahle DO, Mjøen G, Midtvedt K, Holdaas H, et al. Total inflammation in early protocol kidney graft biopsies does not predict progression of fibrosis at one year post-transplant. *Clin Transplant*. 2016;30(7):802–9.
76. Nankivell BJ, Agrawal N, Sharma A, Taverniti A, P'Ng CH, Shingde M, et al. The clinical and pathological significance of borderline T cell-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2019;19(5):1452–63.
77. Blydt-Hansen TD, Sharma A, Gibson IW, Mandal R, Wishart DS. Urinary Metabolomics for Noninvasive Detection of Borderline and Acute T Cell-Mediated Rejection in Children After Kidney Transplantation. *Am J Transplant*. 2014;14(10):2339–49.
78. Moreso F, Sellarès J, Soler MJ, Serón D. Transcriptome Analysis in Renal Transplant Biopsies Not Fulfilling Rejection Criteria. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6):2245.
79. Choi BS, Shin MJ, Shin SJ, Kim YS, Choi YJ, Kim YS, et al. Clinical significance of an early protocol biopsy in living-donor renal transplantation: ten-year experience at a single center. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2005;5(6):1354–60.
80. Lim WH, Chapman JR, Coates PT, Lewis JR, Russ GR, Watson N, et al. HLA-DQ Mismatches and Rejection in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2016;11(5):875–83.
81. Leeaphorn N, Pena JRA, Thamcharoen N, Khankin EV, Pavlakis M, Cardarelli F. HLA-DQ Mismatching and Kidney Transplant Outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2018;13(5):763–71.
82. Wiebe C, Rush DN, Nevins TE, Birk PE, Blydt-Hansen T, Gibson IW, et al. Class II Eplet Mismatch Modulates Tacrolimus Trough Levels Required to Prevent Donor-Specific Antibody Development. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2017;28(11):3353–62.
83. Loupy A, Haas M, Roufousse C, Naesens M, Adam B, Afrouzian M, et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2020;20(9):2318–31.
84. Parajuli S, Redfield RR, Garg N, Aziz F, Mohamed M, Astor BC, et al. Clinical Significance of Microvascular Inflammation in the Absence of Anti-HLA DSA in Kidney Transplantation. *Transplant*. 2019;103(7):1468.
85. Sablik KA, Clahsen-van Groningen MC, Looman CWN, Damman J, Roelen DL, van Agteren M, et al. Chronic-active antibody-mediated rejection with or without donor-specific antibodies has similar histomorphology and clinical outcome - a retrospective study. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2018;31(8):900–8.

86. Senev A, Coemans M, Lerut E, Van Sandt V, Daniëls L, Kuypers D, et al. Histological picture of antibody-mediated rejection without donor-specific anti-HLA antibodies: Clinical presentation and implications for outcome. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2019;19(3):763–80.
87. Setoguchi K, Hyodo Y, Tsujioka H, Inoue M, Nirazuka A, Yoshida Y, et al. Role of Early Serial Renal Transplant Allograft Protocol Biopsies in Living Kidney Transplantations. *Transplant Proc.* 2022;54(2):325–8.
88. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2012;12(5):1157–67.
89. Chemouny JM, Suberbielle C, Rabant M, Zuber J, Alyanakian MA, Lebreton X, et al. De Novo Donor-Specific Human Leukocyte Antigen Antibodies in Nonsensitized Kidney Transplant Recipients After T Cell-Mediated Rejection. *Transplantation.* 2015;99(5):965–72.
90. Parajuli S, Reville PK, Ellis TM, Djamali A, Mandelbrot DA. Utility of protocol kidney biopsies for de novo donor-specific antibodies. *Am J Transplant.* 2017;17(12):3210–8.
91. Haas M, Mirocha J, Reinsmoen NL, Vo AA, Choi J, Kahwaji JM, et al. Differences in pathologic features and graft outcomes in antibody-mediated rejection of renal allografts due to persistent/recurrent versus de novo donor-specific antibodies. *Kidney Int.* 2017;91(3):729–37.
92. Aubert O, Loupy A, Hidalgo L, Duong van Huyen JP, Higgins S, Viglietti D, et al. Antibody-Mediated Rejection Due to Preexisting versus De Novo Donor-Specific Antibodies in Kidney Allograft Recipients. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2017;28(6):1912–23.
93. Tsuji T, Yanai M, Itami H, Ishii Y, Akimoto M, Fukuzawa N, et al. Microvascular inflammation in early protocol biopsies of renal allografts in cases of chronic active antibody-mediated rejection. *Nephrology.* 2015;20(S2):26–30.
94. Gloor JM, Cosio FG, Rea DJ, Wadei HM, Winters JL, Moore SB, et al. Histologic findings one year after positive crossmatch or ABO blood group incompatible living donor kidney transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2006;6(8):1841–7.
95. Lerut E, Naesens M, Kuypers DR, Vanrenterghem Y, Van Damme B. Subclinical peritubular capillaritis at 3 months is associated with chronic rejection at 1 year. *Transplantation.* 2007;83(11):1416–22.
96. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Lefaucheur C, Anglicheau D, Zuber J, et al. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2009;9(11):2561–70.
97. Orandi BJ, Chow EHK, Hsu A, Gupta N, Van Arendonk KJ, Garonzik-Wang JM, et al. Quantifying renal allograft loss following early antibody-mediated rejection. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2015;15(2):489–98.
98. de Kort H, Willicombe M, Brookes P, Dominy KM, Santos-Nunez E, Galliford JW, et al. Microcirculation inflammation associates with outcome in renal transplant patients with de novo donor-specific antibodies. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2013;13(2):485–92.



99. Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, Einecke G, Mengel M, Chang J, et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2009;9(11):2532–41.
100. Bertrand D, Gatault P, Jauréguy M, Garrouste C, Sayegh J, Bouvier N, et al. Protocol Biopsies in Patients With Subclinical De Novo Donor-specific Antibodies After Kidney Transplantation: A Multicentric Study. *Transplantation*. 2020;104(8):1726–37.
101. Schinstock CA, Cosio F, Cheungpasitporn W, Dadhania DM, Everly MJ, Samaniego-Picota MD, et al. The Value of Protocol Biopsies to Identify Patients With De Novo Donor-Specific Antibody at High Risk for Allograft Loss. *Am J Transplant*. 2017;17(6):1574–84.
102. Yamamoto T, Watarai Y, Takeda A, Tsujita M, Hiramitsu T, Goto N, et al. De Novo Anti-HLA DSA Characteristics and Subclinical Antibody-Mediated Kidney Allograft Injury. *Transplantation*. 2016;100(10):2194–202.
103. Cooper JE, Gralla J, Cagle L, Goldberg R, Chan L, Wiseman AC. Inferior Kidney Allograft Outcomes in Patients With De Novo Donor-Specific Antibodies Are Due to Acute Rejection Episodes. *Transplantation*. 2011;91(10):1103.
104. Schinstock CA, Mannon RB, Budde K, Chong AS, Haas M, Knechtle S, et al. Recommended Treatment for Antibody-mediated Rejection After Kidney Transplantation: The 2019 Expert Consensus From the Transplantation Society Working Group. *Transplantation*. 2020;104(5):911–22.
105. Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2018;13(1):182–92.
106. Bouquegneau A, Loheac C, Aubert O, Bouatou Y, Viglietti D, Empana J, et al. Complement-activating donor-specific anti-HLA antibodies and solid organ transplant survival: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2018;15(5):e1002572.
107. Callemeyn J, Lerut E, de Loor H, Arijs I, Thauinat O, Koenig A, et al. Transcriptional Changes in Kidney Allografts with Histology of Antibody-Mediated Rejection without Anti-HLA Donor-Specific Antibodies. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2020;31(9):2168–83.
108. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med*. 2007;357(13):1293–300.
109. Filippone EJ, Farber JL. Humoral Immune Response and Allograft Function in Kidney Transplantation. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2015;66(2):337–47.
110. Mesnard L, Muthukumar T, Burbach M, Li C, Shang H, Dadhania D, et al. Exome Sequencing and Prediction of Long-Term Kidney Allograft Function. *PLoS Comput Biol*. 2016;12(9):e1005088.
111. Pineda S, Sigdel TK, Chen J, Jackson AM, Sirota M, Sarwal MM. Novel Non-Histocompatibility Antigen Mismatched Variants Improve the Ability to Predict Antibody-Mediated Rejection Risk in Kidney Transplant. *Front Immunol*. 2017;8:1687.
112. Lorenzen JM, Volkmann I, Fiedler J, Schmidt M, Scheffner I, Haller H, et al. Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2011;11(10):2221–7.

113. Jackson JA, Kim EJ, Begley B, Cheeseman J, Harden T, Perez SD, et al. Urinary chemokines CXCL9 and CXCL10 are noninvasive markers of renal allograft rejection and BK viral infection. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2011;11(10):2228–34.
114. Schaub S, Nickerson P, Rush D, Mayr M, Hess C, Golian M, et al. Urinary CXCL9 and CXCL10 levels correlate with the extent of subclinical tubulitis. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2009;9(6):1347–53.
115. van Ham SM, Heutinck KM, Jorritsma T, Bemelman FJ, Strik MCM, Vos W, et al. Urinary granzyme A mRNA is a biomarker to diagnose subclinical and acute cellular rejection in kidney transplant recipients. *Kidney Int*. 2010;78(10):1033–40.
116. Ho J, Sharma A, Kroeker K, Carroll R, De Serres S, Gibson IW, et al. Multicentre randomised controlled trial protocol of urine CXCL10 monitoring strategy in kidney transplant recipients. *BMJ Open*. 2019;9(4):e024908.
117. Blydt-Hansen TD, Sharma A, Gibson IW, Wishart DS, Mandal R, Ho J, et al. Urinary Metabolomics for Noninvasive Detection of Antibody-Mediated Rejection in Children After Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2017;101(10):2553–61.
118. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, Abecassis M, Dadhania D, Samstein B, et al. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med*. 2013;369(1):20–31.
119. Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR, Gough J, McKenna RM, Grimm PC, et al. Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation*. 1998;66(12):1673–81.
120. 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(2):125–38.
121. Hrubá P, Brabcová I, Gueler F, Krejčík Z, Stránecký V, Svobodová E, et al. Molecular diagnostics identifies risks for graft dysfunction despite borderline histologic changes. *Kidney Int*. 2015;88(4):785–95.
122. Desvaux D, Schwarzinger M, Pastural M, Baron C, Abtahi M, Berrehar F, et al. Molecular diagnosis of renal-allograft rejection: correlation with histopathologic evaluation and antirejection-therapy resistance. *Transplantation*. 2004;78(5):647–53.
123. Hoffmann SC, Hale DA, Kleiner DE, Mannon RB, Kampen RL, Jacobson LM, et al. Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2005;5(3):573–81.
124. Roedder S, Sigdel T, Salomonis N, Hsieh S, Dai H, Bestard O, et al. The kSORT assay to detect renal transplant patients at high risk for acute rejection: results of the multicenter AART study. *PLoS Med*. 2014;11(11):e1001759.
125. Crespo E, Roedder S, Sigdel T, Hsieh SC, Luque S, Cruzado JM, et al. Molecular and Functional Noninvasive Immune Monitoring in the ESCAPE Study for Prediction of Subclinical Renal Allograft Rejection. *Transplantation*. 2017;101(6):1400–9.
126. Einecke G, Reeve J, Sis B, Mengel M, Hidalgo L, Famulski KS, et al. A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies. *J Clin Invest*. 2010;120(6):1862–72.

127. O'Connell PJ, Zhang W, Menon MC, Yi Z, Schröppel B, Gallon L, et al. Biopsy transcriptome expression profiling to identify kidney transplants at risk of chronic injury: a multicentre, prospective study. *Lancet Lond Engl*. 2016;388(10048):983–93.
128. Wohlfahrtova M, Tycova I, Honsova E, Lodererova A, Viklicky O. Molecular Patterns of Subclinical and Clinical Rejection of Kidney Allograft: Quantity Matters. *Kidney Blood Press Res*. 2015;40(3):244–57.
129. Rychkov D, Sur S, Sirota M, Sarwal MM. Molecular Diversity of Clinically Stable Human Kidney Allografts. *JAMA Netw Open*. 2021;4(1):e2035048.
130. Modena BD, Kurian SM, Gaber LW, Waalen J, Su AI, Gelbart T, et al. Gene Expression in Biopsies of Acute Rejection and Interstitial Fibrosis/Tubular Atrophy Reveals Highly Shared Mechanisms That Correlate With Worse Long-Term Outcomes. *Am J Transplant*. 2016;16(7):1982–98.
131. Friedewald JJ, Kurian SM, Heilman RL, Whisenant TC, Poggio ED, Marsh C, et al. Development and clinical validity of a novel blood-based molecular biomarker for subclinical acute rejection following kidney transplant. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2019;19(1):98–109.
132. Christakoudi S, Runglall M, Mobillo P, Tsui TL, Duff C, Domingo-Vila C, et al. Development of a multivariable gene-expression signature targeting T-cell-mediated rejection in peripheral blood of kidney transplant recipients validated in cross-sectional and longitudinal samples. *EBioMedicine*. 2019;41:571–83.
133. Zhang W, Yi Z, Keung KL, Shang H, Wei C, Cravedi P, et al. A Peripheral Blood Gene Expression Signature to Diagnose Subclinical Acute Rejection. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2019;30(8):1481–94.
134. Van Loon E, Gazut S, Yazdani S, Lerut E, de Loor H, Coemans M, et al. Development and validation of a peripheral blood mRNA assay for the assessment of antibody-mediated kidney allograft rejection: A multicentre, prospective study. *EBioMedicine*. 2019;46:463–72.
135. Hricik DE, Rodriguez V, Riley J, Bryan K, Tary-Lehmann M, Greenspan N, et al. Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2003;3(7):878–84.
136. Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S, DeJelo C, Hricik DE, Schulak JA, et al. Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999;163(4):2267–75.
137. Filippone EJ, Farber JL. The Monitoring of Donor-derived Cell-free DNA in Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2021;105(3):509.
138. Sigdel TK, Archila FA, Constantin T, Prins SA, Liberto J, Damm I, et al. Optimizing Detection of Kidney Transplant Injury by Assessment of Donor-Derived Cell-Free DNA via Massively Multiplex PCR. *J Clin Med*. 2019;8(1):19.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As biópsias protocolares foram instrumentos valiosos na assistência ao paciente transplantado renal e a sua utilização adequada levou a melhoras em desfechos duros em uma época em que a imunossupressão farmacológica e biológica eram menos eficientes que atualmente. O desenvolvimento e uso clínico do Tacrolimo, associado a antiproliferativos potentes, como os micofenolatos, levou a uma redução substancial na incidência de agressões aloimunes sub-clínicas detectadas pelas biópsias protocolares em pacientes sem risco imunológico diferenciado. Esta redução tornou-se ainda mais pronunciada com a utilização quase universal de indução com anticorpos, em especial os depletadores de linfócitos T. Adicionalmente, foram desenvolvidas e validadas estratégias para a remoção e modulação da resposta imune mediada por anticorpos, tudo isso implicando em uma imunossupressão mais intensa com redução da resposta aos aloantígenos e consequente redução das agressões clínicas e sub-clínicas.

Desta forma, restou a avaliação do papel das biópsias protocolares nos pacientes com maior risco imunológico, cuja caracterização foi enormemente aprimorada com as tipagens moleculares dos antígenos do sistema HLA, as novas ferramentas de avaliação da resposta aloimune mediada por anticorpos, tais como provas cruzadas muito sensíveis e plataformas de avaliação dos anticorpos anti-HLA.

O balanço entre a qualificação do risco imunológico, a eficiência da imunossupressão e das ferramentas não-invasivas para a detecção das agressões é crucial para estabelecer o papel das biópsias protocolares que, no entanto, permanecem sendo procedimentos invasivos, caros e sujeitos a variabilidade de interpretações.

Nesse estudo em que realizamos biópsias protocolares no terceiro mês pós-transplante, encontramos, com os critérios de risco imunológico e terapia imunossupressora utilizados, uma significativa frequência de alterações histológicas que, entretanto, tiveram um potencial limitado em propiciar medidas terapêuticas que pudessem levar a um impacto benéfico nas sobrevidas em curto e médio prazos.

## **9.PERSPECTIVAS FUTURAS**

A pesquisa desenvolvida abre caminho para a realização de novos estudos. Antevemos um estudo randomizado robusto, preferencialmente multicêntrico, para avaliar a necessidade e o papel das biópsias protocolares no transplante renal. Uma classificação mais rigorosa do alto risco imunológico, tais como as que se pode obter pela mensuração da quantidade e afinidade dos anticorpos anti-HLA, possivelmente seja útil no estabelecimento deste risco. Outra promissora área, em rápido desenvolvimento, que pode agregar significativamente para a avaliação histológica e imunopatológica dos transplantes renais, são as ferramentas e tecnologias de aprendizado por máquina, inteligência artificial e patologia digital. Adicionalmente, as análises das expressões gênica e proteômica no material das biópsias e também em amostras não invasivas tais como sangue periférico e urina, podem tornar mais acurada a avaliação da agressão aloimune e de outros tipos de agressão ao tecido transplantado. Por fim, estudos devem ter tempos de seguimento mais prolongados, possivelmente com biópsias sequenciais, podendo, assim, contribuir para uma melhor compreensão do papel destas biópsias protocolares no manejo dos pacientes de maior risco imunológico e, assim, levar a melhoras na função e sobrevida mais prolongada dos aloenxertos renais.

## 10. ANEXOS E/OU APÊNDICES

### 10.1 Strobe Statement

STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation
<b>Title and abstract</b>	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract <b>Página 1</b>
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found <b>Página 2</b>
<b>Introduction</b>		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported <b>Páginas 12, 15 e 31</b>
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses <b>Página 32</b>
<b>Methods</b>		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper <b>Página 33</b>
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection <b>Página 33</b>
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <b>Página 33</b>
		<i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls
		<i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants
		(b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed

*Case-control study*—For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case

Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable <b>Página 35</b>
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group <b>Página 36</b>
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias  <b>Página 38</b>
Study size	10	Explain how the study size was arrived at  <b>Página 38</b>
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why  <b>Página 39</b>
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding <b>Página 39</b>  (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions <b>Página 39</b>  (c) Explain how missing data were addressed. <b>Página 39.</b>  (d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <b>Página 39.</b>  <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed  <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy  (e) Describe any sensitivity analyses

## 10.2. Comprovante de submissão à Revista “American Journal of Transplantation”

AJT Editorial Office <em@editorialmanager.com> 29 de janeiro de 2024 às 18:13

Responder a: AJT Editorial Office <amjtransplant@duke.edu>

Para: Rodrigo Franco <rffranco@hcpa.edu.br>

\*This is an automated message.\*

Prospective evaluation of protocol biopsies in high-risk kidney transplant recipients

Dear Dr Franco,

We have received the above referenced manuscript you submitted to American Journal of Transplantation. This

manuscript has been assigned the following manuscript number: AMJT-D-24-00119.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/amjt/>, and

navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

American Journal of Transplantation

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

[https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/28452/supporthub/publishing/](https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/)



For further assistance, please visit our customer service site:  
<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/>

[publishing/](#)

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more

about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and

24/7 by live chat and email

At Elsevier, we want to help all our authors to stay safe when publishing. Please be aware of fraudulent messages

requesting money in return for the publication of your paper. If you are publishing open access with Elsevier, bear in

mind that we will never request payment before the paper has been accepted. We have prepared some guidelines

(<https://www.elsevier.com/connect/authors-update/seven-top-tips-on-stopping-apc-scams>) that you may find helpful,

including a short video on Identifying fake acceptance letters (<https://www.youtube.com/watch?v=o5l8thD9XtE>).

Please remember that you can contact Elsevier's Researcher Support team (<https://service.elsevier.com/>

[app/home/supporthub/publishing/](#)) at any time if you have questions about your manuscript, and you can log into

Editorial Manager to check the status of your manuscript ([https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/29155/](https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/29155/)

[c/10530/supporthub/publishing/kw/status/](#)).

#AU\_AMJT#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

---

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at

any time. (Use the following URL:

<https://www.editorialmanager.com/amjt/login.asp?a=r>). Please contact the

publication office if you have any questions

## 10.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: **Avaliação Prospectiva das Biopsias Renais Protocolares em Receptores de Transplante Renal com Alto Risco Imunológico**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar a indicação da realização de biópsia renal de vigilância entre o segundo e o terceiro mês pós-transplante, em pacientes com risco elevado para ocorrência de rejeição. Esta pesquisa está sendo realizada pela Unidade de Transplante Renal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: uma coleta de sangue (5mL) e uma coleta de urina (coletada uma amostra em horário aleatório), para auxiliar na identificação das alterações renais, proporcionando um diagnóstico eficaz e seguro. Adicionalmente os fragmentos de biópsia renal, utilizada no manejo do seu transplante, serão examinados por técnicas utilizadas neste estudo. Estes materiais serão analisados nos laboratórios de análises clínicas, de Imunologia e no serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa estão relacionados às coletas de sangue e urina e ao procedimento da biópsia renal. As colheitas de sangue (por punção da veia do braço) e urina não oferecem risco significativo, podendo ocorrer apenas um pequeno desconforto na colheita de sangue, hematoma na área da punção da veia e, quanto à urina, um desconforto na hora da colheita para armazenar a mesma dentro do frasco. A biópsia renal será realizada em torno da 10ª semana pós-transplante, sendo assim, para fazer parte do estudo o participante deve permitir a utilização das informações oriundas da biópsia do seu transplante renal, para análise pelo estudo. Para a realização da biópsia é necessária sua permanência no hospital por aproximadamente 12 horas. Os riscos associados à biópsia são: sangramento na urina, hematoma local e em raros casos há necessidade de cirurgia (menor que 1%) e até mesmo da retirada do rim transplantado (1 a cada 2000 casos).

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa serão melhores práticas relacionadas ao manejo das possíveis complicações associadas ao transplante renal de futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dr. Roberto Ceratti Manfro pelo telefone 33598876, com o pesquisador Dr. Rodrigo Fontanive Franco, pelos telefones 33598876 ou 33598121 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

---

Nome do participante da pesquisa

---

Assinatura

---

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

---

Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

