



WASHINGTON LUIS VIRIATO SAMPAIO

**DEPÓSITO PERITUBULAR DE C4d E INFILTRAÇÃO DE
MACRÓFAGOS EM BIÓPSIAS DE RINS TRANSPLANTADOS
COM ALTERAÇÕES LÍMITROFES**

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

WASHINGTON LUIS VIRIATO SAMPAIO

**DEPÓSITO PERITUBULAR DE C4d E INFILTRAÇÃO DE
MACROFAGOS EM BIÓPSIAS DE RINS TRANSPLANTADOS
COM ALTERAÇÕES LÍMITROFES**

ORIENTADORA: PROF. DRA. MARILDA MAZZALI

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, como
requisito, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica na área de
concentração Clínica Médica.

Este exemplar corresponde à versão final da
dissertação defendida pelo Aluno Washington Luis
Viriato Sampaio e orientado pela Profa. Dra.
Marilda Mazzali

CAMPINAS
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

V819d Viriato Sampaio, Washington Luis, 1968-
Depósito peritubular de C4d e infiltração de macrófagos em biopsias de rins transplantados com alterações limítrofes / Washington Luis Viriato Sampaio. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marilda Mazzali.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Transplante renal. 2. C4d em capilar peritubular. 3. Rejeição borderline. 4. Macrófagos. I. Mazzali, Marilda, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Peritubular Capillary C4d depostion and macrophage infiltration in kidney allograft biopsies with borderline changes

Palavras-chave em inglês:

Renal transplant

C4d deposition in peritubular capillaries

Borderline rejection

Macrophages

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Marilda Mazzali [Orientador]

Ricardo de Lima Zollner

Lucio Roberto Requião Moura

Data de defesa: 27-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

WASHINGTON LUIS VIRIATO SAMPAIO

Orientadora PROFA. DRA. MARILDA MAZZALI

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. MARILDA MAZZALI

2. PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

3. PROF. DR. LUCIO ROBERTO REQUIÃO MOURA

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 27 de fevereiro de 2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Conceição e Everaldo, pela direção; a minha esposa Nirvana, pela caminhada e a meus filhos Carolina e Kalil pela oportunidade de orientar um novo caminho.

AGRADECIMENTOS

Se o círculo é redondo e nunca se fecha, termino o que comecei para começar o que ainda não terminei.

Como círculo, a vida roda em espiral, retorno ao início, onde o mesmo jamais somos. Que seja, o começo e o fim, um esforço hercúleo, mas não Sísifo. Quando, mais sábios e velhos estamos, e a memória, que é nossa, mas nem sempre, portanto, e pelo pouco que tenha sido, peço desculpas, sabido fique a todos não mencionados, que são vários, mas que não falte o meu carinho e respeito.

A todos aqueles, impregnado em minha existência, agradeço:

A UNICAMP pela oportunidade do aprendizado.

Aos professores Dr Ricardo Zolner e a Dra Carmen Lima pelo comprometimento com o programa de pós graduação de Clínica Médica da UNICAMP.

A professora Dra Maria Almerinda Ribeiro Alves pela discussão filosófica existencial, quando aprendi a resiliência e a resistência.

A minha orientadora, a professora Dra Marilda Mazzali pela sua competência técnica científica, demonstrada na resolução dos problemas e discussão teórica, e generosa paciência.

Aos professores Daniel Rinaldi dos Santos e Maria Emilia Moreira Alves pelo prelúdio, de tão importante, fundamental.

Aos colegas do Laboratório pela convivência agradável e profícua: Fabiana, Fernanda, Juliana, Patricia, So, e em especial a Felipe no manejo dos programas de computação e na coloração para macrófagos.

Aos colegas do Curso de Medicina da Universidade Estadual do Sudoeste (UESB), pelo apoio, estímulo e compreensão.

A Conceição Fonseca, cara amiga, pela correção gramatical.

A Genival, caro amigo, pela revisão, apoio e incentivo.

A Nirvana, esposa minha, pelo companheirismo.

Aos meus filhos Carolina e Kalil pela compreensão.

POUCO me importa.

Pouco me importa o que? Não sei: pouco me importa.

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Considerações Gerais	25
1.2	Rejeição Borderline: suspeita de rejeição aguda	27
1.3	Rejeição mediada por células <i>versus</i> rejeição mediada por anticorpos	31
1.4	Deposição de C4d em capilares peritubulares	32
1.5	C4d e a classificação de Banff: versões revisadas	36
1.5.1	Revisão da Classificação de Banff, versão 2001	36
1.5.2	Revisão da Classificação de Banff, versão 2005	37
1.6	Importância da extensão dos depósitos de C4d: focal <i>versus</i> difuso	39
1.7	Importância dos depósitos de C4d em biopsias sem rejeição aguda	40
1.8	Depósitos de C4d e alterações histológicas	42
1.8.1	Alterações agudas	41
1.8.2	Alterações crônicas	42
1.9	Relação entre os infiltrados ricos em macrófagos e os depósitos de C4d	43

2	OBJETIVOS	
2.1	Objetivo geral	46
2.2	Objetivos específicos	46
3	MATERIAL E MÉTODOS	
3.1	Metodologia	48
3.1.1	Desenho do estudo	48
3.1.2	Critérios de Inclusão	48
3.1.3	Critérios de Exclusão	49
3.1.4	Informações dos pacientes, obtidas a partir dos prontuários médicos	49
3.1.5	Desfechos avaliados	50
3.1.6	Algoritmo do estudo	51
3.1.7	Biópsias renais	52
3.1.7.1	Procedimento da biópsia renal do rim transplantado	52
3.1.8	Avaliação morfológica	53
3.1.9	Imunohistoquímica	55
3.1.9.1	Imunohistoquímica para C4d	55

3.1.9.2	Imunohistoquímica para macrófagos	57
3.1.9.3	Quantificação da Imunohistoquímica para C4d	57
3.1.9.4	Quantificação da Imunohistoquímica para macrófagos	58
3.1.10	Protocolos de Imunossupressão	58
3.1.11	Análise estatística	59
4	RESULTADOS	
4.1	Características do grupo de estudo	61
4.2	Imunossupressão	61
4.2.1	Indução	62
4.2.2	Manutenção	63
4.3	Características dos pacientes de acordo com a expressão de C4d nas biópsias iniciais	63
4.4	Análise das biópsias	65
4.4.1	Análise morfométrica	65
4.4.2	Análise de acordo com a classificação de Banff 1997	67
4.4.3	Infiltrado de macrófagos	67
4.5	Evolução da função renal e necessidade de biópsias sequenciais	67

4.5.1	Segunda biópsia renal	68
4.6	Reavaliação pela classificação de Banff 2005	69
4.7	Presença de C4d em CPT e função tardia do enxerto	69
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÕES	82
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Definição de rejeição aguda mediada por anticorpos, de acordo com a classificação de Banff 2001	37
Tabela 2	Classificação de capilarite, de acordo com o número de células/capilar peritubular	38
Tabela 3	Análise das semiquantitativa alterações tubulo-intersticiais	54
Tabela 4	Características dos pacientes de acordo com a expressão de C4d na primeira biopsia renal	64
Tabela 5	Evolução da função renal imediata após o transplante nos diferentes grupos	64
Tabela 6	Parâmetros morfométricos das biópsias iniciais, com diagnostico de rejeição borderline, divididas de acordo com a expressão de C4d	66
Tabela 7	Distribuição dos achados morfométricos nas 31 biópsias renais iniciais, de acordo com a expressão de C4d.	67

LISTA DE FIGURAS & GRÁFICOS

Algoritmo	Algoritmo do estudo	51
Figura 1	Imunohistoquímica para C4d, contracoloração com HE, aumento de 1000x (imersão). [A] ausência de coloração em capilares peritubulares, C4d negativo. [B] C4d positivo, com delineamento de toda a extensão do capilar peritubular	57
Figura 2	Imunohistoquímica para macrófago. Coloração de macrófago intersticial [A], (aumento 100x), e em glomérulo [B], (aumento 1000x)	58
Gráfico 1	Evolução da creatinina sérica (mg/dL) no período de 6, 12 e 24 meses, nos grupos C4d positivo e negativo.	71

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
Ah	Espessamento hialino arteriolar
Bx	Biópsia
C3	Fração C3 do complemento
C4d	Fração C4d do complemento
C4d+	C4d positivo
C4d-	C4d negativo
CCTT	Cooperative Clinical Trials in Transplantation
CI	Fibrose intersticial
CG	Glomerulopatia do enxerto
CPT	Capilar peritubular
CT	Atrofia tubular
CV	Espessamento fibroso da íntima vascular
HLA	Antígeno de Histocompatibilidade Humano
II	Inflamação intersticial
IgG	Imunoglobulina de classe G
IHQ	Imunohistoquímica
MBG	Membrana basal glomerular
MM	Aumento da matriz mesangial
MMF	Micofenolato mofetil
NTA	Necrose tubular aguda
FIAT	Fibrose intersticial e atrofia tubular, sem etiologia específica
OKT3	Anticorpo monoclonal anti receptor CD3
PBS/BSA	Solução tamponada de fosfato com soro albumina bovina
PMN	Polimorfonuclear

RCA	Rejeição Celular Aguda
RHA	Rejeição Humoral Aguda
RMA	Rejeição mediada por anticorpos

RESUMO

O significado rejeição borderline na biópsia renal permanece controverso. Por outro lado, a presença de depósitos de C4d em capilares peritubulares e infiltração de macrófagos estão associadas à ativação de resposta imune mediada por anticorpos, com pior prognóstico para o enxerto.

Objetivos: Analisar a presença de depósitos de C4d em capilares peritubulares e de infiltrado de macrófagos em glomérulo e interstício de biópsias de rim transplantado diagnosticadas como rejeição borderline. Estabelecer a associação entre estes marcadores e o prognóstico do enxerto.

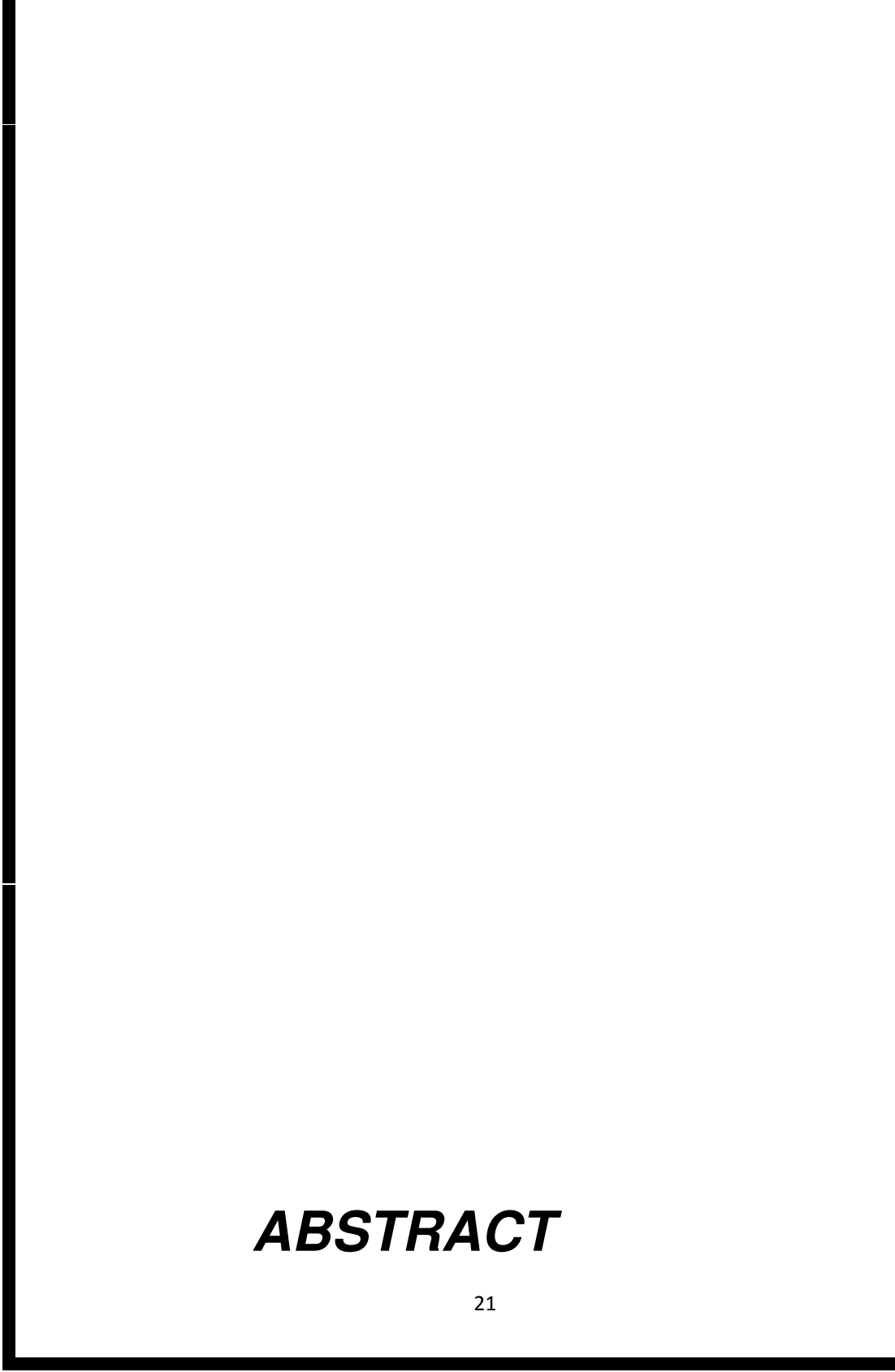
Material e Métodos: Biópsias renais classificadas como borderline, sem antecedente prévio de rejeição aguda e com material adequado para reanálise foram incluídas neste grupo. As lâminas foram reavaliadas e reclassificadas de acordo com a classificação de Banff 1997 e posteriores, além de coradas por imunohistoquímica para C4d e macrófagos. Informações demográficas e associadas ao transplante foram coletadas a partir dos prontuários médicos.

Resultados: 31 pacientes preencheram os critérios de inclusão no estudo. A análise das 31 biópsias renais iniciais demonstrou que as biópsias C4d positivas (n= 12) apresentaram associação com maior incidência de retardo de função do enxerto, indicação mais precoce do procedimento de biópsia, maiores índices de necrose tubular aguda degenerativa, maior incidência de capilarite e de infiltração glomerular de macrófagos, porém com menores índices de tubulite, atrofia tubular e fibrose intersticial comparado ao grupo C4d negativo. Cinco pacientes do grupo C4d negativo passaram a apresentar depósitos de C4d em biópsias sequenciais. Pacientes com pelo menos uma biópsia com C4d positivo (n=17) apresentaram pior função do enxerto renal em 6 meses ($1,8 \pm 0,8$ vs. $1,4 \pm 0,5$; $p < 0,01$), 1 ano ($2,1 \pm 1$ vs.

$1,5 \pm 0,5$; $< 0,01$) e 2 anos pós transplante ($2,3 \pm 1,3$ vs. $1,5 \pm 0,7$; $< 0,05$).

Em conclusão, na presente série, a expressão de C4d em capilares peritubulares de biópsias renais classificadas como borderline esteve associada a um pior prognóstico do enxerto.

Palavras chave: Transplante Renal, C4d, Rejeição borderline, Macrófagos.



ABSTRACT

Impact of borderline rejection in renal graft remains controversial. The aim of this study was to analyze the presence of C4d deposits in peritubular capillaries and macrophage infiltration in renal biopsies with diagnosis of borderline rejection and its effect on graft function.

Methods: 31 renal transplant recipients, with a diagnosis of borderline rejection were included. Initial and sequential biopsies were analyzed for morphology, C4d and macrophage staining, and compared to clinical data.

Results: Initial biopsies showed 12 fragments C4d positive, associated with a higher incidence of delayed graft function, earlier post-transplant time, higher ATN score, capillaritis and glomerular macrophage infiltration, but with lower levels of tubulitis, interstitial fibrosis and tubular atrophy, compared to C4d negative group. In sequential biopsies, 5 patients from negative group turned C4d positive. Patients with at least one positive C4d biopsy (n=17) showed a worse renal graft function at 6 months (1.8 ± 0.8 vs. 1.4 ± 0.5 mg/dL, $p < 0.01$), 1 year (2.1 ± 1.0 vs. 1.5 ± 0.5 mg/dL, $p < 0.01$) and 2 years of follow up (2.3 ± 1.3 vs. 1.5 ± 0.7 mg/dL, $p < 0.05$).

In conclusion, the expression of C4d in peritubular capillaries of renal biopsies classified as borderline rejection was associated with a worse prognosis for the renal allograft.

Key words: kidney transplant, C4d, borderline rejection, macrophages

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

O transplante renal proporciona melhor qualidade de vida e menor mortalidade aos pacientes portadores de insuficiência renal crônica comparado ao tratamento dialítico. O desenvolvimento de medicamentos imunossupressores mais potentes e o melhor controle clínico dos episódios de rejeição aguda aumentaram a sobrevida do enxerto, especialmente no primeiro ano [Cecka et al, 2002; Hariharan et al, 2004]. Entretanto, a rejeição aguda persiste como fator de risco para perda de enxerto, com pior prognóstico para rejeição aguda tardia (após três meses do transplante), para rejeição com acometimento vascular e/ou para episódios repetidos de rejeição [Al- Awaa et al, 1998].

A suspeita do diagnóstico de rejeição aguda é baseada na elevação dos níveis séricos de creatinina e/ou na redução de volume urinário. No entanto, a rejeição subclínica, caracterizada pela alteração histológica, mesmo com função renal estável ou em recuperação, pode ocorrer em cerca de 50% dos casos de rejeição aguda [Al - Aiwa et al, 1998; Dean et al, 1999].

O diagnóstico de rejeição aguda depende da análise histológica de fragmentos de biopsia renal, que permanece o “padrão ouro” na avaliação da disfunção do enxerto, superior à dosagem de creatinina sérica, à cintilografia renal dinâmica ou à biopsia aspirativa por agulha fina [Colvin et al, 1998].

Portanto, a necessidade de padronização e reprodutibilidade do diagnóstico de rejeição aguda, em biopsias renais em diferentes séries, é fundamental. Deste modo, foram criados consensos classificatórios, como o

Cooperative Clinical Trials in Transplantation (CCTT) e a Classificação de Banff. Nessas classificações, as diferentes alterações anatômicas dos compartimentos do tecido renal (glomérulos, vasos e túbulo-interstício) receberam escores numéricos [Colvin et al, 1997; Solez et al, 1993; Racusen et al, 1999; Racusen et al, 2003].

A classificação de Banff (1993) valorizava a presença do infiltrado inflamatório intersticial como sinal de rejeição, em detrimento da tubulite. Essa classificação considerava rejeição aguda grau I quando o infiltrado linfocitário comprometia mais de 25% do córtex e, como rejeição borderline, quando esta infiltração era inferior a 25% [Solez et al, 1993]. Entretanto, a presença de infiltrado intersticial leve, isolado, em enxertos com função renal preservada, era insuficiente para classificá-la como rejeição aguda [Marcussen et al, 1995; Gaber et al, 1996; Bates et al, 1999].

Em 1997 foi criado o CCTT, um consenso que classificava a rejeição aguda em:

a) rejeição tipo I (túbulo intersticial): presença de infiltrado inflamatório mononuclear ocupando 5% do córtex renal e apresentando, no mínimo, três túbulos com tubulite, em 10 campos de alta definição, na área mais afetada pela inflamação intersticial.

b) rejeição tipo II: presença de endarterite, com ou sem rejeição intersticial.

c) rejeição tipo III: presença de necrose fibrinóide arterial ou inflamação transmural [Colvin et al, 1997].

A classificação de Banff de 1997, publicada em 1999, ratificou como

critérios de rejeição aguda: a) tubulite em mais de um foco; b) lesão tubular mais intensa na área com maior inflamação; c) inflamação comprometendo mais de 10% do córtex. Além disso, a rejeição aguda foi subdividida em rejeição túbulo-intersticial e vascular, independente do grau de inflamação intersticial, considerando tratar-se de mecanismos fisiopatológicos diferentes.

Esta classificação enfatizou, também, a importância do tamanho da amostra para análise histológica de biópsias renais, tendo como base a presença de córtex renal na amostra. Foram consideradas como adequadas amostras contendo 10 ou mais glomérulos e pelo menos 2 artérias. Amostras mínimas foram definidas pela presença de 7 glomérulos e pelo menos 1 artéria. Afinal, lesões focais, como a arterite, tubulite e a inflamação intersticial, especialmente em rejeições precoces ou leves, poderiam não ser diagnosticadas em material de biópsia insuficiente [Racusen et al, 1999].

Vários estudos validaram as classificações de Banff 1997 e de CCTT, de acordo com a imunossupressão utilizada, resposta ao tratamento e o risco de perda de enxerto [Marcussen et al 1995; Gaber et al 1996; Nickleit et al 1998; Bates et al 1999; Meuller et al, 2000]. A recuperação da função renal, após o tratamento com pulso de metilprednisolona ocorreu em 100% dos casos de rejeição borderline, em 93% na rejeição grau I, em 79% de rejeição grau II e em 47% nas rejeições classificadas como grau III pelo CCTT [Colvin et al, 1997].

1.2 Rejeição borderline: suspeita de rejeição aguda

A classificação de Banff de 1997 considerava necessário para o diagnóstico de rejeição borderline: a presença de foco de tubulite com infiltração de uma a quatro células mononucleares por seção tubular (t1), além de inflamação intersticial entre 10 e 25% do parênquima cortical (i1 ou i2), e ausência de arterite intima (v0). [Racusen et al, 1999]. A presença de inflamação intersticial focal, na ausência de tubulite, é considerado inespecífico e insuficiente para a classificação, tanto como rejeição aguda como borderline [Meehan et al, 1999].

A interpretação do diagnóstico dos infiltrados borderline é controversa. Estes infiltrados em biopsias renais protocolares de pacientes com função renal normal, tendem a desaparecer espontaneamente, sendo considerados como variante do normal e, portanto, não necessitando de tratamento [Beimler & Zeier, 2009]. Por outro lado, infiltrados classificados como borderline, em biopsias realizadas por disfunção do enxerto é considerados como rejeição [Racusen et al, 1999; Mengel et al, 2007]. Além disso, as lesões focais podem ser subestimadas, com discrepância entre a intensidade do infiltrado e a gravidade da rejeição aguda, sendo necessária à correlação entre a clínica e os achados histológicos [Solez et al, 1993; Nickleit et al, 1998].

Deste modo, a incidência de rejeição borderline e rejeição aguda variam de acordo com a indicação da biópsia renal. Rejeição borderline foi observada em até 49% dos casos de biópsias protocolares e entre 11% a 36% nas biópsias indicadas por disfunção do enxerto. Nestas mesmas séries, rejeição aguda foi diagnosticada em 4 a 33% das biopsias protocolares e em 18 a 21% das biopsias por indicação [Rush et al, 1994; Sorof et al, 1995; Schweitzer et al 1996; Serón et

al, 1997; Legendre et al, 1998; Meehan et al, 1999; Jain et al, 2000; Shapiro et al, 2001; Gloor et al, 2002] .

Essas diferenças dependem das características da população estudada, do tempo para realização da biopsia após o transplante e da presença de necrose tubular aguda e/ou de sinais de toxicidade por imunossupressores [Gabber et al, 1996; Sad et al, 1997; Meehan et al, 1999].

A evolução dos casos de rejeição borderline também é controversa. Enquanto alguns estudos demonstraram não haver diferença na evolução da função renal de pacientes com rejeição borderline, tratados ou não, comparados a pacientes com biopsia renal protocolar normal, [Serón et al 1997; Legendre et al, 1998; Meehan et al, 1999], outros demonstraram pior função tardia do enxerto, quando comparados a rins sem rejeição [Ishikawa et al, 1999; Roberts et al, 2004] ou progressão da rejeição borderline para rejeição aguda [Schweitzer et al, 1996; Saad et al, 1997]. Nankivell et al (2003), analisando biópsias protocolares de 119 pacientes, durante 10 anos, observaram incidência de 61% de rejeição subclínica, incluindo alterações borderline, no primeiro mês pós transplante. A persistência da rejeição subclínica apresentou correlação com maior intensidade de fibrose intersticial e atrofia tubular e pior função renal ao final de 2 anos após o transplante [Nankivell et al, 2003].

A maioria dos centros transplantadores não institui terapêutica para rejeição borderline em biopsias protocolares, devida fraca evidencia que a ausência de tratamento comprometa a função do enxerto a longo prazo. Apesar da hipótese de que, o não tratamento da rejeição borderline em biopsias

protocolares possa comprometer a função do enxerto a longo prazo, a maioria dos centros transplantadores não as trata, pois as evidências de progressão para rejeição aguda ainda são fracas, entretanto deve ser considerada avaliação individualizada, principalmente em pacientes com risco imunológico elevado [Rush et al, 1995; Rush et al, 1998; Beimler & Zeier, 2009].

A rejeição borderline responde ao tratamento imunossupressor, com corticosteroides ou anticorpos antilinfocíticos em 75 a 100% dos casos [Schweitzer et al, 1996]. Entretanto, a ausência de resposta ou resposta parcial ao tratamento sugere rejeição esteroide resistente, principalmente na presença de alterações histológicas de glomerulite e de índices de lesão aguda maior que 2, pela classificação de Banff 1997. Resposta insuficiente também ocorre nos casos de associação com necrose tubular aguda, nefrotoxicidade por inibidores de calcineurina ou alterações histológicas crônicas [Schweitzer et al, 1996; Saad et al, 1997; Meehan et al, 1999, Racusen et al, 1999, Regele et al, 2002].

Torna-se difícil, portanto, definir a conduta terapêutica baseada apenas na presença dos infiltrados na biópsia, uma vez que os resultados destes estudos não podem ser extrapolados para pacientes com risco imunológico elevado, receptores idosos ou de órgãos provenientes de doadores falecidos com critérios expandidos. Além disso, a persistência do infiltrado borderline, após tratamento antirrejeição, independente dos níveis séricos de creatinina, pode refletir tanto tratamento incompleto da rejeição aguda, com necessidade de aumento da imunossupressão, quanto rejeição em resolução, uma vez que o infiltrado pode persistir mesmo com a recuperação da função renal [Rush et al, 1994; Racusen et

al, 1999; Roberts et al, 2004].

Assim, a diferenciação da rejeição borderline como variante do normal ou como rejeição aguda é fundamental, pois implica em prognóstico e terapêutica diferentes.

1.3 Rejeição mediada por células *versus* rejeição mediada por anticorpos

A forma mais comum de rejeição aguda no transplante renal é a rejeição celular aguda (RCA), mediada por linfócitos T e caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório mononuclear, tubulite, endoteliose e/ou glomerulite, que pode evoluir para perda de enxerto no primeiro ano em 3 a 7% dos casos [Collins et al, 1999]. A rejeição aguda mediada por anticorpos é uma forma mais grave de rejeição, mediada pela presença de anticorpos circulantes contra antígenos de Histocompatibilidade Humano (HLA) e não HLA do doador e, caracterizada pela ativação da via clássica do complemento, com infiltrado inflamatório com predomínio de polimorfonucleares, especialmente monócitos, macrófagos e neutrófilos, e lesão de capilares peritubulares (capilarite), evoluindo para perda de enxerto em 29 a 75% dos casos [Colvin et al, 1997; Collins et al, 1999; Crespo et al, 2001; Racusen et al, 2003; Solez et al, 2007; Truong et al, 2007]

Na rejeição mediada por anticorpo, o principal alvo de lesão é as células endoteliais dos capilares peritubulares (CPT), compostos por endotélio achatado e fenestrado, envolvido por uma fina membrana basal, capaz de expressar receptores tanto para moléculas de adesão, como para quimiocinas e antígenos

HLA de classes I e II [Mauiyyedi et al, 2001; Liptak et al, 2005]. A ligação do anticorpo circulante com os antígenos expressos no endotélio dos CPT leva à ativação do sistema complemento, com recrutamento de leucócitos e estimulação da citotoxicidade por células natural killer ou monócitos e macrófagos [Sis et al, 2009].

Os achados histológicos sugestivos de rejeição mediada por anticorpo (RMA) são vasculites graves, glomerulite, presença de trombos de fibrina em glomérulo e/ou vasos, necrose fibrinóide, dilatação e infiltrado de polimorfonucleares (PMN) em capilares peritubulares além de áreas de infarto tecidual [Halloran et al, 1990; Trpkov et al, 1996; Racusen et al, 2003]. Outros achados necessários para o diagnóstico de RMA é a presença de anticorpos circulantes contra os antígenos HLA do doador e a expressão de C4d em capilares peritubulares [Halloran et al, 1992; Racusen et al, 2003].

1.4 Deposição de C4d em capilares peritubulares

A interação antígeno/anticorpo ativa a cascata de complemento, que pode ocorrer tanto pela ligação de anticorpos fixadores de complemento à superfície celular como pelo recrutamento do complexo C1qrs pela via lecitina-manose. O C1q ativado catalisa a clivagem do complexo C2-C4, levando à formação de C4b-C2a, ou C3 convertase, enzima responsável pelo desencadeamento da cascata de complemento pela via clássica. A fração C4b do complemento é clivada, através da ação do fator I e de proteína cofator de membrana em C4c e C4d

[Collins et al, 1999; Platt et al, 2002].

Pela ação da C3 convertase, o C3 sofre clivagem em C3a e C3b, que ativa a ligação de C5 com C9, levando à formação do complexo de ataque à membrana C5b-9. Durante este processo, são liberados fatores quimiotáticos para outras células, como neutrófilos e macrófagos (via C5a, C4a e C3a), linfócitos B (via C3d), além de lesão de célula alvo, especialmente a célula endotelial, que sofre citólise e/ou apoptose em resposta ao complexo C5b-9 [Collins et al, 1999; Platt et al, 2002].

Esta reação leva a um aumento na expressão de moléculas de adesão pela célula endotelial, como a P selectina, facilitando a migração de células inflamatórias e causando a capilarite [Truong et al, 2007].

A expressão de depósitos de C4d em capilares peritubulares é um marcador da ativação do complemento. O C4d é um peptídeo de 44,5 Kd, representado pela porção α_2 do complemento C4 (peso molecular de 42Kda) contendo um radical tio éster que permite ligações covalentes com proteínas estruturais das células endoteliais e com a matriz extracelular da membrana basal vascular [Davies et al, 1988; Platt et al, 2002]. O C4d, oriundo da circulação, é depositado tanto na superfície luminal das células endoteliais como entre as células endoteliais e a membrana basal dos CPT [Feucht et al, 1991; Feucht et al, 1993; Collins et al, 1999; Regele et al, 2001].

A expressão do C4d nos capilares peritubulares resulta da menor resistência destes vasos à ativação da via clássica do complemento, uma vez que a expressão de proteínas inibidoras do complemento, como o fator

acelerador do decaimento, a proteína cofator da membrana e o CR1, que inativam C3 e/ou C5, estão diminuídas em comparação com os capilares glomerulares. Apenas a protectina, que inibe a formação do complexo de ataque à membrana, é fortemente expressa nos CPTs [Collins et al, 1999].

A prevalência de C4d em CPT em biopsias de rins transplantados varia com a indicação de biopsia (protocolar ou por disfunção do enxerto), tempo de realização da biopsia após o transplante, presença de rejeição aguda ou crônica, imunossupressão e os critérios de seleção das biopsias e de pacientes [Feucht et al, 1991; Feucht et al, 1993. Regele et al, 2001; Regele et al, 2002; Mengel et al, 2005].

Trabalhos pioneiros de Feucht et al (1991) demonstraram, por meio de imunofluorescência indireta, que a expressão de C4d em CPT representava um sinal indireto e duradouro da ativação do anticorpo e da via clássica do complemento, mesmo após o desaparecimento do anticorpo e de outras frações do complemento [Feucht et al, 1991].

A prevalência de C4d em capilares peritubulares variou de 20 a 61% nos diferentes estudos, sendo mais frequente em biopsias de transplantes com ABO incompatível, ao redor de 50%. [Onitsuka et al, 1999; Kato et al, 2003]. Depósitos de C4d também foram observados em biopsias com rejeição aguda, ao redor de 30% [Feucht et al, 1991; Feucht et al, 1993; Regele et al, 2001; Nickleit et al, 2002].

Entretanto, após a padronização da coloração de C4d como rotina em biopsias renais, estudos demonstraram uma menor incidência de depósitos de

C4d, ao redor de 2 a 5% das biopsias protocolares e 12 a 30% das biopsias por indicação, sendo a maior incidência em rins de receptores hipersensibilizados, receptores de rins ABO incompatível e/ou com prova cruzada positiva [Lorenz et al, 2004; Mengel et al, 2005; Mol & Pascual, 2005; Troxell et al, 2006].

Na tentativa de correlacionar a presença de C4d com lesões histológicas específicas em biopsias renais por indicação, Nickeleit et al avaliaram retrospectivamente 265 biopsias renais de transplante, e observaram correlação entre C4d e glomerulite e também com depósitos de HLA classe II em células tubulares. Entretanto, não observaram diferença na presença de endarterite e inflamação intersticial nos grupos com ou sem depósitos de C4d em capilares peritubulares [Nickeleit et al, 2002].

Assim, a expressão de C4d em CPT evidencia, *in situ*, a atividade humoral de processo imunológico e representaria um bom preditor da função de enxerto [Lederer et al, 2001; Solez et al, 2007]. Diversos estudos tentaram correlacionar a presença de depósitos de C4d com a sobrevida e a função tardia do enxerto. Em alguns estudos, a presença de C4d em capilares peritubulares de biopsias com rejeição aguda foi fator independente para perda do enxerto em 12 meses, independente do quadro histológico [Bohmig et al, 2002; Herzemberg et al, 2002].

Entretanto, em outros estudos a presença de C4d foi associada apenas à pior função renal inicial, com tendência à menor taxa de filtração glomerular ao final do primeiro ano pós transplante [Nickeleit et al, 2002; Nickeleit et al, 2003].

Esta variação nos resultados pode ser atribuída à característica dinâmica

dos depósitos de C4d e à sua intensidade. Nickleleit et al observaram que biopsias com C4d positivo tornavam-se negativas e vice-versa, em intervalos variando de dias a semanas, observaram que apenas as biopsias persistentemente positivas, correlacionava com anticorpo circulante anti HLA.

Com base nestas observações, a revisão da classificação de Banff incorporou a coloração de C4d como critério diagnóstico para rejeição aguda mediada por anticorpos.

1.5. C4d e a classificação de Banff – versões revisadas

1.5.1. Revisão da classificação de Banff- versão 2001.

A revisão da classificação de Banff, versão 2001, estabelece como tríade diagnóstica da rejeição mediada por anticorpo a evidência morfológica, a presença de anticorpos circulantes anti HLA do doador e os depósitos de C4d em capilares peritubulares [Racusen et al, 2003]. (Tabela 1)

Tabela 1 : Definição de rejeição aguda mediada por anticorpos , de acordo com a classificação de Banff 2001.

Evidência morfológica de lesão renal aguda	Necrose tubular aguda Presença de neutrófilos e/ou células mononucleares em CPT e/ou glomérulo e/ou trombose capilar Arterite intimal / necrose fibrinóide ou intramural e/ou inflamação arterial transmural.
Evidência do depósito tecidual de anticorpo	C4d e/ou depósito de imunoglobulina em CPT. Depósito de imunoglobulina em áreas de necrose fibrinóide arterial.
Evidência de anticorpo circulante	Anticorpo circulante anti HLA do doador. Anticorpo anti antígeno endotelial do doador.

1.5.2. Revisão da classificação de Banff- versão 2005.

Em 2005, foi realizada nova atualização da classificação de Banff, com as seguintes mudanças:

a) Subdivide a rejeição mediada por anticorpo em rejeição aguda mediada por anticorpo e rejeição crônica ativa mediada por anticorpo.

b) Inclui, na classificação de rejeição borderline, a presença de tubulite moderada (t2 ou t3), com inflamação intersticial ausente ou leve (i0 ou i1).

c) Inclui novas categorias, como rejeição aguda e rejeição ativa mediada por célula T.

d) Substitui o termo Nefropatia Crônica do Enxerto, sem etiologia específica, por Fibrose Intersticial e Atrofia Tubular (FI/AT).

e) Ressalta a importância da glomerulite do transplante e da capilarite.

A inclusão de glomerulite do transplante adiciona um quadro novo ao diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos, ou seja, o encontro de infiltrado inflamatório em glomérulo, com presença de células circulantes, especialmente de macrófagos. Este acometimento glomerular foi associado à presença de

proteinúria e também à menor sobrevida do enxerto. Em estudo retrospectivo, Batal e cols observaram que biopsias com glomerulite apresentavam maiores graus de lesão de capilar peritubular e expressão de fator de Von Willebrand, sugerindo dano endotelial em microcirculação [Batal et al, 2008; Batal et al, 2012].

Além da glomerulite por macrófagos, a capilarite, principalmente por neutrófilos, é um importante marcador histológico de rejeição mediada por anticorpos em enxerto renais e cardíacos, havendo correlação direta entre o infiltrado de neutrófilos e células mononucleares com a expressão de C4d em capilares peritubulares [Böhmig et al, 2002; Magil & Tinckam, 2003; Magil 2009].

Assim, a quantificação das células inflamatórias nos capilares peritubulares definiria a gravidade da lesão (tabela 2)

Tabela 2: Classificação de capilarite de acordo com o número de células/capilar peritubular (adaptado de Solez et al, Am J Transplant 2007).

Ptc 0	Presença mínima de células inflamatórias
Ptc 1	3 a 4 células inflamatórias
Ptc 2	5 a 10 células inflamatórias
Ptc 3	Acima de 10 células inflamatórias

Apesar da associação entre escores elevados de lesão com rejeição mediada por anticorpo e de escores baixos com dano crônico do enxerto, a presença de capilarite não apresenta correlação com patologia específica, não sendo achado patognomônico de rejeição [Solez et al, 2007; Solez et al, 2008].

1.6. Importância da extensão dos depósitos de C4d: focal versus difuso

A presença de depósitos difusos de C4d ao longo do capilar peritubular é definido classicamente como resultado positivo [Collins et al, 1999; Crespo et al, 2001; Mauiyedi et al, 2002; Sund et al, 2003; Poduval et al, 2003]. Entretanto, a presença de depósitos focais permanece controversa. Alguns estudos observaram correlação entre depósitos focais de C4d com menor sobrevida do enxerto e com a presença de anticorpos circulantes anti HLA [Feucht et al, 1991; Solez et al, 2008]. Entretanto, outros grupos não observaram diferença na histologia, função renal e na sobrevida do enxerto ao final de 1 ano, comparando biopsias com C4d focal e C4d negativo [Feucht et al, 1993; Collins et al, 1999; Lederer et al, 2001; Regele et al, 2001; Herzenberg et al 2002; Lederer et al 2001; Nickleit et al 2002; Magil & Tinckam, 2006; Nadasdy et al, 2005; Seemayer et al, 2007; Batal et al 2008; Haririan et al 2009; Fior et al, 2010].

O depósito focal de C4d é consequência dos fatores de inibição, que impedem a propagação da cascata de complemento e da dinâmica do C4d, semelhante a dinâmica dos depósitos de imunocomplexos, o qual se deposita, inicialmente em mesângio glomerular e nas arteríolas do polo vascular, em rins normais [Collins et al, 1999; Nickleit et al, 2002; Feucht et al, 2003, Sund et al, 2003]. Estudos experimentais demonstraram que depósitos focais de C4d podem progredir para depósitos difusos, dependentes da persistência do estímulo inicial e da atividade dos fatores reguladores da cascata de

complemento [Feucht et al, 1991, Feucht et al, 1993; Collins et al, 1999; Mayuhyedi et al, 2002; Racusen et al, 2003; Solez et al, 2008].

1.7. Importância dos depósitos de C4d em biópsias sem rejeição aguda

Depósitos de C4d, na ausência de rejeição aguda foram descritos nos estudos iniciais de Feucht et al (1993). Estudos subsequentes demonstraram a presença de C4d em capilares peritubulares em biópsias sem sinais de rejeição, variando de 13 a 46%, tanto em biópsias protocolares como naquelas indicadas por disfunção do enxerto [Feucht et al, 1993; Regele et al, 2001; Nicleit et al, 2002; Sis et al, 2010]. Estes depósitos foram observados em biópsias com necrose tubular aguda, fibrose intersticial, atrofia tubular e/ou toxicidade por inibidores de calcineurina [Mayuhyedi et al, 2002; Nicleit et al, 2003]. Também foram descritos depósitos de C4d em biópsias sem infiltrado inflamatório, em pacientes com anticorpos anti HLA circulantes detectáveis [Sund et al 2003].

O depósito de C4d em capilares peritubulares, em biópsias sem evidência morfológica de rejeição foi acrescentado à classificação de Banff, categorizado como rejeição mediada por anticorpo. Esta categoria inclui os seguintes achados morfológicos: ausência de rejeição aguda ou crônica, glomerulite, glomerulopatia do transplante, capilarite, laminação da membrana basal de capilares peritubulares, além da presença de depósitos de C4d e detecção de anticorpo circulante anti HLA [Solez et al, 2008].

O significado do depósito de C4d em capilares peritubulares, na ausência de rejeição ainda não está estabelecida, pela ausência de estudos randomizados. Porém, a presença de C4d pode atuar como fator preditor de prognóstico individual, independente dos achados morfológicos [Regele et al, 2001]. Assim, recomenda-se a pesquisa rotineira de C4d em biópsia renal com disfunção de enxerto, mesmo na ausência de achados histológicos de rejeição mediada por anticorpos [Haas et al, 2002; Feucht et al, 2005; Solez et al, 2008; Haas et al, 2010].

1.8. Depósitos de C4d e alterações histológicas

1.8.1. Alterações agudas

Os depósitos de C4d podem ser observados em associação com diferentes alterações morfológicas, incluindo: a) tubulite neutrofílica, b) glomerulite, c) presença de microtrombos em arteríolas e capilares glomerulares, d) arterite intimal com necrose fibrinóide, e) necrose tubular aguda extensa, f) infiltrado de polimorfonucleares em interstício, glomérulos e capilares peritubulares [Trpkov et al, 1996, Regele et al, 2001; Böhmig et al, 2002; Herzenberg et al, 2002; Nickeleit et al, 2002; Mayuıyyedi et al, 2002; Mengel et al, 2005], sendo a NTA a única alteração histológica em 10 % dos pacientes com C4d positivo[Mayuıyyedi et al, 2002]. A presença de infiltrado de polimorfonucleares em capilares peritubulares (capilarite) ou glomerulares (glomerulite) e a ocorrência de microtrombos em pequenos vasos são as alterações morfológicas com maior

sensibilidade (88 a 96%) e especificidade (58 a 74%) para os depósitos de C4d, refletindo o dano endotelial. Em contraste, as lesões associadas à rejeição mediada por células T, como tubulite e arterite intimal não apresentam correlação específica com os depósitos de C4d [Collins et al, 1999; Regele et al, 2001; Böhmig et al, 2002; Nickleit et al, 2002].

1.8.1 Alterações crônicas

O depósitos de C4d em biópsias renais correlaciona com alterações histológicas agudas compatível com rejeição mediada por anticorpo, entretanto o significado destes depósitos e alterações histológicas crônicas permanece controversa. Parte desta dificuldade decorre da inespecificidade das lesões crônicas, constituídas principalmente por fibrose intersticial e atrofia tubular, achado frequente na maioria dos rins transplantados ao final do primeiro ano pós transplante. As primeiras classificações de Banff consideravam todas as alterações crônicas em conjunto, denominadas nefropatia crônica do transplante, reunindo tanto alterações imunológicas como não imunológicas. Com o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, a classificação de Banff de 2005 reavaliou o termo nefropatia crônica, dividindo esta entidade em subgrupos, de acordo com a etiologia e presença de alterações histológicas características. Assim, os casos sem causa definida passaram a ser classificados pela intensidade da lesão de atrofia tubular (AT) e fibrose intersticial (FI). A presença de

espessamento da camada íntima arterial, com infiltrado de células mononucleares e a duplicação da membrana basal glomerular passaram a constituir o grupo de rejeição crônica mediada por anticorpos, com glomerulopatia do transplante, onde a presença de C4d pode ser observada [Racusen et al, 1999; Mayuhyedi et al, 2001, Batal et al, 2011].

1.9. Relação entre infiltrados inflamatórios ricos em macrófagos e os depósitos de C4d.

Os macrófagos constituem uma população celular heterogênea, cuja funcionalidade depende do equilíbrio entre fatores estimulantes e inibitórios. Em biopsias renais, 30 a 60% dos infiltrados inflamatórios são constituídos por macrófagos, que participam da ativação de células T e regulam a interação entre os diferentes tipos celulares (células residentes e circulantes), contribuindo para a gravidade e extensão dos infiltrados inflamatórios. As quimiocinas liberadas pelos macrófagos também atuam na regulação dos mecanismos de reparo e cicatrização tecidual [Grimm et al, 1999, Kozakowski & Regele, 2009].

A presença de macrófagos e/ou neutrófilos em capilares peritubulares é sugestiva de rejeição aguda mediada por anticorpos [Moll & Pascual, 2005]. A infiltração de macrófagos em glomérulo ou interstício, em biopsias com rejeição celular aguda, sugere um quadro mais intenso, com pior prognóstico e menor sobrevida de enxerto, principalmente nos casos de glomerulite severa (acima de g1/g2) [Magil et al, 2003]. Estudos demonstraram correlação entre a presença

de macrófagos glomerulares com capilarite [Magil et al, 2003] e com depósitos de C4d em capilares peritubulares [Magil et Tinckam, 2005]. A relação aumentada entre monócitos/linfócitos T também apresentou associação com depósitos de C4d [Fahim et al ,2007].

Em resumo, o significado clínico da rejeição classificada como borderline permanece controverso, gerando dúvidas quanto à instituição ou não da terapêutica específica antirejeição. Por outro lado, o achado de depósitos de C4d em capilares peritubulares e a presença de infiltrado de macrófagos em glomérulos são considerados como marcadores de mau prognóstico, sugerindo mediação por anticorpos.

Assim, consideramos a hipótese de que, a presença de depósitos de C4d em capilares peritubulares, associados com infiltração macrofágica, em biópsias de rins transplantados, classificados como rejeição borderline, seriam marcadores de pior prognóstico, quando comparados a biópsias com alterações borderline sem estes marcadores.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a presença de depósitos de C4d em capilares peritubulares de biopsias de rim transplantado, classificadas como borderline, de acordo com a classificação de Banff 1997.

2.2. Objetivos Específicos

- i) Correlacionar a presença de C4d em CPT com o infiltrado de macrófagos em glomérulo e interstício.
- ii) Estabelecer, de forma retrospectiva, correlação entre C4d em capilares peritubulares, infiltrado de macrófagos e o prognóstico do enxerto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Metodologia

3.1.1 Desenho do Estudo

Estudo de coorte histórica e prospectiva, baseado na análise de fragmentos de biópsia renal com diagnóstico de rejeição aguda borderline, selecionados a partir do banco de biópsias renais de transplantes do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM Unicamp (CEP 162/2003).

3.1.2 Critérios de inclusão:

- a) Biópsia de rim transplantado, com diagnóstico inicial histológico de rejeição aguda borderline definida como presença de foco de tubulite com infiltração de uma a quatro células mononucleares por seção tubular, inflamação intersticial em 10 a 25% do parênquima cortical, e ausência de arterite intimal.
- b) Biópsia realizada no período de julho de 1986 a julho de 2003.
- c) Primeira biópsia renal realizada nos 6 primeiros meses após o transplante.

d) Biópsia com material adequado para análise morfometria e para imunohistoquímica de C4d e Macrófago.

e) Transplante renal realizado no serviço de Nefrologia da UNICAMP.

3.1.3. Critérios de exclusão:

a) Receptores pediátricos, com idade <18 anos.

b) Biópsia renal inicial com diagnóstico diferente de rejeição borderline.

c) Material de biópsia sem condição para recuperação e reanálise.

d) Material inadequado para imunohistoquímica de C4d ou Macrófagos

e) Informações insuficientes nos prontuários médicos.

3.1.4. Informações dos pacientes, obtidas a partir dos prontuários médicos:

a) Histórico do paciente transplantado: sexo, idade, etiologia da insuficiência renal crônica, antecedentes patológicos, transplante renal prévio e tempo de diálise.

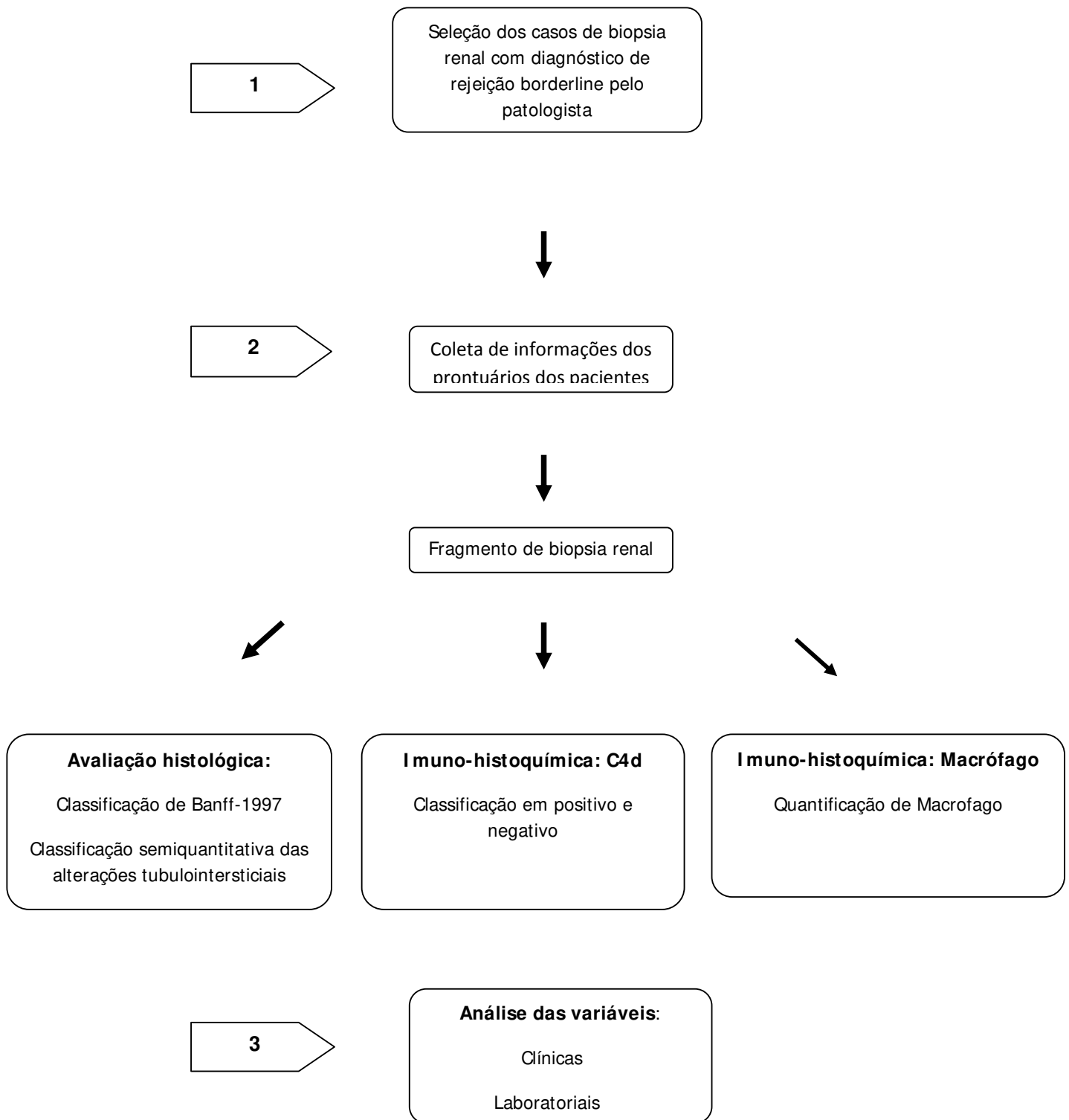
b) Características do transplante renal: tipo de doador (vivo relacionado/falecido), causa de morte encefálica do doador falecido, idade do doador, tempo de isquemia fria e imunossupressão inicial.

c) Intercorrências após transplante: ausência de diurese imediata, necessidade de diálise, data e indicação da biópsia renal, diagnóstico histológico e creatinina sérica na data da biópsia, nos dias: 1, 7, 14, 21 e 28 e nos meses 6, 12 e 24 após o transplante.

3.1.5 Desfechos Avaliados:

- a) Função renal (creatinina sérica ao final de 6 meses, 1 ano e 2 anos).
- b) Sobrevida de enxerto e paciente em 6 meses, 1 ano e 2 anos.

3.1.6 Algoritmo do Estudo



3.1.7 Biopsias renais

Trinta e sete pacientes foram inicialmente selecionados, entretanto 6 pacientes foram excluídos devido material de biópsia sem condição para recuperação (n=3), material inadequado para imunohistoquímica de C4d (n=2), informações insuficientes nos prontuários médicos(n=1).Deste modo, trinta e um pacientes que preencheram os critérios de inclusão e constituíram o grupo de estudo, foram submetidos a 5 biópsias percutâneas do enxerto, sendo as 31 primeiras classificadas como borderline. Vinte e três biopsias sequenciais (1 a 5 biopsias/paciente) foram avaliadas, independente do diagnóstico histológico. Todas as biópsias foram avaliadas e classificadas por um patologista renal do Departamento de Anatomia Patológica da FCM UNICAMP.

3.1.7.1 Procedimento da biópsia renal do rim transplantado

Os pacientes apresentavam pressão arterial controlada e coagulograma normal para a realização da biópsia renal percutânea. Após avaliação do enxerto renal por ultrassonografia, para afastar os diagnósticos de obstrução vascular ou ureteral, a biópsia foi realizada na borda lateral do pólo superior do rim transplantado. Para o procedimento, foi utilizado material estéril e anestesia local. Os fragmentos foram retirados com agulha de Vin Silvermann- Franklin. Após o procedimento, os pacientes foram submetidos à compressão mecânica do local da biópsia por cerca de 10 minutos e mantidos em repouso absoluto no leito por

12 horas, período em que se monitorizou a pressão arterial, a diurese e a presença de hematúria, através de inspeção visual de amostra de urina em ocasiões separadas.

Em geral, foram obtidos um a dois fragmentos do tecido renal, embebidos em solução fisiológica (NaCl 0.9%) e fixados em solução de Dubosque Brasil. Os fragmentos foram processados e emblocados em parafina. Secções de 4 micra de espessura foram coradas com hematoxilina eosina, tricrômico de Masson e com ácido periódico de Schiff (PAS).

3.1.8. Avaliação morfológica

Para o presente estudo, os fragmentos de biopsia foram reavaliados utilizando como base a Classificação de Banff 1997 e uma escala semiquantitativa de acometimento túbulo intersticial. Os parâmetros analisados foram os seguintes:

Glomérulos: número de glomérulos; número de polimorfonucleares (PMN) /glomérulo.

Vasos: número de artérias; presença de trombos hialinos; presença de lesão vascular, presença de endoteliose.

Compartimento túbulo-intersticial: presença e intensidade de tubulite; grau de cronicidade; número de polimorfonucleares na luz de capilares peritubulares; presença e intensidade de alterações tubulares degenerativas; presença e intensidade de alterações tubulares regenerativas; presença e intensidade de

fibrose intersticial e atrofia tubular; percentual de infiltrado intersticial, presença de espessamento da membrana basal tubular.

Todas as biopsias foram submetidas à análise semi-quantitativa das alterações tubulointersticiais, utilizando uma escala de 0 a 3 para quantificar as seguintes alterações tubulointersticiais agudas e crônicas: alterações tubulares (atrofia, alteração epitelial aguda e tubulite) e intersticiais (inflamação e fibrose).

Tabela 3: Análise semi-quantitativa das alterações tubulointersticiais

Escore	Alterações tubulares			Alterações intersticiais	
	Atrofia	Alteração de epitélio tubular	Espessamento de MB tubular	Fibrose	Inflamação
0	0	0	0	0	0
1	1-10%	Discreta	Leve	1-5%	1-10%
2	11-25%	NTA regeneração	moderada	6-10%	11-25%
3	> 25%	NTA degeneração	Grave	> 10%	> 26%

NTA: necrose tubular aguda, MBT= membrana basal tubular

Para avaliação da necrose tubular aguda foram utilizados os seguintes critérios:

(1) Achatamento focal e perda de células do epitélio tubular proximal associado ou não à perda da borda em escova de células tubulares;

(2) Achatamento difuso e perda de células do epitélio tubular proximal, ou necrose focal desse epitélio, ou ambos;

(3) Necrose de algumas ou de todas as células epiteliais em mais que 50% dos túbulos proximais presentes.

3.1.9 Imunohistoquímica

3.1.9.1 Imunohistoquímica para C4d

Fragmentos de biópsia com 4 µm de espessura foram fixados em lâminas tratadas com 3-aminopropiltrietoxissilano (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), desparafinizadas e hidratadas em álcoois com concentrações crescentes. A peroxidase endógena foi bloqueada com água oxigenada 3%, seguida de lavagem em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4). Foi utilizado o anticorpo primário policlonal de coelho anti C4d humano (Imunoglobulina de classe G (IgG); Biomédica Gruppe, Viena, Áustria), diluição 1:1000 em solução tamponada de fosfato com albumina bovina (PBS/BSA) 1% e incubado durante a noite em temperatura de 4°C. Após lavagem com PBS/BSA (pH 7,4), foi aplicado o anticorpo secundário biotinizado de cabra anti IgG coelho (Novocastra, Newcastle, Reino Unido) diluição 1:400 em 1% PBS/BSA e incubado em temperatura ambiente por 30 minutos. Foi então utilizado o

sistema de revelação avidina /biotina peroxidase (Super ABC Kit, Novocastra, Newcastle, Reino Unido). Diaminobenzidina (DAKO, Carpinteria, CA, EUA) foi utilizado como cromógeno, e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha), desidratadas em hidratadas em álcoois com concentrações decrescentes, tratadas com xilol e as lamínulas foram montadas com Entellan (Merck,Darmstadt, Alemanha).

Como controle positivo foi utilizado fragmento de biópsia renal com diagnóstico de glomerulonefrite membranosa, e como controle negativo fragmento de rim normal obtido a partir de nefrectomia por tumor renal. Como controle negativo também foi utilizado um fragmento de biopsia renal com omissão do anticorpo primário ou do anticorpo secundário.

3.1.9.2 Quantificação da imunohistoquímica para C4d.

Todas as biopsias foram analisadas pelo autor e classificadas em positivas ou negativas para C4d. Foram excluídas da análise áreas com fibrose intersticial e/ou necrose, arteríolas com hialinose e glomérulos com áreas de esclerose. Os resultados foram expressos em número de capilares peritubulares acometidos/campo cortical. A coloração do mesângio foi utilizada como controle de qualidade interna.

As biopsias renais foram classificadas em C4d negativa ou C4d positiva (focal ou difusa), de acordo com a seguinte definição [Mengel et al, 2005]: C4d negativa: <25% dos CPT com coloração para C4d ou depósito incompleto

na circunferência do CPT (figura 1a)

C4d positivo focal: 25 a 50 % dos CPT corados para C4d, envolvendo toda a circunferência do CPT. C4d positivo difuso: mais de 50% dos CPT corados para C4d,envolvendo toda a circunferência do CPT (figura 1b).

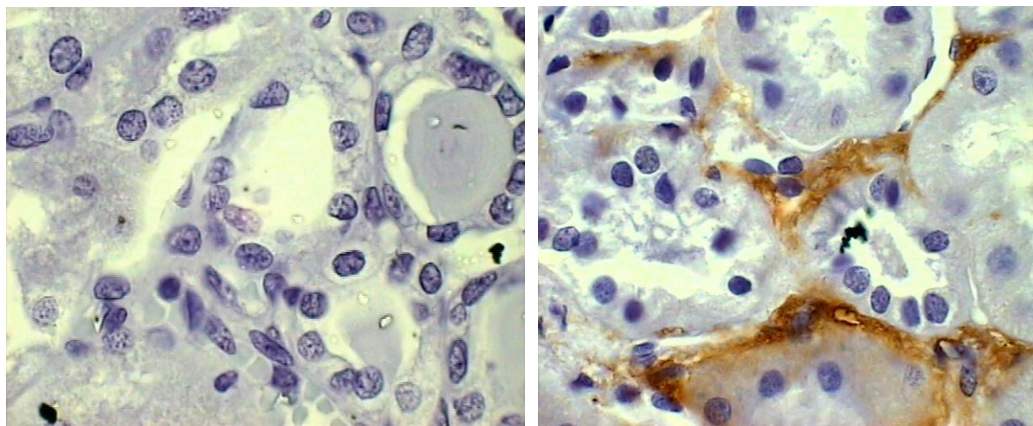


Figura A

Figura B

Figura 1: Imunohistoquímica para C4d, contra coloração com HE, aumento 1000x (imersão). A- ausência de coloração em capilares peritubulares, C4d negativo, B: C4d positivo, com delineamento de toda a extensão do capilar peritubular (seta).

3.1.9.3. Imunohistoquímica para macrófago

Fragmentos de biópsia com 4 µm de espessura, fixados em lâminas previamente silanizadas, foram desparafinizadas e hidratadas em álcoois progressivos. A peroxidase endógena foi bloqueada com água oxigenada 3%. Para a reativação antigênica foi utilizado tampão citrato de sódio 0,01M em pH

6.0, seguida.

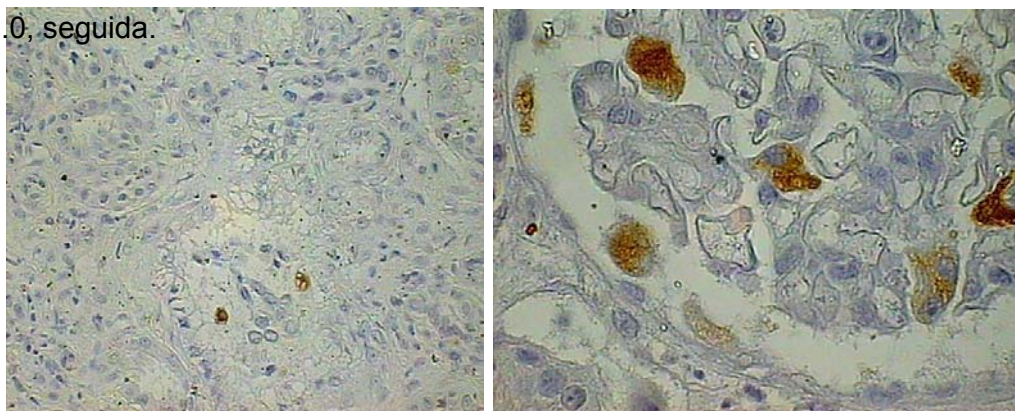


Figura A

Figura B

Figura 2. Imunohistoquímica para macrófago, coloração de macrófago intersticial [A], (aumento 100x) e em glomérulo [B], (aumento 1000x).

3.1.9.4 Quantificação da Imunohistoquímica para macrófagos:

A quantificação do número de macrófagos em interstício cortical foi realizada através da contagem de células positiva por campo microscópico, em aumento de 400 vezes utilizando grid 10x10, em toda a extensão cortical, com o auxílio do programa computadorizado KS300 (Zeiss, Alemanha). Os resultados foram expressos em numero de células positivos/mm².

A quantificação dos macrófagos glomerulares foi realizada pela contagem de células positivas/glomérulo.

3.1.10 Protocolos de Imunossupressão

Imunossupressão de manutenção: Consistiu de um inibidor de síntese de purinas: azatioprina (1- 2 mg/kg/dia), ou micofenolato mofetil (2 gramas/dia), via oral. Para os receptores de rim de doador vivo relacionado não idêntico ou de doador falecido, foi associado um inibidor de calcineurina, ciclosporina (7mg/kg/dia) ou tacrolimus (0,2 mg/kg/dia), via oral, divididos em 2 doses/dia. A dose diária de ciclosporina foi ajustada de acordo com o nível sanguíneo, (C0/vale entre 100 e 200 ng/ml). Os níveis sanguíneos de tacrolimus foram mantidos entre 7 e 10 ng/ml no primeiro mês após o transplante.

Terapia de resgate: Episódios de rejeição aguda foram tratados com pulso de Metilprednisolona (500 mg, intravenoso, durante 3 dias). Para os casos considerados córtico resistente, foi utilizado Anticorpo monoclonal anti receptor CD3 (OKT3), na dose de 5mg/kg/dia, intravenoso, durante 10 dias.

3.1.11 Análise Estatística.

Variáveis numéricas foram expressas em média $\pm$ desvio padrão. A análise da variação entre grupos foi realizada através de teste t Student. Para as variáveis não numéricas, foi utilizado teste qui quadrado ou exato de Fisher. Significância estatística foi considerada se $p < 0,05$. Para os testes estatísticos foi utilizado o programa estatístico Statview versão 2.0.

4. RESULTADOS

4.1. Características do grupo de estudo

A partir da análise do banco de biopsias renais de pacientes transplantados renais, foram selecionados 31 casos que preenchiam os critérios de inclusão, ou seja, receptores de transplante renal, submetidos à biópsia renal percutânea, com diagnóstico histológico inicial de rejeição borderline, e com material disponível para reanálise.

Todas as biopsias foram indicadas por disfunção de enxerto, definida como aumento de 25% na creatinina basal ou pela queda do débito urinário.

Este grupo de pacientes era, em sua maioria, do sexo masculino (n=23, 74%), receptores de rim de doador falecido (n=24, 77%), com idade média de 37 anos (20 a 56 anos). Dentre os 7 receptores de rim de doador vivo relacionado, 3 apresentavam HLA idêntico e quatro HLA haploidentico. A causa da insuficiência renal crônica foi glomerulonefrite crônica em 7, nefrosclerose hipertensiva em 4, pielonefrite crônica em 2. Em 18 indivíduos, o diagnóstico etiológico da IRC não pode ser determinado. O tempo de tratamento dialítico antes do transplante foi de 55 ± 33 meses (8 a 120 meses). A maioria dos pacientes (n=29) foi submetida ao primeiro transplante. A média de idade dos doadores foi 32 ± 12 anos. Para os doadores falecidos, a causa de morte encefálica foi traumatismo craniano (n=14), hemorragia subaracnóide (n=4), acidente vascular cerebral hemorrágico (n=2) e outros (n=4).

O tempo médio de isquemia fria, para receptores de doador falecido foi de 21 ± 5 horas. Para receptores de doador vivo o tempo de isquemia fria não foi

considerado significativo, uma vez que as cirurgias de doador e receptor foram realizadas simultaneamente.

Retardo de função renal do enxerto ocorreu em 25 pacientes, sendo 24 receptores de rim de doador falecido. A maioria dos pacientes não apresentava sensibilização prévia aos antígenos HLA, e apenas 1 dos pacientes incluídos foi considerado hipersensibilizado (reatividade contra painel > 50%). Como os transplantes avaliados foram realizados até 2003, a especificidade dos anticorpos circulantes anti HLA não estava disponível.

As biopsias renais do enxerto foram indicadas por elevação da creatinina acima de 25% de seu valor basal, isoladamente (n=10) ou acompanhada de redução da diurese (n=21). A mediana do primeiro procedimento de biópsia foi 11 dias após o transplante renal.

4.2. Imunosupressão

4.2.1. Indução

Metilprednisolona 500 mg, intravenoso, foi administrada imediatamente antes do procedimento de transplante a todos os pacientes. Indução adicional com Basiliximab (Simulect®, Novartis S.A.) 20mg/dia, intravenoso, em duas doses, uma imediatamente antes da anastomose vascular e a outra no quarto dia pós operatório foi realizada em 5 indivíduos, indicada por tempo de isquemia fria > 24 horas e/ou reatividade contra painel > 10%. Um paciente, considerado

hipersensibilizado (PRA > 50%), utilizou indução com anticorpo monoclonal anti CD3 (OKT3) 5mg/dia, intravenoso, durante 10 dias.

4.2.2. Manutenção

A maioria dos pacientes utilizou esquema imunossupressor constituído por azatioprina, ciclosporina e prednisona (n= 27, 87%). Quatro pacientes utilizaram outras associações de imunossupressores como Azatioprina + Tacrolimus + Prednisona; Micofenolato mofetil (MMF) + Ciclosporina + Prednisona, Ciclosporina + Prednisona e MMF + Prednisona.

4.3. Características dos pacientes de acordo com a expressão de C4d nas biopsias iniciais

Para efeito de análise, os pacientes foram inicialmente divididos, de acordo com a expressão de C4d na primeira biópsia renal, em dois grupos: C4d positivo (n=12) e C4d negativo (n=19). Não houve diferença significativa nas características demográficas, entre os grupos C4d negativo e positivo (tabela 4)

Tabela 4: Características dos pacientes, de acordo com a presença de C4d na primeira biópsia renal.

	C4d negativo (n= 19)	C4d positivo (n= 12)	P
Idade do paciente (anos)	40 ± 10	32 ± 8,7	Ns
Sexo (masculino: feminino)	14: 5	9: 3	Ns
Transfusão >5 bolsas (%)	6 (32%)	3 (25%)	ns
Doador (vivo: falecido)	5:14	2;10	Ns
Idade do doador (anos)	31±11	35±13	Ns
Isquemia fria (horas)	21 ± 6,7	20 ± 6,7	Ns
Retardo de função renal (%)	14 (74%)	11 (92%)	<0,05
Tempo para realização da primeira biópsia (dias)	28 ± 40	10 ± 3,1	<0,05

O grupo C4d positivo apresentou maior incidência de retardo de função renal, com necessidade de terapia dialítica de suporte (92% *versus* 74%, C4d positivo *versus* C4d negativo, $p<0,05$), o que pode explicar a indicação mais precoce de biópsias renais neste grupo (10 ± 3,1 *versus* 28 ± 40 dias, $p<0,05$) (tabela 5).

Tabela 4: Evolução de função renal imediata após o transplante, nos diferentes grupos.

	C4d negativo	C4d positivo	P
	(n= 19)	(n= 12)	
Retardo de função renal (%)	14 (74%)	11 (92%)	<0,05
Tempo para realização da primeira biópsia (dias)	28 ± 40	10 ± 3,1	<0,05

4.4. Análise das biópsias

Todas as biópsias inicialmente classificadas como borderline, foram reavaliadas, com quantificação morfometria e adequação à classificação de Banff 1997.

4.4.1 Análise morfómetria

A análise dos índices morfométricos das 31 biópsias iniciais demonstrou maiores índices de necrose tubular aguda degenerativa e menores índices de inflamação intersticial no grupo cuja primeira biópsia foi classificada como C4d positiva (tabela 6).

Tabela 6: Parâmetros morfométricos das biopsias renais iniciais, com diagnostico de Rejeição borderline, divididas de acordo com a expressão de C4d.

	C4d negativo	C4d positivo	P
	(n= 19)	(n= 12)	
Numero de glomérulos por fragmento	8,2 ± 6,0	7,8 ± 5,1	Ns
Numero de artérias por fragmento	1,7 ± 1,2	1,0 ± 1,0	Ns
Inflamação intersticial (%)	8,6 ± 7,6	4,7 ± 3,6	0,007
NTA degenerativa (escore)	0,3 ± 0,7	1,4 ± 1,4	<0,0001
NTA regenerativa (escore)	1,0 ± 0,8	1,3 ± 1	Ns
Fibrose Intersticial (escore)	1,4 ± 0,8	1,7 ± 0,8	Ns
Atrofia tubular (escore)	0,4 ± 0,7	1,0 ± 1,0	Ns
PMN em CPT (%)	21	41	0,04
PMN em glomérulos (%)	21	17	Ns
Espessamento MBT (escore)	12,8 ± 4,8	11,0 ± 3,5	Ns0,05

4.4.2 Análise de acordo com a classificação de Banff 1997

A aplicação dos escores da Classificação de Banff 1997 para estas biopsias mostrou que o grupo C4d positivo apresentava menores índices de

fibrose intersticial (ci) e atrofia tubular (ct) comparado ao grupo C4d negativo. Não foram observadas diferenças nos demais parâmetros analisados. Em nenhum dos fragmentos analisados foi observada arterite intimal (v) (tabela 7).

Tabela 7. Distribuição dos achados morfológicos nas biópsias renais iniciais, de acordo com a classificação de Banff/97, divididas de acordo com a expressão de C4d.

	C4d negativo	C4d positivo	P
	(n= 19)	(n= 12)	
Tubulite (t)	0,7 ± 0,5	0,3 ± 0,7	Ns
Atrofia tubular (ct)	0,6 ± 0,9	0,1 ± 0,3	0,01
Inflamação intersticial (i)	0,9 ± 0,9	0,7 ± 0,7	Ns
Fibrose intersticial (ci)	0,7 ± 0,9	0,3 ± 0,5	0,02
Glomerulite (g)	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,4	Ns
Glomerulopatia do enxerto (cg)	0,9 ± 0,6	1,4 ± 0,9	Ns
Aumento matriz mesangial (mm)	0,9 ± 0,6	1,0 ± 0,5	Ns
Espessamento de intima vascular (cv)	0,5 ± 0,8	0,3 ± 0,5	Ns
Espessamento hialino arteriolar (ah)	0,7 ± 0,7	0,5 ± 1,0	Ns

4.4.3 Infiltrado de macrófagos

A quantificação da infiltração intersticial de macrófagos, avaliada por meio de imunohistoquímica, foi semelhante entre os grupos C4d negativo e C4d positivo ($p=ns$). Entretanto, observamos maior número de glomérulos com infiltrado de macrófagos no grupo C4d+ (42% *versus* 25%, C4d+ *versus* C4d-, $p<0,05$).

4.5. Evolução da função renal e necessidade de biopsias sequenciais

Em dezesseis pacientes que cursaram com recuperação de função renal (creatinina sérica $1,8 \pm 0,2$ mg/dl), não foi indicado novo procedimento de biopsia. Os quinze indivíduos restantes, com déficit persistente de função renal (média de creatinina sérica $4,9 \pm 0,7$ mg/dl) foram submetidos a nova biopsia renal do enxerto, em média 35 ± 25 dias após o transplante.

4.5.1. Segunda biópsia renal

No grupo inicialmente C4d negativo, 7/19 (37%) pacientes submetidos a segunda biopsia apresentaram como diagnóstico: rejeição borderline ($n=3$), rejeição aguda Banff 1A ($n=1$), rejeição aguda Banff 2A ($n=1$) e necrose tubular aguda isolada ($n=2$). A pesquisa de C4d resultou positiva em 5 destas biópsias, classificadas como: rejeição borderline ($n=2$), rejeição aguda Banff 1A ($n=1$), rejeição aguda Banff 2A ($n=1$) e NTA isolada ($n=1$). No grupo previamente C4d positivo, 9/12 (75%) pacientes foram submetidos a novo procedimento de

biopsia, sendo todos diagnosticados como rejeição borderline, isolada (n=6) ou associada a necrose tubular aguda (n=3). A expressão de C4d persistiu em 5 casos, porém a imunohistoquímica resultou negativa em 4 casos, todos com diagnóstico de rejeição borderline isolada.

A necessidade de segunda biopsia poderia estar associada com a maior gravidade da lesão histológica na primeira biopsia. Para avaliar esta hipótese, comparamos os parâmetros morfométricos da primeira biopsia renal, dividindo os pacientes em dois grupos: biopsia única (n=16) e rebiopsia (n=15). Não houve diferença significativa nos parâmetros de gravidade de lesão inicial, nem na intensidade da expressão de C4d. O grupo submetido a nova biopsia apresentava apenas uma tendência à maior frequência de NTA degenerativa. Entretanto, a indicação mais tardia da biopsia renal no grupo com biopsia única pode justificar este achado histológico.

4. 6. Reavaliação pela classificação de Banff 2005

De acordo com a atualização do Banff 2005, as 54 biopsias foram reclassificadas.

Das 31 biopsias iniciais, 12 biopsias C4d+ foram classificadas como suspeitas de rejeição aguda mediada por anticorpos: NTA like (n= 7) e capilarite (n= 5), enquanto que todas as 19 biopsias C4d negativas foram classificadas como rejeição borderline.

Das 23 biopsias subsequentes, 14 biopsias C4d + foram classificadas

como rejeição aguda com suspeita de mediada por anticorpos, tipo NTA like (n=8), rejeição crônica com suspeita de mediação por Ac (n= 5) e rejeição aguda mediada por célula T com suspeita de mediação por Ac (n=1). As nove biopsias C4d negativas foram classificadas como rejeição borderline (n=6), rejeição aguda mediada por células, Banff 1A (n=1) e Banff 1B (n=1) e necrose tubular aguda isolada (n=1).

4.7. Presença de C4d em CPT e função tardia do enxerto

Para análise de função tardia de enxerto e de sobrevida do paciente e do enxerto, no período de 2 anos, foram considerados como C4d positivos os pacientes que apresentaram pelo menos uma biopsia C4d positiva, totalizando um grupo de 17 pacientes (12 com biópsia inicial com C4d positivo e cinco com biópsia inicialmente negativa e que passaram a expressar C4d em capilares peritubulares. Quatorze pacientes, com biópsias persistentemente negativas, constituíram o grupo negativo.

A creatinina sérica por ocasião da primeira biopsia foi comparável entre os grupos C4d positivo e C4d negativo, $8,6 \pm 4,1$ e $7,9 \pm 3,6$ mg/dl.

A avaliação da função renal tardia, através da dosagem de creatinina sérica mostrou que o grupo C4d+ apresentava pior função do enxerto em todos os períodos avaliados: 6 meses ($1,8 \pm 0,8$ *versus* $1,4 \pm 0,5$ mg/dl, $p < 0,01$), 1 ano ($2,1 \pm 1$ *versus* $1,5 \pm 0,5$ mg/dl, $p < 0,01$), e ao final de 2 anos ($2,3 \pm 1,3$ *versus* $1,5 \pm 0,7$ mg/dl, $p < 0,05$). [Gráfico 1].

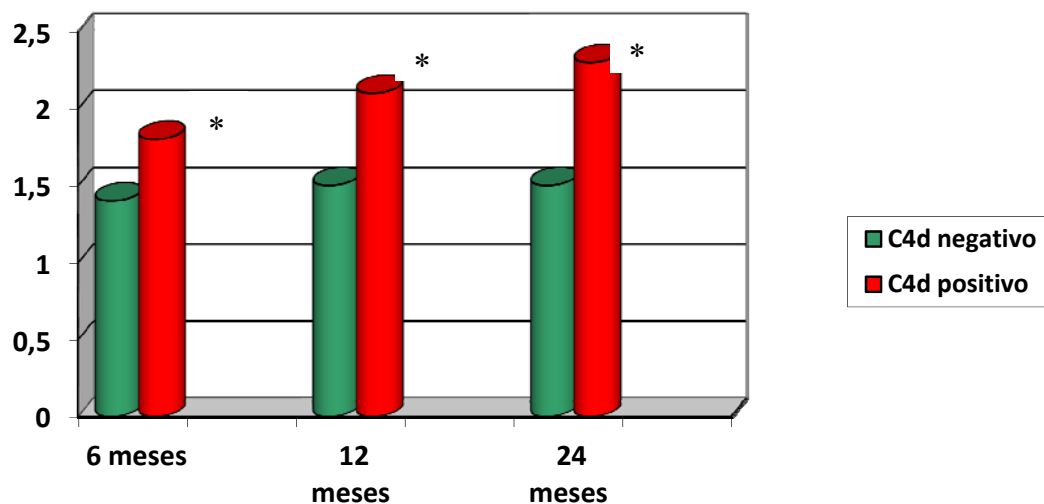


Grafico 1. Creatinina sérica (mg/dl) no periodo de 6, 12 e 24 meses,
no grupo C4d negativo e positivo.

* (p< 0,05)

Perda de enxerto ocorreu em um paciente (7%) do grupo C4d negativo e em três pacientes (18%) do grupo C4d positivo, ao final de acompanhamento de 2 anos, sem diferença estaticamente significativa. Cinco pacientes evoluíram para óbito durante o estudo. Quatro eram do grupo C4d negativo e faleceram por pneumonia, arritmia, infarto agudo do miocárdio e CIVD (3 com enxerto funcionando), e um no grupo C4d positivo por infarto agudo do miocárdio com enxerto funcionando.

5. Discussão

O significado de alterações borderline em biopsias de rins transplantados permanece controverso. Enquanto alguns grupos sugerem que estes achados são variantes do normal, outros consideram estas alterações como clinicamente significativas. Nos últimos anos, o desenvolvimento de novos testes diagnósticos, incluindo a pesquisa de C4d, identificação de biomarcadores e avaliação detalhada de pacientes de risco imunológico, permitiram um melhor entendimento da fisiopatologia da rejeição aguda, com consequente estratificação de risco e adequação terapêutica.

No presente estudo, avaliamos a presença de depósitos de C4d em capilares peritubulares e o infiltrado de macrófagos em biópsias de rins transplantados, indicadas por disfunção do enxerto e com diagnóstico histológico de rejeição borderline, com o intuito de avaliar o impacto destas alterações na sobrevida do enxerto.

Do banco de biopsias renais do programa de Transplante Renal, 31 casos preenchem os critérios de inclusão do estudo, ou seja: diagnóstico de rejeição borderline pelo patologista; ausência de episódios prévios de rejeição; e material de biopsia armazenado em quantidade suficiente para reavaliação e processamento de novas lâminas. Pelo caráter retrospectivo da seleção das amostras, incluindo biopsias renais realizadas entre 1986 e 2003, algumas anteriores à classificação de Banff, optamos por uma reanálise dos parâmetros morfométricos, para padronização da amostra e possibilidade de análise estatística e identificação de marcadores histológicos de prognóstico. A reanálise morfometria mostrou que os escores de inflamação intersticial, tanto

pelos critérios de Banff como por um escore semiquantitativo eram baixos, indicando inflamação intersticial leve. Em nenhum caso observamos arterite intimal ou lesão vascular, compatível com achados de rejeição borderline.

A grande dificuldade na avaliação de biopsias renais classificadas como borderline refere-se ao seu significado clínico: trata-se apenas de uma variante do normal ou estamos frente a um quadro contendo lesões focais de intensidades variadas? De fato, a presença de rejeição borderline deve ser contextualizada considerando o risco imunológico do paciente, a indicação da biopsia renal e a função renal. Afinal, biopsias com rejeição aguda focal podem não apresentar infiltrado intersticial, tubulite e/ou agressão vascular suficientes para a classificação como rejeição aguda, subestimando a severidade da rejeição e sendo, portanto, classificadas erroneamente como borderline [Serón et al, 1997; Saad et al, 1997; Meehan et al, 1999; Jain et al, 2000; Shapiro et al, 2001]. A probabilidade de erro do diagnóstico de rejeição aguda é de cerca de 10%, quando se utiliza um único corte para microscopia óptica [Sund et al, 2004]. A amostra reduzida compromete a avaliação diagnóstica, implicando em baixa correlação entre achados histológicos e função renal [Wang et al, 1998]. Entretanto, para a análise da intensidade do acometimento crônico (fibrose intersticial e atrofia tubular, ou FI/AT) ou para a quantificação de depósitos de C4d em capilares peritubulares pequenos fragmentos são considerados adequados [Serón et al 2002, Nadasdy et al, 2005].

Para avaliarmos a importância dos depósitos de C4d e sua distribuição, dividimos os pacientes em dois grupos, de acordo com a expressão de C4d nas

biopsias iniciais, em C4d positivo (n= 12) e C4d negativo (n=19). A incidência de C4d nesta série foi de 39%, compatível com relatos prévios, com incidência de 30 a 55% em biopsias por indicação [Serón et al, 2002; Nadasdy et al, 2005].

Observamos que os depósitos de C4d foram mais frequentes em biopsias realizadas mais precocemente. O grupo C4d positivo também apresentou maiores escores de severidade de necrose tubular aguda degenerativa, associada a uma maior frequência de retardo de função do enxerto, o que pode explicar a indicação mais precoce do procedimento.

Necrose tubular aguda foi observada em 97% das biopsias avaliadas, contribuindo para a persistência de disfunção do enxerto, independente da presença de depósitos de C4d. Relatos anteriores mostraram que biopsias com rejeição borderline e altos escores de necrose tubular aguda não apresentavam resposta satisfatória ao tratamento anti rejeição [Saad et al, 1997].

No presente estudo, o grupo C4d positivo apresentava índices mais elevados de NTA degenerativa. A correlação entre NTA e C4d é controversa. Enquanto alguns grupos descrevem NTA isolada como único achado histológico em cerca de 10% dos casos de rejeição aguda mediada por anticorpos [Mauuiyyedi et al, 2002; Rajan et al, 2008], outros estudos não observam esta correlação [Nickel et al, 2002], justificando as discrepâncias de resultados pelos critérios de seleção e tempo de realização das biopsias renais, onde biopsias por indicação e realizadas mais precocemente apresentariam maior frequência de C4d associada a NTA. Entretanto, de acordo com o Banff 2005, a presença de NTA associado com C4d e anticorpo é classificada como rejeição

mediada por anticorpo.

Em transplante cardíaco, a presença de C4d precoce está associada à lesão de isquemia/reperfusão [Baldwin et al, 2000]. Entretanto, em transplante renal, dois estudos avaliando biopsias pré ou imediatamente pós reperfusão, não demonstraram depósitos de C4d em capilares peritubulares na primeira hora pós transplante, mesmo quando avaliados receptores submetidos a programas de dessensibilização por prova cruzada positiva [Haas et al, 2006; David-Neto et al, 2011]. Estes estudos sugerem que, em transplante renal, mesmo para pacientes com anticorpos anti HLA pré formados, porém com prova cruzada negativa, a quantidade de anticorpos seria insuficiente para ativar a resposta inflamatória e a cascata de complemento em tão curto período de tempo.

Neste estudo, a presença de inflamação intersticial foi menor no grupo C4d positivo, o que está de acordo com outros estudos que demonstraram que, biopsias com C4d positivo, independentemente do diagnóstico, apresentavam de inflamação intersticial mediada por células T, como tubulite e arterite intimal, compatíveis com o diagnóstico de rejeição aguda celular. Entretanto, em alguns casos pode haver superposição de rejeição aguda mediada por células (RCA) e mediada por anticorpos (RMA), com expressão de C4d em capilares peritubulares. [Feucht et al, 1993; Trpkov et al, 1996; Regele et al, 2001; Lederer et al, 1996; Collins et al, 1999; Crespo et al, 2001; Nickleit et al, 2002; Herzenberg et al, 2002; Lorenz et al, 2004; Kieram et al, 2009, Sis et al 2009]. Como avaliamos biopsias com alterações borderline, a inflamação intersticial

observada era leve, acometendo menos de 10% do tecido analisado. A avaliação por imunohistoquímica também não demonstrou diferença no número de macrófagos em interstício entre os grupos C4d positivo e negativo.

A presença de polimorfonucleares em glomérulo diferiu entre os grupos C4d positivo e negativo. Entretanto, o grupo C4d positivo apresenta um maior percentual de capilares peritubulares com polimorfonucleares, ou maior frequência de capilarite. Este achado é compatível com a fisiopatologia dos depósitos de C4d e a possível mediação da lesão por anticorpos. Capilarite é descrita como achado sugestivo, mas não patognomônico, de rejeição mediada por anticorpos em diferente séries [Regele et al, 2001; Crespo et al, 2001; Mauuiyyedi et al, 2002, Nicleleit et al, 2002; Herzenberg, et al, 2002; Magil et Tinckam, 2003 Mengel et al, 2005; Cosio et al, 2010].

Outro achado histológico frequentemente associado ao depósito de C4d é a glomerulite, especialmente caracterizada pela presença de macrófagos em glomérulos [Magil & Tinckam, 2003; Magil, 2005]. Na presente série, apesar da análise morfométrica não apresentar diferença na ocorrência de glomerulite entre os grupos, observamos um número significativamente maior de glomérulos com infiltrado de macrófagos no grupo C4d positivo. Da mesma forma, houve uma tendência à maior incidência de glomerulopatia do transplante (cg pela classificação de Banff) no grupo C4d positivo. Estas alterações glomerulares foram observadas em biopsias contendo depósitos de C4d tanto focais como difusos. Estudos prévios sugerem que os infiltrados glomerulares de macrófagos seriam fator de risco independente para perda de enxerto em pacientes com

rejeição aguda [Magil & Tinckam, 2003; Magil 2006] e/ou com disfunção do enxerto, em associação com a expressão de C4d em capilares peritubulares [Solez et al, 2007; Batal et al, 2011].

Os sinais histológicos de cronicidade foram menores no grupo C4d positivo em comparação com o grupo C4d negativo, justificado pelo fato dos doadores serem cerca de 4 anos mais jovens. A persistência dos depósitos de C4d também parece estar associada ao pior prognóstico do enxerto. Estudos anteriores, com biopsias sequenciais, mostraram um caráter dinâmico dos depósitos, com surgimento em média 40 dias pós transplante, podendo persistir por meses ou desaparecer em semanas [Regele et al, 2001; Nickleit et al, 2002; Haas et al, 2002; Poduval et al, 2005].

Nesta série, a alta frequência de necrose tubular aguda e a persistência dos níveis elevados de creatinina levaram a indicação de nova biopsia em metade dos casos, independente da presença ou não de depósitos de C4d. A análise das biopsias sequenciais permitiu a avaliação da dinâmica do C4d, que persistiu em 55% dos casos submetidos a rebiopsia, e mantendo o diagnóstico de rejeição borderline isolada ou associada com necrose tubular aguda. Em 71% das biopsias previamente negativas, houve surgimento de depósitos de C4d, associada a achados histológicos de rejeição aguda mediada por células ou necrose tubular aguda persistente. Em 45% das biopsias previamente positivas houve desaparecimento dos depósitos de C4d em biopsias subsequentes, todas com diagnóstico histológico de rejeição borderline isolada.

A presença de depósitos de C4d é associada a um pior prognóstico do

enxerto, e sua persistência considerada como ativação persistente de resposta imune mediada por anticorpos. Assim, diferentes séries sugerem que sensibilização prévia, através de gestações múltiplas, transfusões sanguíneas ou transplantes prévios, e definida como reatividade contra painel > 50% estaria associada com a maior precocidade dos depósitos de C4d [Feuchth et al, 1991; 1993, Regele et al, 2001; Lederer et al, 2001; Crespo et al, 2001; Böhmig et al, 2002; Herzenberg et al, 2002; Mengel et al, 2005; Lorenz et al, 2004]. No presente estudo, apenas 2 pacientes receberam um segundo enxerto renal, e a maioria não era previamente sensibilizada, o que impediu a análise de risco. Outros fatores demográficos analisados, como características do doador, transfusões prévias, função imediata de enxerto, não diferiram entre os grupos C4d positivo e negativo. Estudos prévios com pacientes de baixo risco imunológico também não encontraram associação entre expressão de C4d e estes fatores. [Regele et al, 2001; Herzenberg et al, 2002; Hass et al, 2002; Lorenz et al, 2004]. Da mesma forma, o reduzido número de mulheres nesta série não permitiu a análise do impacto de gestações prévias e/ou do sexo feminino como fator de risco para depósitos de C4d em capilares peritubulares, como sugerido por outros grupos [Lorenz et al, 2004; Regele et al, 2001; Feuchth et al 1991; Crespo et al 2001; Böhmig et al, 2002; Lederer et al 2006].

A importância dos depósitos de C4d na sobrevida e na função renal do enxerto a longo prazo foi avaliada em diversos estudos. Regele et al (2001), observou que pacientes cujas biopsias expressavam C4d, independente da presença de rejeição aguda, apresentavam níveis mais elevados de creatinina

sérica em 6, 12 e 18 meses de acompanhamento, comparados aos paciente com biopsias negativas para C4d, também independente do diagnóstico histológico [Regele et al, 2001]. Chen et al, avaliando 158 biopsias de pacientes transplantados renais, observaram que rejeição aguda e expressão de C4d foram associados com níveis mais elevados de creatinina sérica em 3 e 6 meses, mesmo após o tratamento anti rejeição, quando comparados ao grupo C4d negativo [Chen et al, 2005]. Em estudo recente, Cosio et al observaram que a presença de C4d em biopsias renais, associada com achados histológicos de rejeição borderline com capilarite, e na presença de anticorpos circulantes anti HLA estavam associados a pior função renal do enxerto ao final de 1 ano [Cosio et al, 2010].

Em nossa série, apesar do número reduzido de pacientes avaliados, e do diagnóstico de rejeição borderline, observamos que os níveis de creatinina sérica foram persistentemente mais elevados no grupo C4d positivo. Perda de enxerto também foi mais frequente no grupo C4d positivo, ao final de 2 anos de acompanhamento. Entretanto, a incidência de necrose tubular aguda e de retardo de função do enxerto também foram mais frequentes no grupo C4d positivo, o que pode ter influência na pior função renal tardia.

As limitações deste estudo dizem respeito ao número reduzido de pacientes e à ausência de pesquisa de anticorpos anti HLA do doador, o que confirmaria a associação entre depósitos de C4d e anticorpos circulantes neste grupo, conforme sugerido por estudos prévios [Böhmig et al, 2002]. Mesmo assim, conseguimos determinar que, em biopsias indicadas por disfunção do enxerto e

classificadas como borderline, a presença de C4d foi associada ao infiltrado glomerular de macrófagos e à pior função do enxerto ao final de 1 e 2 anos, com menor sobrevida de enxerto ao final de 2 anos.

6. CONCLUSÕES

1. Em biopsias renais indicadas por disfunção de enxerto e classificadas como borderline, a incidência de depósitos de C4d foi de 39%.
2. Depósitos de C4d foram associados à presença de infiltrados de polimorfonucleares em capilares peritubulares (capilarite), aos maiores índices de necrose tubular aguda degenerativa e à presença de infiltrados de macrófagos em glomérulos, mas não em região intersticial.
3. A presença de C4d em capilares peritubulares foi associada à pior função renal ao final de 1 e 2 anos de acompanhamento pós transplante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Awwa IA, Hariharan S, First MR. Importance of allograft biopsy in renal transplant recipients: correlation between clinical and histological diagnosis. *Am J Kidney Dis* 1998; 6 (supl1):S15-S18.
2. Baldwin W, Qian Z, Ota H, Samaniego M, Wasowska B, Sanfilippo F et al. Complement as a mediator of vascular inflammation and activation in allografts. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19: 723-30.
3. Batal I, Girit A, Zeevi A, Abou Saab B, Stockhausen S, Shapiro R et al. Clinical significance of the distribution of C4d deposits in different anatomic compartments of the allograft kidney. *Mod Pathol* 2008; 21(12):1490-8.
4. Batal I, Azzi J, El Haddad N, Riella L, Lunz J, A, Zeevi et al. Immunohistochemical markers of tissue injury in biopsies with transplant glomerulitis. *Human Pathol* 2012;43: 69-80.
5. Bates W, Davies D, Welsh K, Gray D, Fuggle S, Morris P et al. Evaluation of the Banff classification of early renal allograft biopsies and correlation with outcome. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 2364-9.
6. Beimler J, Zeier M. Borderline rejection after renal transplantation – to treat or not to treat. *Clin Transplant* 2009; 23 (Suppl. 21): 19–25.
7. Böhmig G, Exner M, Habicht A, Schilinger M, Lang U, Kletzmayr J et al. Capillary C4d deposition in kidney allografts: A specific marker of alloantibody-dependent graft

injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1091-9.

8. Cecka J. The UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl* 2002; 1-20, 2002.

9. Cosio F, Lager D, Lorenz E, Amer H, Gloor J, Stegal M. Significance and implications of capillaritis during acute rejection of kidney allografts. *Transplantation* 2010; 89(9): 1088-94.

10. Collins A, Schneeberger E, Pascual M, Saidman S, Williams W, Tolkoff- Rubin N et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: Diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999, 10(10): 2208–2214.

11. Colvin R, Cohen A, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Burke B et al. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, clinical correlation. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1930 – 41.

12. Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Mauiyyedi S, Collins A, Fitzpatrick D et al. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation* 2001, 71(5): 652–658.

13. Davies ET, Nasaruddin BA, Alhaq A, Senaldi G, Vergani DJ. Clinical application of new technique that measures C4d for assessment of activation of classical complement pathway. *J Clin Pathol* 1988; 41(2):143-7.

14. David-Neto E, David DSR, Ginani GF, Rodrigues H, Souza PS, Castro MCR et al. C4d staining in post-reperfusion renal biopsy is not useful for the early detection of antibody-mediated rejection when CDC crossmatching is negative. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26:1388-92.
15. Dean D, Kamath S, Peddi VR, Schroeder TJ, First MR, Cavallo T, A blinded retrospective analysis of renal allograft pathology using the banff schema: Implications for Clinical Management. *Transplantation* 1999; 68 (5): 642-645.
16. Fahim T, Böhmig GA, Exner M, Huttary N, Kershner H, Kandutsch S et al. The cellular lesion of humoral rejection: Predominant recruitment of monocytes to peritubular and glomerular capillaries. *Am J Transplant* 2007; 7: 385–393.
17. Feucht H, Felber E, Gokel M, Hillebrand G, Nattenenn U, Brockmeyer C, et al. Vascular deposition of complement – split products in kidney allograft with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol* 1991, 86(3): 464-470.
18. Feucht H, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmüller G et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 1993, 43(6):1333-38.
19. Feucht HE. Complement C4d in graft capillaries: the missing link in the recognition of humoral alloreactivity. *Am J Transplant* 2003; 3:646-652.
20. Feucht HE, Mihaatsch MJ. Diagnostic value of C4d in renal biopsies *Current*

Op Nephrol Hypertens 2005; 14:592-598.

21. Fior F, Nacchia F, Minicozzi A, Ghimenton C, Boschiero L, Haririan A. Focal C4d Staining in Peritubular Capillaries and Kidney Graft Survival: Results of a Retrospective Study. *Transplant Proceed* 2010; 42(4): 1095 – 7

22. Gaber L, Moore L, Al oway R, Flax S, Shokouk-Amiri, Schroeder T et al . Correlation between Banff classification, acute renal rejection scores and reversal of rejection. *Kidney Int* 1996; 49(2): 481-7.

23. 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.

24. Grimm P, McKenna R, Nickerson P, Russell M, 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):1582-9.

25. Haas M, Rahman MH, Racusen LC, Kraus ES, Bagnasco SM, Segev DL et al. C4d and C3d staining in biopsies of ABO- and HLA-incompatible renal allografts: correlation with histologic findings. *Am J Transplant* 2006; 6 (8): 1829-40.

26. Haas M, Ratner LE, Montgomery RA. C4d staining of perioperative renal transplant biopsies. *Transplantation* 2002; 74(5):711-7.

27. Haas M. The significance of C4d staining with minimal histologic abnormalities. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15(1):21-7.
28. Halloran P, Wadgymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa N. The significance of anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti – class I mediated rejection. *Transplantation* 1990; 49 (1):85-91.
29. Halloran P, Schlaut J, Solez K, Srinivasa N. The significance of anti-class I antibody response.II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti – class I like antibody. *Transplantation* 1992; 53(3):550-5.
30. Hariharan S, Kasiske B, Matas A, Cohen A, Harmon W, Rabb H. Surrogate markers for long-term renal allograft survival. *Am J Transplant* 2004; 4(7): 1179-83.
31. Haririan A, Kiangkitiwan B, Kukuruga D, Cooper, Hurley H, Drachenberg C. The impact of C4d pattern and donor-specific antibody on graft survival in recipients requiring indication renal allograft biopsy. *Am J Transplant* 2009; 9(12): 2758–67.
32. Herzenberg AM, Gil JS, Djurdjev O, Magil AB. C4d deposition in acute rejection: an independent long -term prognostic factor. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(1):234-41.
33. Ishikawa A, Flechner S, Goldfarb DA, Myles J, Modlin C, Boparai N et al. Quantative assessment of the first acute rejection as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 1999; 68(9):1318-24.

34. Jain S, Curwood V, White SA, Furness PN, Nicholson ML. Subclinical acute rejection detected using protocol biopsies in patients with diagnosis of delayed graft function. *Transplant Int* 2000; 13(suppl 1): S 52-55.
35. Kato M, Morozumi K, Takeuchi O, Oikawa T, Koyama K, Usami T et al . Complement fragment C4d deposition in peritubular capillaries in acute humoral rejection after ABO blood group incompatible human kidney transplantation. *Transplantation* 2003;75(5): 663-5.
36. Kieran N, Wang X, Perkins J, Davis C, Kendrick E, Bakthavatsalam R et al. Combination of Peritubular C4d and Transplant Glomerulopathy Predicts Late Renal Allograft Failure. *J Am Soc Nephrol* 20: 2260–2268, 2009
37. Kozakowski N et Regele H. Biopsy diagnostics in renal allograft rejection: from histomorphology to biological function. *European Society for Organ Transplantation* 2009; 22: 945–953.
38. Lederer SR, Kluth-Pepper B, Schneeberger H, Albert E, Land W, Feucht HE. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long term survival of renal allografts. *Kidney Int* 2001; 059(1):334-341.
39. Legendre C, Thervet E, Skhiri H, Mamzer-Bruneel MF, Cantarovich F, Noel LH et al. Histologic features of chronic allograft nephropathy revealed by protocol biopsies in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1998; 65 (11):1506-9.

40. Lipták P, Kemény É, Morvay Z, Szerdekényi E, Szenoradszky E, Marofka F et al: Peritubular capillary damage in acute humoral rejection: an ultrastructural study on human renal allografts. *Am J Transplant* 2005; 5(12): 2870-6.
41. Lorenz M, Regele H, Schilling M, Exner M, Rasoul-Rockenshaub S, Wahn M et al. Risk factors for capillary C4d deposition in kidney allografts: evaluation of a large study cohort. *Transplantation* 2004; 78(3): 447-52.
42. Magil AB, Tinckam K. Monocytes and peritubular capillary C4d deposition in acute renal allograft rejection. *Kidney Int* 2003; 63(5): 1888-1893.
43. Magil AB, Tinckam K. Focal peritubular capillary C4d deposition in acute rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(5): 1382-1388.
44. Magil AB. Monocytes/macrophages in renal allograft rejection. *Transplant Rev (Orlando)* 2009; 23(4): 199-208.
45. Marcussen N, Olsen T, Benediktsson H, Racusen L, Solez K. Reproducibility of the Banff classification of renal allograft pathology. Inter and intraobserver variation. *Transplantation* 1995; 60(10): 1083-9.
46. Mauiyyedi S, Pelle P, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolkoff-Rubin NE et al. Chronic Humoral Rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001;

12(3): 574-82.

47. Mauiyyedi S, Crespo M, Collins A, Schneeberger E, Pascual M, Saidman SI et al. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol* 2002, 13(3): 779-87.

48. Meehan SM, Siegel CT, Aronson AJ, Bartosh SM, Thistlethwaite JR, Woodle ES et al. The relationship of untreated borderline infiltrates by the Banff criteria to acute rejection in renal allograft biopsies. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(8): 1806 – 14.

49. Mengel M, Bogers J, Bosmans J, S  ron D, Moreso F, Carrera M et al: Incidence of C4d stain in protocol biopsies from renal allograft: Results from a multicenter trial. *Am J Transplant* 2005, 5(5):1050-6.

50. Mengel M, Sis B, Halloran P. SWOT analysis of Banff: strengths, weaknesses, opportunities and threats of the International Banff Consensus process and classification system for renal allograft pathology. *Am J Transplant* 2007; 7: 2221-6.

51. Meuller A, Schnuele P, Waldherr R, van der Wouke FJ. Impact of the Banff '97 classification for histological diagnosis of rejection on clinical outcome and renal function parameters after kidney transplantation. *Transplantation* 2000; 69 (6): 1123-7.

52. Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. *Am J Transplant* 2005; 5(11):2611–8.

53. Nadasdy GM, Bott C, Cowden D, Pelletier R, Ferguson R, Nadasdy T: Comparative study for the detection of peritubular capillary C4d deposition in human renal allografts using different methodologies. *Hum Pathol* 2005; 36(11): 1178–85.
54. Nankivell B, Borrows R, Fung C, O'Connell P, Allen R, Chapman J. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349(24): 2326-33.
55. Nickleleit V, Vamvakas E, Pascual M, Poletti B, Colvin R. The prognostic significance of specific arterial lesions in acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(7):1301-8.
56. Nickleleit V, Zeiler M, Gudat F, Thiel G, Mihatsch MJ. Detection of the complement degradation product C4d in the renal allografts: Diagnostic and therapeutic implications. *J Am Soc Nephrol* 2002, 13 (1): 242-251.
57. Nickleleit V, Mihatsch MJ. Kidney transplants, antibodies and rejection: is C4d a magic marker? *Nephrol Dial Transplant* 2003, 18(11): 2232-9.
58. Onitsuka S, Yamaguchi Y, Tanabe K, Takahashi K, Toma H. Peritubular capillary deposition of C4d complement fragment in ABO- incompatible renal transplantation with humoral rejection. *Clin Transplant* 1999; 13 (suppl 1): 33-37
59. Platt J. C4d and the fate of organ allografts. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(9): 2417-9.

60. Poduval RD, Kadambi PV, Josephson MA, Cohn RA, Harland RC, Javadi B et al. Implications of immunohistochemical detection of C4d along peritubular Capillaries in late acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2005; 79(2): 228-35.
61. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55(2):713-23.
62. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PA et al. Antibody-mediated rejection criteria: an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003; 3(6): 708-14.
63. Ranjan P, Nada R, Jha V, Sakhuja V, Joshi K. The role of C4d immunostaining in the evaluation of the causes of renal allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23(5): 1735–41.
64. Regele H, Exner M, Watschinger B, Wenter C, Wharman M, Osterreicher C et al. Endothelial C4d deposition is associated with inferior kidney allograft outcome independently of cellular rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(10):2058-66.
65. Regele H, Böhmig GA, Habicht A, Gollwitzer D, Schilling M, Rockenschaub S et al. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: A contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(9): 2371-80.

66. Roberts I, Reddy S, Russell C, Davie DR, Friend PJ, Handa A et al. Subclinical rejection and borderline changes in early protocol biopsy specimens after renal transplantation. *Transplantation* 2004; 77(8): 1194-8.
67. 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.
68. Rush DN, Jeffery J, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using Banff schema. *Transplantation* 1995; 59(4): 511-4.
69. Rush DN, 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* 1998; 9(11): 2129-34.
70. Saad R, Gritsch HA, Shapiro R, Jordan M, Vivas C, Scatlebury V et al. Clinical significance of renal allograft biopsies with "borderline changes" as defined by the Banff schema. *Transplantation* 1997; 64(7): 992-5.
71. Schweitzer EJ, Drachenberg CB, Anderson L, Papadimitriou JC, Kuo PC, Johnson LB et al. Significance of the Banff borderline biopsy. *Am J kidney Dis* 1996; 28(4): 585-8.
72. Seemayer A, Gaspert A, Nickeleit V, Mihatsch J. C4d staining of renal allograft biopsies: A comparative analysis of different staining techniques. *Nephrol*

Dial Transplant 2007; 22(5): 568–76.

73. Serón D, Moreso F, Bover J, Condom E, Gil–Vernet S, Canàs C et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997; 51(1): 310- 6.

74. Serón D, Moreso F. Ful adosa X, Hueso M, Carrera M, Grinyo JM. Reliability of chronic allograft nephropathy diagnosis in sequential protocol biopsies. *Kidney Int* 2002; 61(2): 727–33.

75. Sis B, Jhangri G, Bunnag S, Al anach K, Kaplan B, Halloran P. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009; 9(10): 2312-3.

76. Sis B, Halloran PF. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2010; 15(1): 42-8.

77. 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.

78. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB et al: International standardization of nomenclature and criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993; 44(2): 411- 22.

79. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE et al: Banff'05 Meeting Report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7(3): 518-26.
80. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M et al. Banff'07. Classification of renal allograft pathology: Updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; 8(4):753-60.
81. Sorof JM, Vartanian RK, Olson JL, Tomlanovich SJ, Vincenti FG, Amend WJ. Histopathological concordance of paired renal allograft biopsy cores. Effect on the diagnosis and management of acute rejection. *Transplantation* 1995; 60(11):1215-9.
82. Sund S, Hovig T, Reisaeter AV, Scott H, Bentdal Ø, Mollnes T. Complement activation in early protocol kidney graft biopsies after living-donor transplantation. *Transplantation* 2003; 75(8): 1204-13.
83. Tinckam KJ, Djurjev O, Magil AB. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status. *Kidney Int* 2005; 68: 1866-74.
84. Troxell ML, Weintraub LA, Higgins JP, Kambham N. Comparison of C4d immunostaining methods in renal allograft biopsies. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1 (3): 583- 91.

85. Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor specific antibody. Analysis using the Banff grading schema. *Transplantation* 1996; 61(1): 1586-92.
86. Truong LD, Barrios R, Adroque H, Gaber L. Acute antibody-mediated rejection of renal transplant pathogenetic and diagnostic considerations. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131(8):1200-8.
87. Wang HJ, Kjellstrand CM, Cockfield SM, Solez K. On the influence of sample size on the prognostic accuracy and reproducibility of renal transplant biopsy. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(1): 165–72.