



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARCOS VINICIUS DE SOUSA

Rejeição mediada por anticorpos em transplante renal: determinantes das
apresentações clínica e histológica, da resposta ao tratamento e do prognóstico

CAMPINAS

2021

MARCOS VINICIUS DE SOUSA

Rejeição mediada por anticorpos em transplante renal: determinantes das apresentações clínica e histológica, da resposta ao tratamento e do prognóstico

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de doutor em Ciências na área de concentração Clínica Médica.

ORIENTADORA: Prof Dra Marilda Mazzali

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DE DOUTORADO DEFENDIDA PELO ALUNO MARCOS VINICIUS DE SOUSA, E ORIENTADO PELO PROFA. DRA. MARILDA MAZZALI.

CAMPINAS

2021

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

So85r Sousa, Marcos Vinicius de, 1983-
Rejeição mediada por anticorpos em transplante renal : determinantes das apresentações clínica e histológica, da resposta ao tratamento e do prognóstico / Marcos Vinicius de Sousa. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

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

1. Rejeição de enxerto. 2. Antígenos HLA. 3. Imunoglobulinas intravenosas. 4. Plasmaférese. 5. Biópsia. 6. Sobrevida de enxerto. I. Mazzali, Marilda, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Antibody-mediated rejection in kidney transplantation : determinants of clinical and histological presentations, response to treatment and prognosis

Palavras-chave em inglês:

graft rejection

HLA antigens

Immunoglobulins, intravenous

Plasmapheresis

Biopsy

Graft survival

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Marilda Mazzali [Orientador]

Álvaro Pacheco e Silva Filho

Roberto Ceratti Manfro

Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin

Ricardo de Lima Zollner

Data de defesa: 14-04-2021

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0280-1069>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6666579120473312>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARCOS VINICIUS DE SOUSA

ORIENTADORA: MARILDA MAZZALI

MEMBROS:

- 1. Marilda Mazzali (Presidente)**
 - 2. Álvaro Pacheco e Silva Filho**
 - 3. Roberto Ceratti Manfro**
 - 4. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin**
 - 5. Ricardo de Lima Zollner**
-

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data: 14/04/2021

Agradecimentos

Ao meu companheiro José Paulo, por seu amor, companhia e apoio em todos os momentos, sendo para mim fonte de inspiração e motivação em todas as etapas da minha vida.

Aos meus pais, Antônio e Aracê, meus primeiros exemplos e maiores incentivadores de buscar sempre o que me realiza e me torna uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos, por serem meus maiores amigos, acreditando em todos os meus projetos.

Aos meus amigos, por serem presentes na minha vida, independente da distância, e por tornarem os caminhos mais leves.

À minha orientadora, Profa Dra Marilda Mazzali, pelo constante aprendizado, incentivo e amizade, compartilhando seu conhecimento e contribuindo de forma imensa no meu crescimento.

Ao Prof Dr Ricardo de Lima Zollner, pelos ensinamentos, convívio e exemplo profissional.

RESUMO

A presença de anticorpos anti-HLA (antígenos leucocitários humanos) dirigidos contra antígenos do doador (DSA) está associada a risco de rejeição mediada por anticorpos (RMA), com potencial impacto negativo na função e sobrevida do enxerto. Tais anticorpos ligam-se aos antígenos endoteliais, causando lesão por ativação do complemento, citotoxicidade por células dependente de anticorpos ou ativação direta do endotélio. As especificidades dos DSAs podem influenciar na sua patogenicidade e resposta ao tratamento. O tratamento padrão de RMA consiste da associação de plasmaférese (PF) e imunoglobulina endovenosa (IVIG), embora as evidências sejam escassas. Entre 1.015 transplantes renais realizados entre 2012 e 2019, 251 apresentaram anticorpos anti-HLA detectáveis antes e/ou após o transplante renal, dos quais 42 pacientes apresentaram diagnóstico de RMA. Vinte e cinco (59,5%) pacientes receberam tratamento com PF e IVIG, 13 (30,9%) apenas com IVIG, um (2,4%) apenas com PF e três (7,2%) sem PF e sem IVIG. Alguns pacientes receberam tratamento adicional com metilprednisolona e globulina anti-timócitos. Houve, nas biópsias renais, redução significativa dos escores de inflamação e de depósitos C4d após o tratamento, sem alteração na inflamação microvascular. Observamos redução significativa da intensidade média de fluorescência (MFI) dos DSAs de classe I e dos DSAs-DR, sem alteração nos DSAs-DQ. Quatro pacientes apresentaram associação de sinais histopatológicos de nefropatia membranosa (NM) com detecção de receptor de fosfolipase A2 na maioria desses casos. Sete (16,7%) pacientes evoluíram para falência do enxerto no primeiro ano pós-tratamento e apresentaram mais disfunção renal, proteinúria, tubulite e arterite intimal ao diagnóstico, comparados aos pacientes que permaneceram com o enxerto funcional. A sobrevida do enxerto foi superior a 80% no primeiro ano pós-tratamento, com um caso de óbito com o enxerto funcional por causa cardiovascular.

Palavras-chave: rejeição de enxerto; sobrevivência de enxerto; antígenos HLA; imunoglobulinas intravenosas; plasmaférese; biópsia.

ABSTRACT

The presence of donor-specific anti-human leukocyte antigen (DSA) is associated with an increased risk of antibody-mediated rejection (AMR) and a potential negative impact on graft function and survival. These antibodies' main targets are endothelial cells through complement activation, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, and direct activation of the endothelial cells. The DSA's characteristics can interfere with its pathogenicity and treatment response. In AMR cases, the standard of care is the association of plasmapheresis (PP) and intravenous immunoglobulin (IVIG). However, evidence of the most effective therapy is lack. Among 1,015 kidney transplants performed between 2012 and 2019, 251 had anti-HLA antibodies detected before and/or after kidney transplantation, of which 42 patients were diagnosed with AMR. Twenty-five (59.5%) patients received treatment with PP and IVIG, 13 (30.9%) only IVIG, one (2.4%) only PP, and three (7.2%) without PP and IVIG. Some patients received additional treatment with methylprednisolone and anti-thymocyte globulin. There was, in renal biopsies, a significant reduction in inflammation scores and C4d deposits after treatment, without change in microvascular inflammation. We observed a reduction in the circulating class I DSAs mean fluorescence intensity (MFI) without changing this parameter in DSAs-DQ cases. Four patients showed histopathological features compatible with *de novo* membranous nephropathy (MN) associated with AMR, with phospholipase A2 receptor (PLA2R) detection in most of these cases. Seven (16.7%) patients presented graft failure in the first year after treatment and had more intense renal dysfunction, proteinuria, tubulitis, and intimal arteritis at AMR diagnosis. In this series, graft survival was higher than 80% during the first year post-treatment of AMR, with one death with a functioning graft caused by cardiovascular disease during follow-up.

Keywords: graft rejection; graft survival; HLA antigens; immunoglobulins, intravenous; plasmapheresis; biopsy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação das regiões do cromossoma 6 responsáveis pela codificação dos antígenos HLA.....	20
Figura 2. Representação da estrutura das moléculas de antígeno leucocitário humano (HLA) de classes I e II.....	20
Figura 3. Seleção dos pacientes do estudo.	47
Figura 4. Pacientes com rejeição mediada por anticorpos de acordo com o tratamento recebido.	51
Figura 5. Dinâmica da intensidade média de fluorescência (MFI) de anticorpos anti-HLA doador-específicos (DSA) após o tratamento de rejeição mediada por anticorpos (RMA) com imunoglobulina endovenosa (IVIG) e/ou plasmaférese (PF).....	55
Figura 6. Evolução dos parâmetros de biópsia renal após o tratamento de rejeição mediada por anticorpos (RMA), de acordo com o tempo pós-transplante para ocorrência da rejeição.	59
Figura 7. Fotomicrografia das biópsias renais dos pacientes com nefropatia membranosa associada a rejeição mediada por anticorpos	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais dos receptores de transplante renal com diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos (RMA) comprovada por biópsia do enxerto, submetidos a tratamento.	50
Tabela 2. Imunologia e função do enxerto ao diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos (RMA) e após o tratamento.	54
Tabela 3. Achados histopatológicos ao diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos (RMA) e após o tratamento.	58
Tabela 4. Características clínicas e histológicas dos casos de nefropatia membranosa (NM) associados à rejeição mediada por anticorpos (RMA).	63
Tabela 5. Casos relatados de nefropatia membranosa (NM) de novo pós-transplante associada a rejeição mediada por anticorpos (RMA).	64
Tabela 6. Características gerais dos casos de enxerto funcionante e dos casos de falência de enxerto durante o primeiro ano após o tratamento de RMA.	66
Tabela 7. Tratamento de rejeição mediada por anticorpos (RMA), de acordo com tempo de ocorrência de rejeição e funcionamento do enxerto ao final do seguimento.	67
Tabela 8. Imunologia e função do enxerto ao diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos (RMA) dos casos de enxerto funcionante e dos casos de falência de enxerto durante o primeiro ano após o tratamento de RMA.	69
Tabela 9. Achados histopatológicos ao diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos (RMA) dos casos de enxerto funcionante e dos casos de falência de enxerto durante o primeiro ano após o tratamento de RMA.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	- citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependente (<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
AGH	- antiglobulina humana
ah	- hialinose arteriolar (classificação histológica de Banff)
AMR	- rejeição mediada por anticorpos (<i>antibody-mediated rejection</i>)
C1q	- componente C1q do complemento humano
C4d	- fragmento do componente do complemento C4 (escore da classificação histológica de Banff)
C5a	- componente 5a do complemento humano
CAAE	- certificado de apresentação para apreciação ética
CCL19	- ligante de quimiocina CC 19
CCL21	- ligante de quimiocina CC 21
CCR7	- receptor de quimiocina CC 21
CD	- grupamento de diferenciação (<i>cluster differentiation</i>)
CDC	- citotoxicidade dependente de complemento
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
cg	- glomerulopatia do transplante (escore da classificação histológica de Banff)
CH2	- domínio constante da cadeia pesada 2 (<i>constant heavy chain 2</i>)
ci	- fibrose intersticial (escore da classificação histológica de Banff)

CKD-EPI	- equação para estimar taxa de filtração glomerular (<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>)
ct	- atrofia tubular (escore da classificação histológica de Banff)
CXCL13	- ligante de quimiocina CX 13
CXCR5	- ligante de quimiocina CX 5
DGF	- atraso da função do enxerto (<i>delayed graft function</i>)
DNA	- ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DRC	- doença renal crônica
DSA	- anticorpo específico contra HLA do doador (<i>donor specific antibody</i>)
ELISA	- ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
FcγR	- receptores para imunoglobulina G
g	- glomerulite (escore da classificação histológica de Banff)
HC	- Hospital de Clínicas
HE	- hematoxilina e eosina
HFE	- gene da hemocromatose hereditária (<i>hereditary hemochromatosis gene</i>)
HLA	- antígeno leucocitário humano (<i>human leukocyte antigen</i>)
HSP70	- proteínas de choque térmico da família 70 kDa (<i>70 kilodalton heat shock proteins</i>)
i	- inflamação (escore da classificação histológica de Banff)
ICAM	- molécula intracelular de adesão (<i>intracellular adhesion molecule</i>)
ICN	- inibidor de calcineurina

IF/TA	- fibrose intersticial e atrofia tubular (classificação histológica de Banff)
IgG	- imunoglobulina G
IgG1	- imunoglobulina G de subclasse 1
IgG4	- imunoglobulina G de subclasse 4
IgM	- imunoglobulina M
IL-2	- interleucina 2
IVIG	- imunoglobulina endovenosa (<i>intravenous immunoglobulin</i>)
KDPI	- escore de avaliação de risco em transplante de acordo com características do doador (<i>kidney donor profile index</i>)
LFA-1	- antígeno 1 associado à função leucocitária (<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>)
MFI	- intensidade média de fluorescência de anticorpo (<i>mean fluorescence intensity</i>)
mg/dL	- miligramas por decilitro
MHC	- complexo principal de histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MICA	- gene A relacionado à cadeia <i>MHC</i> classe I (<i>MHC class I polypeptide-related sequence A</i>)
MICB	- gene B relacionado à cadeia <i>MHC</i> de classe I (<i>MHC class I polypeptide-related sequence B</i>)
NM	- nefropatia membranosa
MVI	- inflamação microvascular (<i>microvascular inflammation</i>)
NK	- linfócitos exterminadores naturais (<i>natural killer</i>)

PAS	- ácido periódico de Schiff
PCR	- reação em cadeia polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PF	- plasmaférese
PLA2R	- receptor de fosfolipase A2 (<i>phospholipase A2 receptor</i>)
ptc	- capilarite peritubular (escore da classificação histológica de Banff)
RAMA	- rejeição aguda mediada por anticorpos
RANTES	- quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por linfócitos T normais (<i>Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>)
RCMA	- rejeição crônica mediada por anticorpos
RCP	- reatividade contra painel
RMA	- rejeição mediada por anticorpos
t	- tubulite (escore da classificação histológica de Banff)
TCLE	- termo de consentimento livre e esclarecido
TFG	- taxa de filtração glomerular
Th1	- linfócito T auxiliar 1 (<i>T helper 1 cell</i>)
Th2	- linfócito T auxiliar 2 (<i>T helper 2 cell</i>)
Th17	- linfócito T auxiliar 17 (<i>T helper 17 cell</i>)
THSD7A	- trombospondina do tipo 1 contendo o domínio 7A (<i>thrombospondin type-1 domain-containing 7A</i>)
Tx	- transplante
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
UNOS	- Rede Unida para o Compartilhamento de Órgãos (<i>United Network for Organ Sharing</i>)

v	- vasculite (escore da classificação histológica de Banff)
VEGF	- fator de crescimento de endotélio vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VPT	- volume plasmático total
VST	- volume sanguíneo total

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1: ASPECTOS GERAIS	18
1.2: ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS E ALO-RECONHECIMENTO.....	18
1.3: ANTÍGENOS HLA E NÃO-HLA E ENXERTO RENAL	22
1.4: IMUNIDADE MEDIADA POR ANTICORPOS E TRANSPLANTE	23
1.5: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-HLA	24
1.6: ANTICORPOS ANTI-HLA E REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS (RMA).....	27
1.7: ACHADOS HISTOLÓGICOS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS	29
1.8: DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DE RMA	31
1.8.1: RMA aguda.....	32
1.8.2: RMA crônica	33
1.9: TRATAMENTO DE RMA E PROGNÓSTICO	33
1.10: JUSTIFICATIVA.....	36
1.11: HIPÓTESE.....	36
2. OBJETIVOS.....	36
2.1: GERAL.....	36
2.2: ESPECÍFICOS	37
3. METODOLOGIA.....	37
3.1: Desenho do estudo	37
3.2: Critérios de inclusão da coorte retrospectiva	38
3.3: Critérios de exclusão da coorte retrospectiva.....	38
3.4: Critérios de inclusão da análise secundária – NM e RMA.....	38
3.5: Coleta de dados	38
3.6: Tipificação HLA e detecção de anticorpo anti-HLA.....	39

3.6.1: Indicação.....	39
3.6.2: Metodologia.....	40
3.7: <i>Avaliação histológica</i>	41
3.8: <i>Terapia imunossupressora</i>	42
3.9: <i>Tratamento de RMA</i>	43
3.9.1: Protocolo de tratamento.....	43
3.9.2: Resposta ao tratamento e terapia de manutenção	44
3.10: <i>Mecanismos de busca da revisão da literatura</i>	45
3.11: <i>Análise Estatística</i>	45
3.12: <i>Avaliação Ética</i>	46
4. RESULTADOS	46
4.1: CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	46
4.2: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E IMUNOLÓGICAS	51
4.3: CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS	56
4.4: NEFROPATIA MEMBRANOSA (NM) ASSOCIADA À RMA	60
4.5: FATORES ASSOCIADOS À FALÊNCIA DO ENXERTO APÓS O TRATAMENTO DE RMA....	65
4.6: DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS EM PERIÓDICOS	70
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÕES	77
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
8. REFERÊNCIAS	79
9. ANEXOS	89
9.1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UNICAMP	89
9.2: ANTICORPOS ANTI-HLA DETECTÁVEIS PELO MÉTODO LABSCREEN® SINGLE ANTIGEN HLA CLASS I LS1A04.....	94
9.3: ANTICORPOS ANTI-HLA DETECTÁVEIS PELO MÉTODO LABSCREEN® SINGLE ANTIGEN HLA CLASS II LS2A01.....	95

9.4: PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS DA COORTE RETROSPECTIVA: <i>TREATMENT OF ANTIBODY-MEDIATED REJECTION AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION: IMMUNOLOGICAL EFFECTS, CLINICAL RESPONSE, AND HISTOLOGICAL FINDINGS</i> – ANNALS OF TRANSPLANTATION	96
9.5: PUBLICAÇÃO DO RELATO DE CASO DE RMA APÓS VACINAÇÃO E INFECÇÃO POR FEBRE AMARELA: <i>YELLOW FEVER DISEASE IN A RENAL TRANSPLANT RECIPIENT: CASE REPORT AND LITERATURE REVIEW</i>	104
9.6: AUTORIZAÇÃO PARA USO DO ARTIGO CIENTÍFICO: <i>YELLOW FEVER DISEASE IN A RENAL TRANSPLANT RECIPIENT: CASE REPORT AND LITERATURE REVIEW</i> – JOHN WILEY & SONS – TRANSPLANTATION SOCIETY – TRANSPLANT INFECTION DISEASE: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE TRANSPLANTATION SOCIETY	109
9.7: PUBLICAÇÃO DA ANÁLISE SECUNDÁRIA DOS DADOS: <i>DE NOVO MEMBRANOUS NEPHROPATHY ASSOCIATED WITH ANTIBODY-MEDIATED REJECTION IN RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS</i>	114
9.8: PROTOCOLO DE TRATAMENTO DE REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS (RMA) AGUDA (RAMA) E CRÔNICA (RCMA) DO HC-UNICAMP	132
9.9: FLUXOGRAMA DO TRATAMENTO DE REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS (RMA) AGUDA (RAMA) E CRÔNICA (RCMA)	138

1. INTRODUÇÃO

1.1: Aspectos gerais

A doença renal crônica (DRC) ocorre quando há dano estrutural do tecido renal com redução persistente de sua função, decorrente de condições como diabetes, hipertensão arterial sistêmica e glomerulopatia. Ela acomete cerca de 10% da população de países de média e alta rendas e está associada a complicações como anemia, doença óssea, doença cardiovascular e câncer, com potencial impacto na qualidade de vida e sobrevida dos pacientes (1). O diagnóstico de DRC é feito com base na estimativa da taxa de filtração glomerular, e alterações histológicas como esclerose glomerular, atrofia tubular e fibrose intersticial são alterações encontradas na biópsia renal. O tratamento das formas mais avançadas de DRC é realizado com terapia renal substitutiva. O transplante renal é considerado o tratamento de escolha da DRC avançada, por estar associado a menores taxas de mortalidade e de eventos cardiovasculares e melhor qualidade de vida quando comparado ao tratamento dialítico (1).

No Brasil, segundo dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia, o número absoluto de pacientes em diálise foi de 133.464 em 2018, com 22,1% desses pacientes em lista de espera para transplante renal (2). Naquele ano, apesar do Brasil ter sido o segundo país no mundo com maior número absoluto de transplantes renais, ocupou a 35ª posição no número de transplantes por milhão de pessoas (3). Além da disponibilidade de órgãos para doação, outros fatores podem impactar no acesso do paciente ao transplante, como idade, gênero, presença de comorbidades, nível socioeconômico e escolaridade (4). Além disso, a sensibilização pré-transplante contra antígenos dos doadores também pode dificultar o acesso dos pacientes ao transplante, bem como influenciar os seus desfechos ao longo do tempo (5).

1.2: Antígenos leucocitários humanos e alo-reconhecimento

As moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) participam do reconhecimento de antígenos próprios e não-próprios pelo sistema imunológico. Elas estão presentes na

superfície de todas as células nucleadas do corpo, apresentando fragmentos de proteínas provenientes do metabolismo celular para células do sistema imunológico (6). Em humanos, o MHC é denominado antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *human leukocyte antigen*) e tem papel importante na apresentação de alo-antígenos presentes no órgão, o que pode desencadear diversos tipos de rejeição.

Os genes que codificam os antígenos HLA estão localizados no braço curto do cromossoma 6, na posição 6p21, e tem aproximadamente 4.000 kb de comprimento e 3,6 milhões de pares de base (7). Apesar de constituir 0,1% do genoma humano, o HLA é a região mais densa de genes humanos, contribuindo em mais de 10% da diversidade genética da espécie (8). O complexo HLA contém mais de 200 genes, dos quais mais de 40 participam da codificação de antígenos leucocitários. Os demais genes codificam moléculas com funções distintas no sistema imune, como componentes do complemento, citocinas e enzimas. Os genes HLA estão dispostos em três regiões ou classes genômicas [Figura 1]. A região mais distante corresponde à classe I e codifica as cadeias pesadas clássicas HLA-A, -B e -C. Os genes não-clássicos de classe I, por sua vez, codificam os genes HLA-E, -F, -G, HFE e MICA e MICB (relacionados a MHC de classe I A e B, respectivamente). Com exceção dos genes MIC, todas as moléculas HLA de classe I formam heterodímeros com a cadeia invariante beta 2 microglobulina, codificada por um gene no cromossoma 15. Os genes do HLA de classe II têm localização mais centromérica e codificam as duas cadeias que formam os heterodímeros funcionais HLA-DR, -DQ, -DP, -DM e -DO. Esses genes estão relacionados à modulação da resposta imunológica, codificando moléculas que são expressas em células apresentadoras de antígenos como macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, células de Kupffer e linfócitos B (7). Os genes de classe I e II são separados pela região de classe III, que codifica proteínas do sistema de complemento, proteínas de choque térmico da família 70 kDa (HSP70), fator de necrose tumoral e receptores para produtos finais de glicosilação avançada (9).

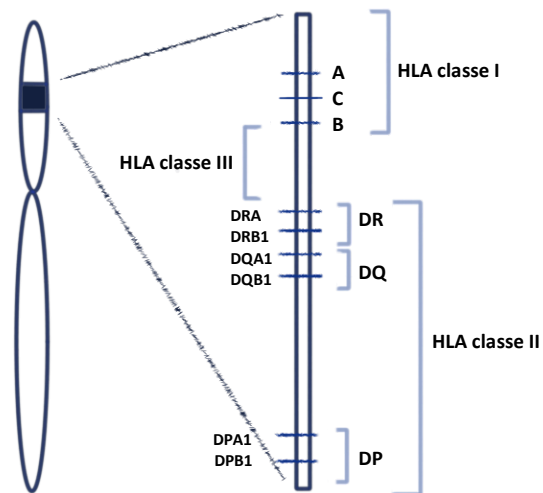


Figura 1. Representação das regiões do cromossoma 6 responsáveis pela codificação dos antígenos HLA. Adaptado de Robson KJ e cols. Nat Rev Nephrol, 2018.

As moléculas de HLA de classe I são compostas por uma cadeia alfa ligada de forma não-covalente a uma cadeia de beta 2-microglobulina, com as cadeias alfa-1 e alfa-2 formando uma fenda de ligação de peptídeo. Essas moléculas são constitutivamente expressas na superfície de todas as células nucleadas e plaquetas, e têm como função principal a apresentação de antígenos endógenos para linfócitos T (6). As moléculas de HLA de classe II, por sua vez, são compostas pelas cadeias alfa e beta, com os segmentos alfa 1 e beta 1 formando a fenda de ligação de peptídeo. A cadeia alfa do HLA-DR é essencialmente invariante, enquanto que nos HLAs -DQ e -DP as cadeias alfa e beta são funcionalmente polimórficas.

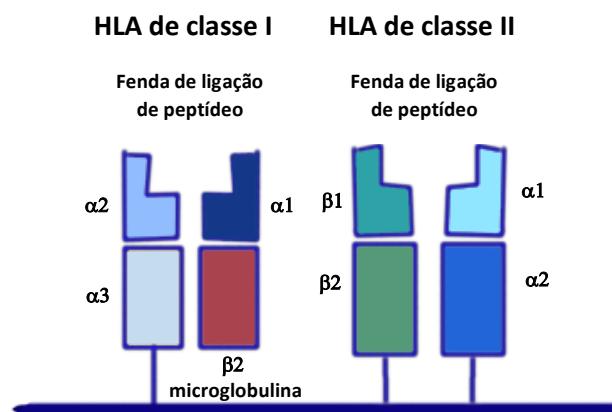


Figura 2. Representação da estrutura das moléculas de antígeno leucocitário humano (HLA) de classes I e II. Adaptado de Robson KJ e cols. Nat Rev Nephrol, 2018.

O epítopo é a área da molécula de HLA que se liga a receptores celulares e aos anticorpos. Cada molécula de HLA apresenta múltiplos epítomos de anticorpos e linfócitos B, e diferentes alelos podem compartilhar vários epítomos (10). Os *eplets*, por sua vez, representam a parte central do epítopo, localizada na região acessível aos anticorpos da molécula de HLA, e representam a menor unidade funcional do epítopo, determinando a especificidade dos anticorpos por meio da interação com a região central determinante de complementaridade do anticorpo (10). Apesar de os *eplets* representarem os aminoácidos que determinam a especificidade dos anticorpos, outros resíduos polimórficos ou não polimórficos determinam a afinidade da interação antígeno-anticorpo (10).

O reconhecimento de antígenos não-próprios, presentes no órgão transplantado, pode ocorrer por meio de três vias: direta, indireta e semi-direta. A via direta ocorre quando células apresentadoras de antígenos derivadas do doador apresenta antígenos do doador diretamente para linfócitos T CD4⁺ do receptor. A via indireta, por sua vez, ocorre quando células apresentadoras de antígenos do receptor processam células do doador e apresentam os antígenos dessas células para linfócitos T CD4⁺ do receptor. Por fim, HLAs não-processados dos doadores podem ser transferidos para a superfície de células apresentadoras de antígenos dos receptores e serem reconhecidos pelos linfócitos T, o que é denominado via semi-direta. Essas formas de reconhecimento são responsáveis pelo desencadeamento de rejeição do órgão. Na rejeição mediada por células, o reconhecimento por linfócitos T CD4⁺ é seguido por ativação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e consequente lesão celular. Na rejeição mediada por anticorpos, por sua vez, linfócitos B apresentam antígenos do doador por via indireta, após processamento em células apresentadoras de antígenos, para linfócitos T CD4⁺, com consequente ativação de linfócitos T e B e geração de células produtoras de anticorpos.

Em condições normais, os linfócitos T podem ser ativados por peptídeos de células não-próprias, o que não ocorre quando os peptídeos são provenientes de células próprias (6). As moléculas de HLA de classe II apresentam peptídeos derivados de antígenos exógenos gerados por degradação lisossomal (6), que são reconhecidos por linfócitos T CD4⁺, causando ativação dessas células, liberação de citocinas e estímulo de linfócitos Th1 e Th2. Os linfócitos Th1 produzem interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral gama, com consequente ativação de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos NK. Os linfócitos T citotóxicos causam liberação de grânulos

contendo perforinas, que criam poros na superfície das células-alvo, e de granzimas, que induzem apoptose nas mesmas. Os linfócitos Th2, por sua vez, por meio da produção de interleucina 4, causam ativação de linfócitos B, com consequente produção de anticorpos. Os anticorpos causam opsonização das células-alvo, com ligação de imunoglobulinas G (IgG) aos receptores dessas células, e recrutamento de fagócitos via receptor FcγR. A opsonização pode também ser mediada por componentes do sistema complemento, com a ligação desses componentes a imunoglobulina M (IgM) e produção de C5a, que ativa a fagocitose das células-alvo (6).

1.3: Antígenos HLA e não-HLA e enxerto renal

Os antígenos HLA são considerados os aloantígenos mais importantes no transplante renal (10). As moléculas HLA de classe I estão presentes na superfície de todas as células nucleadas do corpo. As moléculas HLA de classe II, além de estarem presentes em células apresentadoras de antígenos residentes e infiltrativas renais, também podem estar presentes em células epiteliais e tubulointersticiais (9). Nos glomérulos, o HLA de classe II pode ser expresso em monócitos no lúmen do capilar glomerular, em macrófagos infiltrativos e em células dendríticas, bem como células endoteliais e podócitos em resposta a estímulos inflamatórios (9). Em condições fisiológicas, o HLA de classe II presente em células tubulares e glomerulares está relacionado ao desenvolvimento de tolerância, embora possa adquirir um efeito pro-inflamatório em algumas condições (9).

Além dos antígenos HLA, o endotélio renal também pode apresentar, em menor quantidade, antígenos não-HLA capazes de desencadear a ativação do sistema imunológico e consequente lesão tecidual (10). Conhecidos como antígenos menores de histocompatibilidade, os antígenos não-HLA são proteínas polimórficas codificadas por genes não-MHC, sendo a maioria desses antígenos desconhecidos (10). Proteínas como o receptor de angiotensina II do tipo 1 e receptor de endotelina tipo A têm sido identificadas como alvo de anticorpos em pacientes com rejeição aguda, com consequente lesão endotelial mediada por complemento ou por ativação celular direta (10). Antígenos MICA também têm sido associados a episódios de rejeição aguda e redução de sobrevida do enxerto, embora os dados disponíveis na literatura permaneçam controversos (10).

1.4: Imunidade mediada por anticorpos e transplante

Os linfócitos B são células importantes no desenvolvimento da resposta imunológica devido à sua capacidade de se diferenciar em células plasmáticas produtoras de anticorpos e de gerar memória imunológica de longo prazo (11). Essas células são produzidas na medula óssea, e encontram nos órgãos linfoides secundários, como linfonodos e baço, ambientes propícios a sua maturação (11). Os órgãos linfoides secundários localizam-se em áreas estratégicas do corpo, propiciando um ambiente favorável para que linfócitos T e B entrem em contato com antígenos e possam interagir entre si (11).

O linfonodo é dividido em duas regiões, córtex e medula. No córtex, podem-se identificar uma área de linfócitos B, composta por uma região de folículos primários e outra de centros germinativos, e uma área paracortical composta de linfócitos T (11,12). A medula do linfonodo, por sua vez, é composta pelos sinusóides linfáticos separados por cordões de células plasmáticas, macrófagos e linfócitos T de memória, e sua função ainda não é completamente conhecida (12). Os linfócitos e as células dendríticas entram no linfonodo através de vênulas presentes na região paracortical.

Os linfócitos B imaturos circulam continuamente entre o sangue periférico, linfa e entram nos órgãos linfoides para atingir os folículos de linfócitos B, onde podem completar sua maturação e receber sinais de sobrevivência (11). O linfócito B maduro *naïve* requer dois sinais para sua ativação, sendo o primeiro resultado da interação do receptor de linfócito B com o antígeno e o segundo de sua interação com linfócitos T CD4⁺ (11).

Ao entrar em contato com os antígenos do doador, as células apresentadoras de antígeno migram para os órgãos linfoides secundários. A interação com células apresentadoras de antígenos desencadeia eventos de sinalização intracelular e rearranjo do citoesqueleto do linfócito B, que passa a apresentar receptor de quimiocina CCR7, resultando em migração para os limites das zonas de linfócitos T e B em resposta às quimiocinas CCL19 e CCL21 da zona de linfócito T (13). Os linfócitos T CD4⁺ presentes em zonas interfoliculares e paracorticais, por sua vez, ao entrar em contato com células apresentadoras de antígenos, apresentam uma mudança em sua conformação e aumento da expressão do receptor de quimiocina CXCR5, com consequente migração para folículos primários onde residem linfócitos

B em resposta à quimiocina CXCL13, resultando em interação de linfócitos T e B na junção de suas localizações (11,13).

Após apresentação de antígeno do linfócito B aos receptores de linfócito T, as células interagem por longo período, com mudança conformacional e maximização da sua área de superfície de contato, promovendo uma interação sustentada entre seus respectivos receptores e contra-receptores de superfície e troca de fatores solúveis entre as células (13). Ocorrem então uma série de ligações adicionais para facilitar o primeiro sinal, como a ligação do CD4 do linfócito T a uma região não-polimórfica da molécula de HLA de classe II, e o aumento da afinidade entre a molécula de adesão LFA-1 (do inglês *lymphocyte function-associated antigen 1*, também chamada CD11/CD18) no linfócito T com a molécula intracelular de adesão ICAM (do inglês *intracellular adhesion molecule*, também chamada CD54), estabilizando a ponte entre as células. Com isso, a ligação do CD4 com o HLA de classe II de localização periférica torna-se central, iniciando a sinalização em ambas as células (13).

Os linfócitos B ativados sofrem expansão clonal, com geração de plasmócitos e linfócitos B de memória. Enquanto os plasmócitos alojam-se na medula óssea, os linfócitos B de memória permanecem quiescentes até o reencontro com o antígeno, recirculando entre os órgãos linfoides secundários e o sangue periférico (11). Dessa forma, com novo contato com o antígeno, os linfócitos B de memória apresentam o antígeno para linfócitos T CD4+, o que fornece a sinalização para diferenciação rápida dessas células em plasmócitos produtores de anticorpos antígeno-específicos, principalmente IgG (11).

1.5: Detecção e caracterização dos anticorpos anti-HLA

As técnicas para detecção e caracterização dos anticorpos anti-HLA podem ser celulares ou em fase sólida, com sensibilidade variável. São métodos celulares a citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e a citometria de fluxo, enquanto os métodos em fase sólida podem ser realizados com técnica ELISA ou com o uso de microesferas. No CDC, linfócitos de um doador ou de um painel de doadores selecionados para representar os antígenos HLA mais frequentes em determinada população são colocados em contato com o soro de um potencial receptor. Quando há anticorpos específicos no soro, ocorre ativação desses anticorpos quando

complemento é adicionado, com consequente formação do complexo de ataque à membrana na superfície dessas células e morte das mesmas (13). Para o cálculo da reatividade contra painel (RCP), a fração de poços que contém a maioria de células mortas é comparada com o total de poços testados. A prova cruzada é geralmente realizada com linfócitos T e B. A prova cruzada positiva para linfócitos T sugere a presença de DSA de classe I e é uma contraindicação ao transplante. A prova cruzada positiva para linfócitos B e negativa para linfócitos T pode estar relacionada a títulos baixos de anticorpos de classe I, anticorpos de classe II, anticorpos não-HLA ou auto anticorpos (13). Os anticorpos detectados por citotoxicidade podem ser de classes IgG ou IgM, sendo esse último mais frequente em casos de eventos sensibilizadores realizados há pouco tempo do teste, como hemotransfusão (13). O tratamento do soro com temperatura ou com o uso de agente redutor ditiotritol (DTT), que destrói pontes dissulfeto das moléculas de IgM, permite sua inativação sem interferir na reatividade dos anticorpos IgG (13,14). Para aumentar a sensibilidade dos testes em casos de anticorpos presentes em títulos baixos, pode-se adicionar antiglobulina humana (AGH), que se liga ao DSA presente e ligado nos linfócitos (13). A citometria de fluxo, por sua vez, permite a identificação de anticorpos em baixos títulos ou não ligados ao complemento. Nesse caso, a IgG é conjugada com um corante fluorescente, e a ligação desse anticorpo secundário aos anticorpos unidos aos linfócitos permite a identificação de sua fluorescência ao passar pelo citômetro (13). Esse teste permite a identificação de DSA mesmo em situações de CDC negativo, e sua detecção está associada à maior ocorrência e gravidade de rejeição em comparação aos casos de ausência desses anticorpos (13).

Os ensaios em fase sólida permitem a detecção de anticorpos anti-HLA e sua quantificação, bem como a medida da intensidade de fluorescência de cada anticorpo detectado no teste (13). O teste de ELISA é realizado por meio de moléculas HLA recombinantes ou solúveis, imunoprecipitados de plaquetas ou vírus Epstein-Barr, que se ligam aos poços das microplacas. Uma vez que o soro estudado apresente anticorpos anti-HLA dirigidos contra as moléculas presentes no teste, essa ligação é identificada por meio de uma enzima secundária conjugada com anticorpo IgG, seguido da adição de um substrato que induz reação colorimétrica (15). O ensaio baseado em microesferas, que corresponde à tecnologia Luminex®, consiste de uso de microesferas de poliestireno contendo diferentes fluorocromos, cobertas com moléculas HLA específicas. Uma vez que essas esferas são colocadas em contato

com o soro estudado, os anticorpos anti-HLA presentes ligam-se a elas. Por meio da adição de um segundo anticorpo marcado, os anticorpos são identificados (15). Cada anticorpo anti-HLA pode ligar-se a vários epítomos, estruturalmente definidos por poucos resíduos de aminoácidos e comuns à várias moléculas de HLA de classe I e II. O Luminex® permite uma distinção precisa entre anticorpos anti-HLA de classes I e II, bem como a detecção de anticorpos dirigidos contra alelos HLA específicos (15). Esses métodos permitem a monitorização do desenvolvimento e evolução dos anticorpos clinicamente relevantes após o transplante, possibilitando uma abordagem terapêutica mais adequada (15). O Luminex® permite identificar a força dos DSAs, que é geralmente expressa como intensidade média de fluorescência (MFI, do inglês *mean fluorescence intensity*). A identificação de DSA com elevada intensidade de fluorescência reflete um fornecimento de moléculas de anticorpos em quantidade suficiente para se ligar aos antígenos e formar complexos que ativam o complemento de forma mais eficaz (16).

A patogenicidade dos DSAs está associada a diversos fatores, como título do anticorpo, afinidade pelo antígeno e suas potenciais funções efetoras (17). Estas diferenças nas funções efetoras dos anticorpos dependem de características de isotipo e subclasse (17). O meio inflamatório que se desenvolve após a exposição do antígeno exerce influência na seleção da subclasse de anticorpo, e a memória imunológica desenvolvida também varia de acordo com o evento sensibilizante, como transplante, gestação e transfusão de hemoderivados (17).

A pesquisa de anticorpos anti-HLA por testes celulares ou ensaios em fase sólida permite a detecção de anticorpos do isotipo IgG (17). A cadeia pesada da IgG é mais de 90% homóloga, com uma região variável localizada no domínio CH2 e na região de dobradiça, onde ocorre a ativação de mecanismos efetores, principalmente por meio da ligação de FcγRs e C1q, como CDC, opsonização, citotoxicidade por célula dependente de anticorpo e fagocitose dependente de anticorpo (17). As subclasses de IgG variam de acordo com o comprimento e flexibilidade de sua região de dobradiça, sendo a IgG2 mais curta e rígida, enquanto a IgG3 é longa e bastante flexível, o que aumenta a disponibilidade de locais para ligação de FcγR e componentes do complemento (17). A capacidade do anticorpo se ligar ao C1q mostrou-se associada ao maior risco de desenvolver rejeição com lesão tecidual mais intensa, incluindo inflamação, microvasculite, endarterite, glomerulopatia e depósitos de C4d (16). Entretanto, não há consenso a respeito da utilidade do teste de

capacidade da fixação de complemento *in vitro* na discriminação da patogenicidade dos DSAs (17). A maioria dos pacientes com DSA após o transplante apresenta várias subclasses de IgG e os estudos são conflitantes a respeito da associação de determinadas subclasses com piores desfechos (17)

A capacidade dos DSAs de causar lesão tecidual também está relacionada às características de classe desses anticorpos, sendo os de classe II mais patogênicos do que os de classe I (18). A expressão de antígenos DR e DQ está aumentada na microvasculatura do enxerto após o transplante, e os DSAs de classe II estão mais fortemente associados com o desenvolvimento de lesão microvascular do que os anticorpos de classe I (19). Estudos *in vitro* mostraram que as células endoteliais expressam os três antígenos HLA de classe II (-DR, -DQ e -DP) em resposta ao estímulo com interferon gama ou interação com certas células do sistema imunológico (20). Estudos prévios mostraram associação entre DSA-DQ com aumento de IL-6, responsável por promoção de fibrose, recrutamento de leucócitos e diferenciação Th17, que está associada a menor sobrevida do enxerto (19). A ligação do DSA-DQ ao endotélio também compromete a amplificação de linfócitos T regulatórios, e causa aumento de secreção de RANTES, quimiocina que exerce função na migração e recrutamento de linfócitos T, resultando em fibrose intersticial, atrofia tubular e rejeição recorrente (19).

1.6: Anticorpos anti-HLA e rejeição mediada por anticorpos (RMA)

A presença de anticorpos anti-HLA dirigidos contra antígenos do doador (DSA, do inglês *Donor Specific Antibody*) está associada a risco de lesão tecidual, com impacto negativo na função e sobrevida do enxerto (21,22). A prevalência de DSA é de cerca de 20% após o primeiro ano de transplante de órgãos sólidos, com impacto significativo nos desfechos clínicos, com piora da função e sobrevida do enxerto (17). A rejeição mediada por anticorpos (RMA) aguda ocorre em cerca de 6,7% dos receptores de transplante renal, e está presente em 32% das biópsias renais de pacientes diagnosticados com rejeição aguda (23). No transplante de órgãos, a incompatibilidade entre os loci HLA de classes I e II entre doador e receptor, bem como a capacidade do sistema imunológico de responder a esse estímulo, determinam a intensidade da resposta imunológica (11).

Os principais estímulos antigênicos para a produção de anticorpos anti-HLA em receptores de transplante renal são transfusões sanguíneas, gestações e transplantes prévios, embora existam relatos na literatura de produção de anticorpos anti-HLA desencadeada por outros estímulos imunológicos, como vacinação e infecções (24). A RMA pode ocorrer de duas formas: (a) tipo 1, resultando de DSA pré-formados em pacientes sensibilizados; e (b) tipo 2, associada a DSA de novo. A RMA pode ocorrer em qualquer momento após o transplante renal, podendo manifestar-se desde quadros subclínicos até elevação rápida da creatinina sérica (23).

A RMA do tipo 2 geralmente acontece após o primeiro ano de transplante, enquanto o tipo 1 costuma ser mais precoce (25). Os casos de identificação de DSA antes do transplante renal estão associados ao maior risco de rejeição hiperaguda ou aguda, com potencial evolução para falência do enxerto (16). O desenvolvimento de DSA após o transplante (de novo) pode resultar de incompatibilidade entre antígenos HLA do doador e receptor, terapia imunossupressora inadequada, má-aderência ao tratamento e/ou inflamação do enxerto causada por infecções virais, rejeição mediada por células ou lesão isquêmica (16).

A ligação de DSA aos antígenos expressos nas células endoteliais do enxerto pode causar lesão tecidual por meio de três mecanismos: ativação do complemento, citotoxicidade por células dependente de anticorpos (ADCC, do inglês *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) e ativação direta do endotélio (24). O complexo antígenos HLA-anticorpos liga-se à molécula C1q e ativa a via clássica do complemento, resultando em uma cascata de eventos que leva à produção de C3 e C5 convertase, formação do complexo de ataque à membrana, com formação de poros na membrana celular e consequente lise da célula (24). Além disso, componentes do complemento como C3a e C5a atraem neutrófilos e macrófagos. A liberação de prostaglandinas pelos macrófagos e de histamina pelos mastócitos causa vasoespasmo e edema, piorando a lesão (24). A ativação da cascata de complemento também leva à produção de C4d, um produto inativo da clivagem da fração C4 que forma uma ligação covalente com as células alvo e se mantém estável no tecido. O depósito de C4d em capilares peritubulares é um marcador de ativação do sistema de complemento no tecido e, além de ser um dos critérios para diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos, está associado à redução da sobrevida do enxerto (24).

Mesmo na ausência de complemento, alguns DSAs podem causar lesão ao enxerto por ADCC. Nesse caso, células da imunidade inata, como neutrófilos, macrófagos e células exterminadoras naturais (NK, do inglês *natural killer*), podem se ligar ao fragmento Fc dos anticorpos, resultando na degranulação e liberação de enzimas líticas, que causam lesão e morte celular (16). Por fim, os anticorpos podem causar ativação de proliferação endotelial por meio do aumento da produção de fatores de crescimento de endotélio vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), suprarregulação de receptores de fator de crescimento de fibroblasto e aumento de outras vias de recrutamento celular (16).

1.7: Achados histológicos e manifestações clínicas da rejeição mediada por anticorpos

A RMA é uma doença de espectro amplo, contínuo e de gravidade variável, iniciada em qualquer momento após o transplante renal e progredindo para lesão tecidual crônica, disfunção do enxerto e falência do órgão (21). A RMA é definida por uma combinação de lesão microvascular, depósito tecidual de C4d e detecção de DSA circulante (26). A lesão microvascular é a manifestação morfológica de RMA ativa, e ocorre em reação à marginação de leucócitos nos glomérulos (glomerulite) e nos capilares peritubulares (capilarite) e, embora seja um padrão morfológico característico na RMA, não é específica dessa doença (25,26). Há evidências de que a glomerulite e a capilarite peritubular também podem estar presentes em casos de rejeição mediada por células (26).

A ação continuada de anticorpos anti-HLA sobre as células endoteliais glomerulares pode resultar no surgimento de lesões conhecidas como glomerulopatia do transplante, definida como multilaminação da membrana basal glomerular à microscopia ótica e/ou microscopia eletrônica, na ausência de depósitos elétrondensos (27), algumas vezes acompanhada de expansão mesangial e acúmulo de células mononucleares nos capilares peritubulares (28). Alguns estudos mostraram associação significativa entre glomerulopatia do transplante e DSA de classe II (27). O depósito glomerular de C3 é bem descrito em casos de glomerulopatia do transplante, com escassez de IgG, IgA e C1q (29). Embora o endotélio seja inicialmente acometido, acredita-se que a ocorrência de lesão de células podocitárias possa estar associada ao desenvolvimento de proteinúria, redução da filtração

glomerular e falência do enxerto (27). Os podócitos expressam moléculas de HLA de classes I e II, sobretudo em condições inflamatórias, e podem exercer a função de célula apresentadora de antígeno (30). Além dos anticorpos anti-HLA, a glomerulopatia do transplante também pode resultar de ação de anticorpos não-HLA, lesão mediada por células, microangiopatia trombótica ou hepatite C (27).

Outras formas de lesão glomerular têm sido diagnosticadas em pacientes com RMA, como nefropatia membranosa (NM) de novo (31), embora os mecanismos de lesão nesses casos não estejam plenamente conhecidos. A NM é uma doença glomerular mediada por anticorpos, caracterizada por depósitos imunes subepiteliais resultantes da ligação de anticorpos dirigidos contra antígenos podocitários (32). Por meio da participação do complemento, os depósitos imunes subepiteliais causam lesão podocitária e perda da integridade do diafragma podocitário, com formação de projeções da membrana basal conhecidas como espículas e desenvolvimento de proteinúria (32). A NM em rins nativos é uma das principais causas de síndrome nefrótica do adulto, e em cerca de 20% dos casos é secundária a uma condição sistêmica, como infecção, neoplasia, doença autoimune ou uso de medicações. A maioria das formas primárias está associada à presença de um autoanticorpo dirigido contra o receptor de fosfolipase A2, o anti-PLA2R (do inglês *phospholipase A2 receptor*). Cerca de 2-5% dos casos de NM primária estão relacionados a anticorpos dirigidos contra outro antígeno podocitário, o anti-trombospondina do tipo 1 contendo o domínio 7A (THSD7A, do inglês *thrombospondin type-1 domain-containing 7A*). Após o transplante, a NM pode ocorrer como recidiva de doença ou como uma glomerulopatia de novo. A maioria dos casos de recidiva estão associados à presença de anticorpos anti-PLA2R com predomínio de IgG4, enquanto que as formas de NM de novo geralmente ocorrem na ausência do anti-PLA2R, com predomínio de IgG1 (32). Acredita-se que, nesse caso, estímulos como infecção viral, obstrução urinária, isquemia ou processo imunológico, como rejeição, poderiam desencadear a exposição de outros antígenos podocitários previamente ocultos, com consequente formação de complexo imune em região subepitelial (32).

A lesão ao endotélio dos capilares peritubulares pela RMA causa rarefação microvascular e fibrose no enxerto (33). Vários mecanismos estão envolvidos nesse processo, tais como ativação de genes profibróticos, modificações teciduais induzidas por hipóxia, recrutamento de células inflamatórias, aumento tecidual de fibrinogênio, alteração da hemodinâmica intra-renal levando à hipertensão, aumento da

permeabilidade do capilar peritubular, transdiferenciação endotélio-mesenquimal e destaque de pericitos (33). O resultado dessas alterações teciduais é a ativação de miofibroblastos e deposição de colágeno e fibrina, levando a expansão da matriz extracelular, atrofia tubular e fibrose intersticial (33).

1.8: Diagnóstico e classificação de RMA

Para o diagnóstico de RMA, é necessária a realização de biópsia renal com a obtenção de um fragmento considerado adequado para análise, ou seja, com amostra cortical contendo no mínimo 10 glomérulos e ao menos duas artérias (34). Recomenda-se o preparo do material em sete cortes sequenciais de 3 a 4 microns, três corados com hematoxilina e eosina (HE), três corados com ácido Periódico de Schiff (PAS) ou prata, e um corado com tricrômio de Masson (34). As colorações de PAS e prata permitem a identificação de glomerulite e tubulite, bem como destruição da membrana basal tubular e achados de cronicidade, como hialinose arteriolar, aumento da matriz mesangial, duplo contorno dos capilares glomerulares e espessamento da membrana basal tubular. A coloração de tricrômico de Masson, por sua vez, é útil na avaliação de fibrose intersticial (34).

A classificação de Banff 97 (34) permitiu o estabelecimento de critérios para avaliação de glomerulite (g), arterite intimal (v) e glomerulopatia do transplante (cg). A classificação de Banff 07 (35), por sua vez, acrescentou os critérios para avaliação de capilarite peritubular (ptc) e depósito de C4d nos capilares peritubulares por imunohistoquímica ou imunofluorescência. Essa classificação permitiu estratificar o acometimento dos diferentes compartimentos renais, de acordo com o parâmetros seguintes:

a) escore de glomerulite:

- g0 – ausência de glomerulite;
- g1 – glomerulite em menos de 25% do glomérulo;
- g2 – glomerulite em 25 a 75% do glomérulo;
- g3 – glomerulite em mais de 75% do glomérulo.

b) escore de capilarite peritubular:

- ptc0 – ausência ou < 10% de capilarite peritubular;
- ptc1 – $\geq$ 10% de capilarite, máximo 3-4 células inflamatórias no lúmen;
- ptc2 – $\geq$ 10% de capilarite, máximo 5-10 células inflamatórias no lúmen;

ptc3 – $\geq 10\%$ de capilarite, > 10 células inflamatórias no lúmen.

c) escore de arterite intimal (v):

v0 – ausência de arterite;

v1 – arterite leve a moderada em ao menos uma artéria;

v2 – arterite intensa, ao menos 25% do lúmen da artéria acometida;

v3 – arterite transmural e/ou necrose fibrinóide com infiltrado linfocítico.

d) escore de C4d nos capilares peritubulares:

C4d0 (negativo) – 0% do córtex e/ou medula;

C4d1 (mínimo) – $1 < 10\%$ do córtex e/ou medula;

C4d2 (focal) – 10-50% do córtex e/ou medula;

C4d3 (difuso) - $> 50\%$ do córtex e/ou medula.

e) escore de glomerulopatia do transplante (cg0):

cg0 – duplo contorno em $< 10\%$ das alças capilares;

cg1 – duplo contorno em 10-25% das alças capilares;

cg2 – duplo contorno de 26-50% das alças capilares;

cg3 – duplo contorno em $> 50\%$ das alças capilares.

1.8.1: RMA aguda

De acordo com a classificação de Banff de 2013, revisada em 2015 (36), todos os 3 critérios seguintes devem estar presentes para o diagnóstico de rejeição aguda mediada por anticorpos:

1. Evidência histológica de lesão tecidual aguda, definida por uma ou mais das características a seguir: inflamação microvascular (g superior a 0, na ausência de glomerulite de novo recorrente, e/ou ptc superior a 0); arterite intimal ou transmural (v superior a 0); microangiopatia trombótica aguda na ausência de outra causa aparente; e/ou lesão tubular aguda na ausência de outra causa aparente.
2. Evidência histológica de interação atual ou recente do anticorpo com o endotélio, definida por ao menos um dos critérios seguintes: depósito linear de C4d no capilar peritubular (C4d superior a 0); inflamação microvascular moderada ou intensa (g+ptc igual ou superior a 2, sendo g igual ou superior a 1); e/ou aumento de transcrição gênica sugestivo de lesão endotelial.
3. Detecção de DSAs (HLA ou não-HLA) no soro.

1.8.2: RMA crônica

São considerados critérios diagnósticos de rejeição crônica mediada por anticorpos (36):

1. Evidência histológica de lesão tecidual crônica, definida pela presença de ao menos um dos itens seguintes: glomerulopatia do transplante (cg superior a 0); capilarite peritubular intensa com membrana basal multilaminada na microscopia eletrônica; fibrose intimal arterial.
2. Evidência histológica de interação atual ou recente de anticorpos com o endotélio vascular, definida pela presença de ao menos um dos itens seguintes: depósito linear de C4d nos capilares peritubulares (C4d superior a 0); inflamação microvascular moderada ou intensa (g+ptc igual ou superior a 2, sendo g igual ou superior a 1); e/ou aumento de transcrição gênica sugestivo de lesão endotelial.
3. Detecção de DSAs (HLA ou não-HLA) no soro.

1.9: Tratamento de RMA e prognóstico

A terapia imunossupressora de manutenção considerada padrão atualmente consiste na associação de um inibidor de calcineurina (tacrolimo ou ciclosporina), um análogo de purina (ácido micofenólico) e corticoide (11). Tais drogas são predominantemente dirigidas contra os linfócitos T e são eficazes na prevenção e tratamento de rejeição aguda mediada por células, mas são pouco úteis nos quadros de RMA (11). As medicações com ação na imunidade humoral podem ser divididas em: (a) depletoras de linfócitos B circulantes; (b) drogas que atuam na interação entre linfócitos T e B; (c) drogas que atuam na sinalização de sobrevivência de linfócitos B; e (d) terapias que atuam na produção e ação dos anticorpos (11).

Os principais objetivos do tratamento de RMA são a remoção dos anticorpos potencialmente prejudiciais da circulação, por meio de plasmaférese (PF) ou imunoabsorção, e a modulação de componentes das imunidades inata e adquirida, por meio de tratamento com imunoglobulina endovenosa (IVIG) e do anticorpo anti-CD20 rituximab (23,37). O tratamento de RMA considerado padrão e recomendado pela *The Transplantation Society* (TTS) consiste em PF, IVIG e corticosteroides, avaliando a necessidade de tratamento adjuvante com rituximab (38–40).

A PF é um tratamento extracorpóreo que permite a remoção de uma substância patogênica do plasma, como anticorpos prejudiciais, e geralmente é adjuvante a uma terapia específica modificadora da doença (41). Por meio desse procedimento, ocorre separação automatizada dos componentes do sangue, como plasma, leucócitos e eritrócitos, com a remoção de uma parte de volume plasmático e sua substituição com outro fluido, como albumina, colóide ou cristalóide (41). Durante o procedimento, geralmente é realizada anticoagulação com citrato de sódio, de forma que podem ocorrer sintomas leves de hipocalcemia, como parestesia oral e de extremidades. Reações adversas mais raras possivelmente observadas durante o procedimento são hipotensão, tetania ou arritmias (41). Para prevenção desses sintomas, pode ser administrado cálcio endovenoso durante a sessão. Outros efeitos adversos podem estar relacionados ao cateter vascular, redução de nível sanguíneo de medicações devido à remoção do plasma e substituição por albumina, alcalose metabólica, hipocalemia ou depleção de fatores de coagulação (41). A mortalidade associada ao procedimento é considerada baixa, com taxa variando de 0,03% a 0,05% (41). O tratamento com PF remove 80% a 90% dos anticorpos, propiciando 80% de sobrevida do enxerto em 18 meses (23).

A composição de IgG nas preparações de IVIG é similar ao encontrado no soro humano, correspondendo em quase sua totalidade a IgG intacta com uma meia vida de 3 a 4 semanas (42). Os efeitos do tratamento com IVIG resultam de sua característica imunomodulatória, principalmente em linfócitos B (23). A IVIG tem ação na indução de apoptose de linfócitos B, reduzindo a contagem dessas células, bem como de monócitos (23). O tratamento com IVIG também causa redução da expressão de moléculas de superfície, como HLA de classe II, e de co-estimuladores como CD19, CD20 e CD40 em linfócitos B, causando modulação da sua sinalização (23,42). Ela também pode modificar a produção de citocinas pelas células dendríticas (42) e atuar sobre linfócitos T, influenciando o equilíbrio entre linfócitos Th17 e linfócitos T regulatórios, contribuindo para a tolerância imunológica (42). A IVIG também tem potencial de neutralizar a ação de anticorpos patogênicos circulantes, por meio de sua interação com a região variável desses anticorpos (42), e de inibir a ligação de anticorpos anti-HLA às células-alvo em aproximadamente 80% (23). Ela também promove inibição da ativação do complemento (23), sobretudo quando utilizada em altas doses (42), por meio da solubilização de imunocomplexos, tornando-os mais

suscetíveis à depuração e ineficazes na ativação da cascata do complemento, além de inibição direta da cascata (42).

O rituximab é um anticorpo monoclonal anti-CD20, que se liga à superfície de precursores e linfócitos B maduros, resultando em depleção dessas células (23). A adição de rituximab ao tratamento com PF e IVIG tem sido associada a redução mais significativa do DSA e melhora da sobrevida do enxerto em alguns estudos (38,40,43). Entretanto, tais efeitos não foram verificados em uma revisão sistemática (44) nem em um estudo prospectivo multicêntrico (45), sugerindo que a depleção de linfócitos B associada ao uso de rituximab não demonstrou efeito aditivo no tratamento de RMA (39). O uso do inibidor de proteassoma bortezomib, que tem ação sobre linfócitos B *naïve*, linfócitos B de memória e plasmócitos (11), não melhorou os aspectos histológicos, moleculares ou níveis de DSA em pacientes com RMA, e houve significativa toxicidade associada a esse tratamento (39). Entretanto, o uso de um inibidor irreversível de proteassoma alternativo, o carfilzomib, ao tratamento com PF e IVIG, mostrou-se útil na redução dos níveis de DSA, com toxicidade aceitável (46). Estudos com número pequeno de indivíduos mostraram que drogas inibidoras do complemento tiveram eficácia limitada no tratamento de RMA, com ou sem efeitos colaterais mínimos (46). Outras possibilidades terapêuticas estão em investigação, como o anticorpo monoclonal anti-interleucina 6 tocilizumab, mas houve pouco progresso no desenvolvimento de tratamentos efetivos (39).

Evidências de alta qualidade sobre opções terapêuticas eficazes no tratamento de RMA são escassas (39,47), e a forma mais adequada de tratamento dessa condição persiste incerta. O tratamento de RMA com PF e IVIG tem se mostrado útil na melhora dos desfechos em curto prazo, mas os efeitos a longo prazo persistem insatisfatórios (21). Evidências da eficácia do tratamento são ainda mais escassas em pacientes com RMA crônica, casos em que são esperados poucos resultados com os tratamentos conhecidos (21). A presença de DSA e sua consequência sobre o enxerto renal tem implicações importantes no prognóstico do transplante renal. Pacientes com DSA de classe II apresentam alto risco de desenvolver glomerulopatia do transplante (20). Os DSAs de subclasse DQ tem sido apontados como os anticorpos de novo mais frequentemente detectados após o transplante, e quando se apresentam juntamente com outros anticorpos de classe I e II estão associados a significativa redução da sobrevida do enxerto renal (48).

1.10: Justificativa

O desenvolvimento de métodos mais sensíveis de detecção de anticorpos anti-HLA permitiu a melhor identificação dos DSAs envolvidos na gênese da lesão renal em pacientes com RMA. A lesão endotelial pode se manifestar de diversas formas na biópsia do enxerto renal, como glomerulite e capilarite peritubular, com evolução para dano crônico tubulointersticial. Os espectros clínico e histopatológico da RMA são variáveis e diretamente relacionados com a sobrevida do enxerto. O tratamento de RMA, embora tenha se mostrado eficaz em alguns casos de rejeição aguda, não mostrou a mesma efetividade nas formas crônicas. Além disso, os efeitos do tratamento sobre os diferentes subtipos de DSA não estão completamente esclarecidos.

1.11: Hipótese

As características dos DSAs, tais como classe (I e II) e intensidade média de fluorescência (MFI), exercem efeito sobre as formas de apresentação clínica da RMA e os achados histológicos da rejeição. A resposta ao tratamento dos casos de RMA estaria associada a fatores como: (a) intensidade das lesões teciduais; (b) especificidades dos DSAs envolvidos na rejeição; e (c) comportamento da cinética dos DSAs.

2. OBJETIVOS

2.1: Geral

Avaliar a influência das características dos anticorpos anti-HLA doador-específicos, tais como classe (I e II) e intensidade média de fluorescência (MFI), sobre as diversas formas de apresentação clínica e histológica, resposta ao tratamento e prognóstico em transplantados renais com diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos.

2.2: Específicos

Avaliar:

2.2.1: as diversas formas de manifestação clínica e histológica da RMA em receptores de transplante renal, e a influência das características de classe (I e II) e intensidade média de fluorescência (MFI) dos DSAs sobre as mesmas;

2.2.2: os efeitos verificados durante o primeiro ano após o tratamento com PF e/ou IVIG em receptores de transplante renal com diagnóstico de RMA, avaliados por meio de parâmetros clínicos e laboratoriais, intensidade de fluorescência de DSA, e características histológicas em biópsia do enxerto;

2.2.3: influência das características de classe (I e II) e intensidade média de fluorescência (MFI) dos anticorpos anti-HLA doador-específicos (DSA) no prognóstico do enxerto renal em pacientes receptores de transplante renal com diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos.

3. METODOLOGIA

3.1: Desenho do estudo

Trata-se de coorte retrospectiva, incluindo transplantados renais com diagnóstico de RMA, comprovada por biópsia renal e pela identificação de anticorpos anti-HLA doador-específicos (DSA), durante o seguimento pós-transplante renal. Os pacientes foram selecionados a partir de uma coorte de transplantados renais com anticorpos anti-HLA (DSA e não-DSA) detectados antes e/ou após o transplante renal, em acompanhamento no ambulatório de Transplante Renal Adulto do Hospital das Clínicas do HC/UNICAMP no período de 2012 a 2019.

Entre os pacientes incluídos, foi identificado um subgrupo com alterações histológicas compatíveis com nefropatia membranosa associada à RMA. Foi realizada avaliação retrospectiva dos dados clínicos, laboratoriais, imunológicos e histológicos desses casos, com revisão da literatura sobre a associação de nefropatia membranosa com RMA em transplantados renais.

3.2: Critérios de inclusão da coorte retrospectiva

Foram incluídos na coorte retrospectiva os pacientes receptores de transplante renal de doadores vivos ou falecidos, realizados no HC-UNICAMP no período de 2012 a 2019, que permaneceram em seguimento após o transplante renal no serviço, com idade superior a 18 anos no momento do transplante renal, com diagnóstico de RMA comprovado por biópsia e por detecção de DSA na circulação.

3.3: Critérios de exclusão da coorte retrospectiva

Foram excluídos do estudo os receptores de transplante renal com idade inferior a 18 anos na ocasião do transplante. Os casos de ausência de informações de tipificação HLA dos doadores ou ausência de comprovação histológica de RMA também foram excluídos do estudo.

3.4: Critérios de inclusão da análise secundária – NM e RMA

Para a análise secundária, foram incluídos os pacientes da coorte retrospectiva com diagnóstico de RMA que apresentaram diagnóstico histológico de nefropatia membranosa de novo, caracterizado pela presença de depósitos subepiteliais com a presença de espículas na membrana basal glomerular analisada por microscopia eletrônica de transmissão.

3.5: Coleta de dados

Informações clínicas e laboratoriais foram retrospectivamente coletadas de prontuários médicos e do banco de dados do Programa de Transplante Renal do HC-Unicamp, no momento de realização do transplante, na ocasião do diagnóstico de RMA, e nos meses 6 e 12 após o tratamento. Os dados coletados foram organizados em planilha do software Microsoft® Excel. As informações coletadas foram:

Parâmetros clínicos:

1. Receptores: idade, gênero, etiologia da doença renal crônica, número de transfusões sanguíneas realizadas antes do transplante, transplante prévio,

gestações pré-transplante, perdas de enxerto (óbito com rim funcionante ou falência do enxerto).

2. Doadores: tipo de doador (vivo ou falecido), idade, gênero, critérios para doador expandido, creatinina sérica no momento da retirada do órgão, índice de perfil de doadores renais (KDPI, do inglês *kidney donor profile index*) (49).
3. Transplante: número de incompatibilidades HLA-A, B e DR entre doadores e receptores, RCP (%) classes I e II, número de casos com DSA pré-formados, número de casos com anticorpos anti-HLA não-DSA pré-formados, tempo de isquemia fria, ocorrência de atraso de função do enxerto, terapia imunossupressora de indução.

Parâmetros laboratoriais:

1. Receptores: identidade HLA, intensidade de fluorescência dos anticorpos anti-HLA, creatinina sérica (mg/dL), relação proteína/creatinina em amostra de urina.
2. Doadores: identidade HLA, creatinina sérica na retirada do órgão (mg/dL).

Parâmetros de biópsia renal:

1. Tempo após o transplante para realização da biópsia (meses).
2. Morfologia: número de glomérulos, porcentagem de glomérulos esclerosados em cada amostra, número de casos de acordo com o diagnóstico e classificação de rejeição aguda (celular e/ou mediada por anticorpos), número de casos de acordo com a classificação de cada tipo de rejeição, número de casos de acordo com a intensidade de fibrose intersticial e atrofia tubular por amostra, parâmetros histológicos considerados para diagnóstico e classificação de RMA.

Parâmetros imunológicos:

1. RCP de classes I e II.
2. Classe dos DSAs identificados.
3. Intensidade média de fluorescência dos DSAs.

3.6: Tipificação HLA e detecção de anticorpo anti-HLA

3.6.1: Indicação

Todos os receptores de transplante renal incluídos no estudo apresentaram prova cruzada por meio de teste de citotoxicidade dependente de complemento (CDC,

do inglês *complement dependent cytotoxicity*) negativa para linfócitos T e B no momento do transplante renal. A prova cruzada foi realizada a partir de sangue periférico de doadores vivos, ou fragmentos de baço ou linfonodo para doadores falecidos. A reação entre antígenos e anticorpos foi identificada após a adição e ativação de complemento e consequente alteração da permeabilidade da membrana, que permitiu a incorporação de corantes. Para aumento da sensibilidade do teste, foram adicionados antiglobulina humana (AGH, do inglês *antihuman globulin*) na prova cruzada com linfócitos T, e agente redutor ditioneitol (DTT) para inativação de IgM nas provas cruzadas com linfócitos T e B. A presença de autoanticorpo citotóxicos foi identificada com o uso de linfócitos autólogos.

A pesquisa de anticorpos anti-HLA após o transplante foi realizada em casos de suspeita de rejeição (aumento de creatinina sérica superior a 20% do valor basal e/ou surgimento ou aumento de proteinúria, sem outras causas identificáveis) para pacientes de baixo risco imunológico, ou seja, com reatividade contra painel (RCP) inferior a 30% e ausência de DSA. Em casos de receptores hipersensibilizados (RCP superior a 30%) na ausência de DSA, foi realizada nova pesquisa de anticorpos no primeiro ano após o transplante renal. Para os casos de DSA detectados antes do transplante, foram realizadas pesquisas de anticorpos anti-HLA em 3, 6, 9 e 12 meses após o transplante renal.

3.6.2: Metodologia

Conforme protocolo utilizado no serviço (50), todos os receptores tiveram o HLA identificado por meio de técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) a partir de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) isolado de amostra de sangue venoso periférico. Iniciadores moleculares (LABType™ SSO and Micro SSP™), desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs, do inglês *phosphatized deoxyribonucleotides*) e Taq DNA polimerase foram misturados com alíquotas de DNA. O material foi então desnaturado, neutralizado, misturado com solução tampão e micropérolas e marcado com corante fluorescente (*Streptavidin, R-Phycoerythrin conjugate* – SAPE). A identificação da intensidade de fluorescência das esferas foi realizada pelo analisador de fluxo LABSCcan™, e os dados foram analisados utilizando o software HLA fusion™ (One Lambda Inc, California – USA). Os HLAs -A, -B e -DRB1 foram rotineiramente identificados, e

tipagem HLA-DQ adicional foi realizada nos casos em que foram identificados anticorpos anti-DQ no soro dos receptores.

Os anticorpos anti-HLA de classes I e II, antes e após o transplante renal, foram pesquisados por meio de ensaios em fase sólida (LABScreen™ Single Antigen HLA Class I LS1A04 e LABScreen™ Single Antigen HLA Class II LS2A01), com microesferas marcadas com cores e cobertas por antígenos HLA purificados. Para isso, foram utilizadas amostras de sangue venoso periférico dos receptores. Os anticorpos anti-HLA presentes no soro desses receptores ligaram-se aos antígenos presentes nas esferas, e essa ligação foi identificada por meio de um conjugado de IgG de cabra anti-humano com corante fluorescente (R-Ficoeritrina). A fluorescência de cada conjugado foi analisada no LABScan™ e posteriormente avaliada no software HLA fusion™ (One Lambda Inc, California – USA).

3.7: Avaliação histológica

Os fragmentos de rim transplantado foram obtidos por meio de biópsia percutânea guiada por ultrassonografia. Os fragmentos foram fixados em parafina e corados com hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff e tricrômio de Masson para avaliação em microscopia óptica, com realização de imunofluorescência e microscopia eletrônica na maioria dos casos. A análise histológica foi graduada de acordo com a classificação de Banff 2013, revisada em 2015 (36). Nos fragmentos fixados em parafina foi realizada pesquisa de C4d por imuno-histoquímica (anticorpo monoclonal de coelho anti-humano, C4d clone SP91, Spring Bioscience Corp), sendo a positividade para C4d nos capilares peritubulares graduada de 0 a 3+ (51).

Nos casos com diagnóstico de RMA associada a alterações compatíveis com NM na microscopia eletrônica, foi realizada a pesquisa da expressão de PLA2R por imuno-histoquímica, em fragmentos de tecido renal fixados em parafina. Para isso, fragmentos de quatro micra foram desparafinizados por meio de três imersões em xilol (Labsynth, SP, Brasil) por 4 minutos cada, seguida de reidratação por imersão sequencial em etanol (100/95/80%). A recuperação antigênica foi realizada por incubação em solução tampão Tris-EDTA (pH 9,0) por 40 minutos a 95°C. Após dois ciclos de lavagem de 5 minutos com solução salina tamponada Tris contendo 0,05% Tween 20 (Labsynth) (pH 7,4 – TBS-T), a peroxidase endógena foi bloqueada com a

incubação com solução de H_2O_2 a 3% por 15 minutos. O bloqueio de proteína foi realizado com solução do *Immunohistoprobe two-step polymer kit* (Advanced Biosystems LLC, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O anticorpo primário (anti-PLA2R monoclonal, Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) foi diluído 1:250 em TBS adicionado de solução de albumina sérica bovina 1% (Sigma Aldrich), com incubação por 18 horas a 4°C. Após esse período, foram realizados três ciclos de lavagem com TBS-T, seguido de incubação com anticorpo secundário e com polímero HPR, ambos do *Immunohistoprobe two step polymer kit* (Advanced Biosystems LLC, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizada a coloração DAB (Dako North America, Inc., CA, USA) para revelação imunohistoquímica, de acordo com as recomendações do fabricante, e os fragmentos foram contra corados com solução de Hematoxilina (Dinâmica Química, SP, Brazil).

Fragmentos de biópsia marcados apenas com o anticorpo secundário conjugado foram usados para avaliação de marcações inespecíficas de fundo. Os fragmentos foram analisados por microscopia óptica (aumento de 400x) usando o microscópio Nikon Eclipse 80i® microscope (Japan), e as imagens foram capturadas e processadas em tempo real com o programa NIS-Elements AR® (Nikon, Japan).

3.8: Terapia imunossupressora

A terapia de indução de imunossupressão utilizada para os casos de rins provenientes de doadores renais considerados padrão (idade inferior a 50 anos, com função renal normal - creatinina sérica no momento da retirada do órgão inferior a 1,5 mg/dL) implantados em receptores considerados de baixo risco imunológico (RCP inferior a 30%, ausência de DSA, sem antecedente de transplante de órgãos), e não priorizados por falta de acesso para diálise, consistiu de anticorpo anti-receptores de interleucina 2 (basiliximab 20 mg, endovenoso, no dia do transplante e no quarto dia após o transplante renal).

Nos casos de doadores de critério expandido pelos critérios estabelecidos pela UNOS (52) (idade superior a 60 anos; ou idade entre 50 e 60 anos com pelo menos 2 dos 3 critérios - hipertensão arterial sistêmica, creatinina sérica superior a 1,5 mg/dL antes da remoção do órgão, morte por acidente vascular encefálico) ou de doadores em lesão renal aguda (creatinina sérica superior a 1,5 mg/dL na retirada do órgão), a terapia imunossupressora de indução utilizada foi globulina anti-timócitos

endovenosa, 3-7 mg/kg, com a dose total fracionada e realizada de acordo com a contagem diária de linfócitos totais em sangue venoso periférico.

Para receptores de transplante de doador vivo relacionado, com tipagem HLA idêntica, ou para os casos de transplante haploidêntico em receptores de baixo risco imunológico, não foi realizada indução de imunossupressão, devido às restrições da legislação vigente. Todos os receptores receberam metilprednisolona 500 mg endovenoso no momento do transplante, com redução gradual (250 mg – 125 mg) e manutenção com corticoide (< 20 mg de prednisona ao dia) durante todo o acompanhamento.

A terapia imunossupressora de manutenção mais utilizada consistiu em associação de inibidor de calcineurina, preferencialmente tacrolimo 0,2 mg/kg, dividido em duas doses orais diárias, com ajuste de acordo com nível sanguíneo após 12h de ingestão da medicação, associado a um antiproliferativo, preferencialmente micofenolato sódico 720 mg em duas doses orais diárias e ajuste de dose conforme superfície corporal, tolerância gastrointestinal, contagem de leucócitos e concentrações de hemoglobina e hematócrito em sangue venoso periférico. Não foram realizados procedimentos de dessensibilização para os receptores hipersensibilizados.

3.9: Tratamento de RMA

3.9.1: Protocolo de tratamento

O protocolo de tratamento utilizado para os casos de RMA aguda ou crônica consistiu de associação de PF e IVIG. Foram realizadas 5 sessões de PF, com um intervalo de 48 horas entre as sessões, utilizando o equipamento COM.TEC® (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Alemanha), com separador celular de fluxo contínuo ou descontínuo. A cada sessão, foi processada a quantidade de volume sanguíneo correspondente a uma volemia sanguínea.

O volume sanguíneo total (VST) foi calculado a partir da fórmula de Nadler (41), com base no sexo, altura em metros e peso em quilogramas:

$$\text{homens: } (0,3669) \times (\text{altura})^3 + (0,3219 \times \text{peso}) + 0,6041$$

$$\text{mulheres: } (0,3669) \times (\text{altura})^3 + (0,3219 \times \text{peso}) + 0,6041$$

Para o cálculo do volume plasmático total (VPT) estimado para um adulto, em litros, foi utilizada a seguinte fórmula (41):

$$VPT = (VST) \times (1 - \text{hematócrito})$$

O fluido de reposição utilizado foi composto de solução de cloreto de sódio 0,9% e albumina humana, na proporção de 2:3. A anticoagulação foi realizada com citrato, com reposição de cálcio endovenoso durante o procedimento, em caso de sintomas de hipocalcemia secundários ao citrato. No intervalo entre sessões de PF, os pacientes receberam IVIG 100 mg/kg/dia. Após a última sessão de PF, foi administrada IVIG, dividida em 3 a 4 dias, até completar a dose total de 2g/kg.

3.9.2: Resposta ao tratamento e terapia de manutenção

Para os casos em que se verificaram sinais histológicos de rejeição mediada por células associada, os pacientes categorizados como Banff 1A receberam terapia em pulso com metilprednisolona 500 mg endovenoso por 3 dias, em dose total de 1,5 g, enquanto os casos classificados como Banff 1B ou formas mais graves receberam globulina anti-timocítica na dose de 6 mg/kg, fracionada em três doses.

A resposta ao tratamento foi avaliada na maioria dos casos por meio de parâmetros clínicos e laboratoriais, achados histológicos de biópsia renal realizada após o tratamento, e pesquisa de DSA realizada 1 mês após o tratamento e a cada 3 meses subsequentemente. Os pacientes com níveis de DSA persistentemente elevados ou com piora dos achados histológicos receberam doses adicionais de IVIG 2g/kg em regime ambulatorial. Por se tratar de análise retrospectiva, alguns casos foram tratados antes do estabelecimento do protocolo atual, ou seja, receberam apenas IVIG, globulina anti-timocítica e/ou ajuste da terapia imunossupressora de manutenção.

O ajuste de tacrolimo foi realizado com o objetivo de manutenção de nível sanguíneo entre 6 e 8 ng/dL, e dose total de droga antiproliferativa foi realizada durante todo o tratamento e seguimento, de acordo com as condições clínico-laboratoriais do paciente e tolerância à medicação.

3.10: Mecanismos de busca da revisão da literatura

Realizamos uma revisão da literatura nas bases de dados Pubmed, Scopus e Web of Science, a fim de responder a pergunta: a nefropatia membranosa pode ser considerada uma manifestação histológica de rejeição mediada por anticorpos em transplantados renais? Para isso, dois pesquisadores realizaram a busca e seleção pareada dos títulos e resumos, com leitura do texto completo dos artigos selecionados, entre março de 2019 e dezembro de 2020, utilizando os termos “membranous nephropathy” e “antibody-mediated rejection”.

Todos os dados extraídos dos artigos selecionados foram categorizados em tipo de estudo, desenho do estudo, número de casos de nefropatia membranosa relatados, classe de DSA, presença de infecção pelo vírus da hepatite C, tratamento utilizado e efetividade do tratamento. Foram incluídos estudos de relato de caso, revisões sistemáticas, ensaios clínicos, estudos multicêntricos e meta-análises. Selecionamos os estudos com casos de nefropatia membranosa de novo identificados no momento do diagnóstico de RMA. Após leitura integral dos artigos selecionados, os dados foram categorizados de acordo com o desenho do estudo, número de casos de NM relatados, classe de DSA, infecção pelo vírus da hepatite C, tratamento da NM e sua efetividade.

3.11: Análise Estatística

Os dados coletados foram organizados em planilha do software Microsoft® Excel e foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 7.0c™ for Mac (La Jolla CA, USA). As variáveis contínuas foram expressas como média $\pm$ desvio padrão, mediana e amplitude e/ou porcentagens. Variáveis contínuas foram comparadas utilizando o teste t de Student para dados com distribuição normal e Mann-Whitney para dados com distribuição anormal. As variáveis categóricas foram analisadas por meio do teste χ^2 de Pearson. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e válidos para considerar, com 95% de certeza, se tratar falsa a hipótese nula.

3.12: Avaliação Ética

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp, CAAE 51485415.6.0000.5404, conforme consta na seção de Anexos. Como se tratou de análise retrospectiva, com avaliação de prontuários médicos e de banco de dados do programa, sem que houvesse contato direto entre pesquisador e indivíduos incluídos no estudo, foi solicitada a dispensa da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE. Após coleta de dados, as fichas contendo os dados do prontuário foram numeradas e, no banco de dados, foram suprimidos os nomes dos indivíduos, como forma de preservar a confidencialidade.

4. RESULTADOS

4.1: Características gerais

Entre 2012 e 2019, foram realizados no HC-UNICAMP 1.015 transplantes renais, dos quais 956 em receptores maiores de 18 anos de idade. Foram excluídos do estudo 467 pacientes por ausência de pesquisa de anticorpos anti-HLA após o transplante. Duzentos e trinta e oito pacientes apresentaram reatividade contra painel zero para anticorpos de classes I e II antes e após o transplante renal, e também foram excluídos da análise [Figura 3].

Entre os 251 pacientes que apresentaram anticorpos anti-HLA antes e/ou após o transplante renal, 92 apresentavam RCP zero de classes I e II pré-transplante, 113 apresentavam anticorpos anti-HLA inespecíficos antes do transplante e 46 apresentavam DSA pré-formados. Entre os 92 pacientes com RCP zero pré-transplante, 60 apresentaram DSA após o transplante, dos quais 18 (30,0%) preencheram critérios histológicos para RMA. Dos 113 pacientes com anticorpos anti-HLA inespecíficos antes do transplante, 35 apresentaram anticorpos dirigidos contra antígenos do doador após o transplante e 16 (45,7%) foram diagnosticados com RMA. Entre os 46 pacientes com DSA pré-formado, 8 (17,4%) desenvolveram RMA [Figura 1]. Os 42 pacientes com diagnóstico de RMA foram incluídos no estudo.

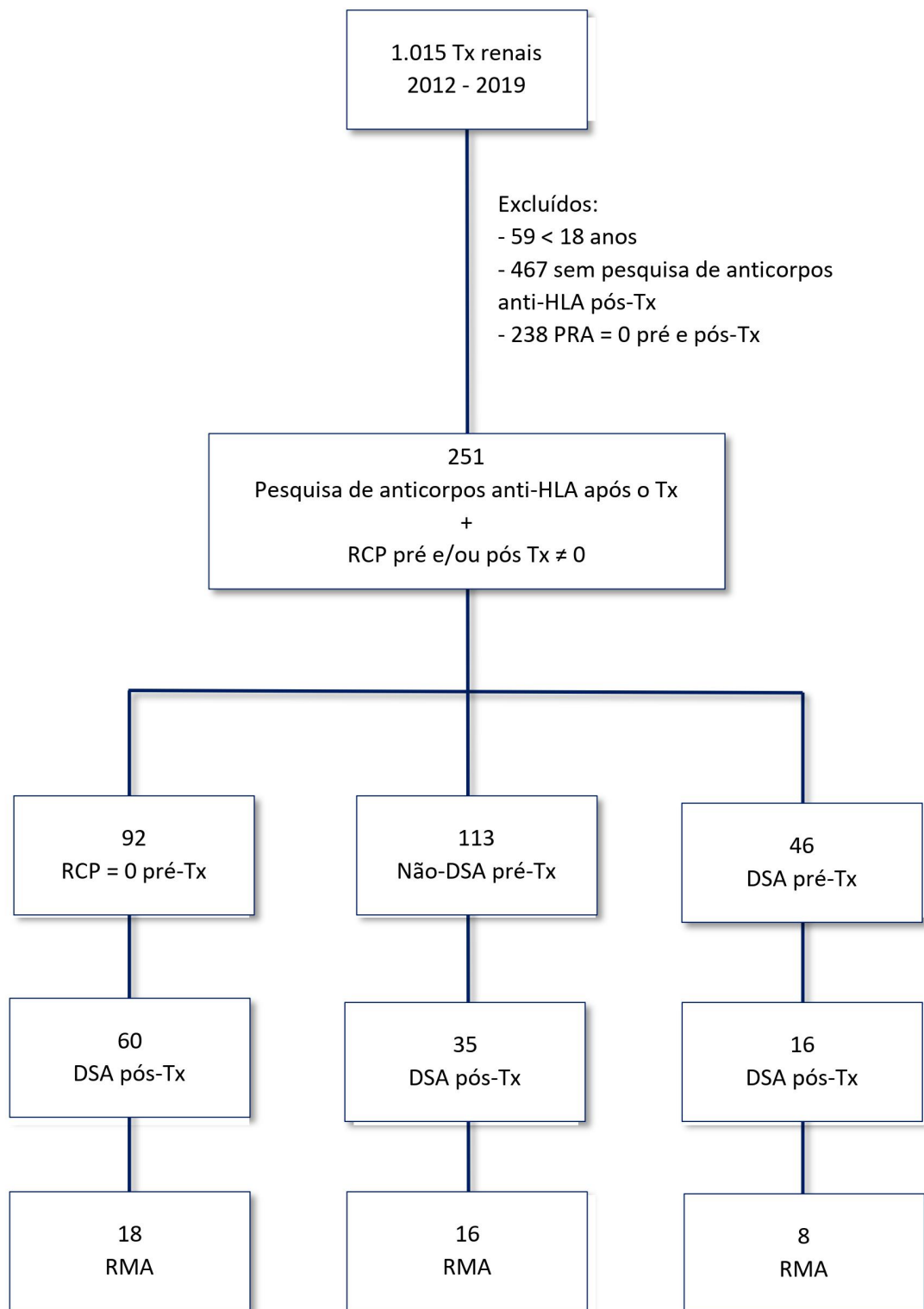


Figura 3. Seleção dos pacientes do estudo. Tx, transplantes; RCP, reatividade contra painel; DSA, anticorpos anti-hla doador-específicos, do inglês *donor specific anti-hla antibody*, RMA, rejeição mediada por anticorpos.

As características gerais dos pacientes incluídos no estudo estão apresentadas na Tabela 1. A média de idade dos receptores foi de $36,4 \pm 12,6$ anos, sendo a maioria desses pacientes ($n=22$, 52,3%) do sexo masculino. A principal etiologia da doença renal crônica foi glomerulonefrite crônica ($n=19$, 45,2%), seguido de causa indeterminada ($n= 12$, 28,6%). A idade média dos doadores foi de $34,9 \pm 14,9$ anos. A maioria dos transplantes era de doadores falecidos ($n=37$, 88,1%), com média de KDPI de $43,1 \pm 28,8\%$.

Em vinte e quatro (57,1%) pacientes foram detectados anticorpos anti-HLA antes do transplante renal, com média de RCP de classe I de $14,6 \pm 25,2\%$ e de classe II de $11,1 \pm 25,2\%$. Oito pacientes (19%) apresentavam DSA pré-formado, enquanto dezesseis (38,1%) apresentavam anticorpos anti-HLA não-DSA. A análise dos fatores de risco de sensibilização anti-HLA revelou que vinte e dois (52,4%) pacientes haviam recebido hemotransfusão e 9 (45%) mulheres referiam gestação prévia. A média de incompatibilidade HLA-A, -B e -DR entre doadores e receptores foi de $3,9 \pm 1,1$. Entre os indivíduos incluídos no estudo, um dos pacientes teve RMA diagnosticada após vacinação inadvertida contra febre amarela e desenvolvimento da forma selvagem da doença. Esse paciente desenvolveu DSAs de classes I e II, associado a achados morfológicos de RMA. O relato desse caso clínico encontra-se nos Anexos [Anexo 9.5].

Considerando a terapia imunossupressora, vinte e dois (52,4%) pacientes receberam indução com anticorpo anti-interleucina 2 (Basiliximab), enquanto dezesseis (38,1%) utilizaram globulina anti-timócitos, na dose média de $5,8 \pm 1,2$ mg/kg. A maioria dos pacientes (76,2%) fazia uso de inibidor de calcineurina como terapia imunossupressora de manutenção no momento do diagnóstico da RMA, com nível sanguíneo médio do tacrolimo ao diagnóstico de $5,3 \pm 3,1$ ng/mL.

A mediana de tempo pós-transplante para o diagnóstico de RMA foi de 27,2 (0,3 - 213,0) meses, com 54,8% dos casos ocorrendo após 24 meses de transplante. No período anterior ao diagnóstico de RMA, dois pacientes (4,7%) apresentaram episódio de rejeição aguda mediada por células e 4 (9,5%) haviam sido submetidos a troca de esquema imunossupressor por detecção de célula decoy em amostra isolada de urina. Nenhum caso, entretanto, apresentou lesões histológicas compatíveis com nefropatia por poliomavírus. Nenhum dos pacientes incluídos no estudo havia apresentado infecção por citomegalovírus diagnosticada no período anterior ao diagnóstico de RMA.

O tratamento de RMA foi realizado com IVIG em trinta e oito (90,5%) pacientes e PF em vinte e seis (61,9%). Vinte e cinco pacientes (59,5%) receberam o tratamento com IVIG 2g/kg associada a 5 sessões de PF. Desse grupo, dezessete pacientes receberam tratamento adicional, sendo seis com metilprednisolona, seis com globulina anti-timocítica na dose de 6 mg/kg e cinco com a associação de metilprednisolona e globulina anti-timocítica. Treze (31,0%) pacientes receberam apenas IVIG 2g/kg, dos quais três receberam terapia adicional com metilprednisolona. Um paciente foi tratado com plasmaférese, sem imunoglobulina associada, e recebeu tratamento adicional com metilprednisolona e timoglobulina. Três pacientes (7,1%) foram tratados apenas com globulina anti-timócitos ou metilprednisolona, associados a ajuste da terapia imunossupressora de manutenção [Figura 4]. O nível sanguíneo do tacrolimo permaneceu estável ao longo do seguimento, sendo menor do que o alvo desejado de 6-8 ng/ml em 6 e 12 meses após o tratamento de RMA ($5,7 \pm 1,8$ e $5,6 \pm 1,9$, respectivamente).

Tabela 1. Características gerais dos receptores de transplante renal com diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos (RMA) comprovada por biópsia do enxerto, submetidos a tratamento.

<i>Receptores de transplante renal</i>	
Total, n	42
Idade (anos)	36,4 ± 12,6
Masculino, n (%)	22 (52,3)
Etiologia da DRC (%)	
Glomerulonefrite crônica	19 (45,2)
Indeterminada	12 (28,6)
Hipertensão arterial sistêmica	4 (9,5)
Diabetes mellitus	1 (2,4)
Outras	6 (14,3)
Transfusão pré-transplante, n (%)	22 (52,4)
Transplante prévio, n (%)	5 (11,9)
Mulheres com gestação pré-transplante, n (%)	9 (45,0)
Incompatibilidades HLA ABDR	3,9 ± 1,1
RCP classe I pré-transplante (%)	14,6 ± 25,2
RCP classe II pré-transplante (%)	11,1 ± 25,2
DSA pré-formado, n (%)	8 (19,0)
Não-DSA pré-formados, n (%)	16 (38,1)
<i>Doadores</i>	
Doadores falecidos, n (%)	37 (88,1)
Idade (anos)	34,9 ± 14,9
Masculino, n (%)	21 (50,0)
Doadores de critério expandido (%)	6 (16,2)
Creatinina sérica (mg/dl)	1,3 ± 1,1
KDPI (%)	43,1 ± 28,8
<i>Transplante</i>	
Terapia imunossupressora inicial	
Globulina anti-timócito (%)	16 (38,1)
Dose de globulina anti-timócito (mg/kg)	5,8 ± 1,2
Anticorpo anti-receptor de IL-2 (%)	22 (52,4)
Metilprednisolona isolada (%)	4 (9,5)
Tempo de isquemia fria (horas)	21,2 ± 6,5
DGF, n (%)	10 (23,8)
<i>Rejeição mediada por anticorpos</i>	
Tempo pós-transplante (meses)	27,2 (0,3-213,0)
RMA ≤ 24 meses, n (%)	19 (45,2)
RMA > 24 meses, n (%)	23 (54,8)
ICN ao diagnóstico de RMA, n (%)	32 (76,2)

n, número; DRC, doença renal crônica; HLA, antígeno leucocitário humano, do inglês *human leukocyte antigen*; RCP, reatividade contra painel; DSA, anticorpos anti-HLA doador-específicos, do inglês *donor specific anti-HLA antibody*; KDPI, índice de perfil de doadores renais, do inglês *kidney donor profile index*; DGF, atraso de função do enxerto, do inglês *delayed graft function*; RMA, rejeição mediada por anticorpos; ICN, inibidor de calcineurina; IVIG, imunoglobulina endovenosa, do inglês *intravenous immunoglobulin*; PF, plasmaférese.

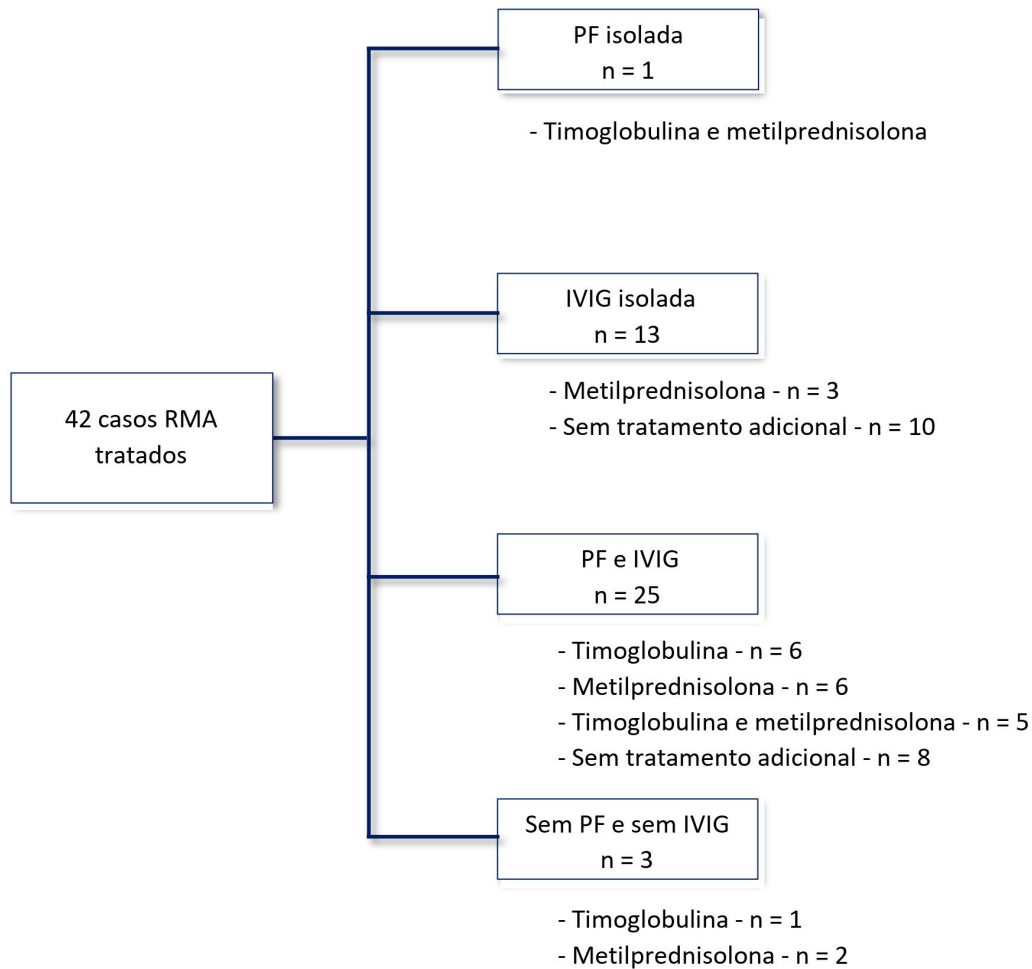


Figura 4. Pacientes com rejeição mediada por anticorpos de acordo com o tratamento recebido. RMA, rejeição mediada por anticorpos; PF, plasmáfereze; IVIG, imunoglobulina endovenosa.

4.2: Características clínicas e imunológicas

Proteinúria ocorreu em trinta e seis (85,7%) pacientes no momento do diagnóstico de RMA, com valor médio de $2,1 \pm 3,1$ g/g. A taxa de filtração glomerular estimada (CKD-EPI) média ao diagnóstico de RMA foi de $30,3 \pm 17,8$ mL/min, sendo que dezoito (42,8%) pacientes apresentavam $\text{TFG} \leq 30$ mL/min e cinco (11,9%) exibiam $\text{TFG} > 60$ mL/min [Tabela 2].

Não houve alteração significativa na proteinúria no primeiro ano após o tratamento, com média inicial de $2,1 \pm 3,1$ g/g ao diagnóstico e $1,0 \pm 0,9$ g/g ao final

do seguimento. Não foi observada mudança significativa da média de taxa de filtração glomerular ao longo do seguimento. Três pacientes apresentaram infecção por citomegalovírus diagnosticada nos primeiros 12 meses após o tratamento. Dos quatro pacientes que apresentavam células decoy na urina antes do tratamento, apenas um persistiu com virúria detectável após mudança de imunossupressão e tratamento de RMA. Dois pacientes que não tinham células decoy detectáveis na urina antes do tratamento de RMA apresentaram sua detecção após o tratamento.

No diagnóstico de RMA, 18 (42,8%) pacientes apresentaram apenas DSA de classe II, 11 (26,2%) apenas DSA de classe I, e 13 (31,0%) DSA de classes I e II. A mediana de intensidade de fluorescência do DSA imunodominante variou de 945 a 24.883, com soma do DSA de classe I de 4.074 ± 5.257 MFI e soma do DSA de classe II de 16.248 ± 15.612 MFI [Tabela 2]. Seis meses após o tratamento, 37 (88,1%) pacientes apresentavam enxerto funcionante, com média de soma de DSA de classe I de 2.453 ± 3.524 MFI e média de soma de DSA de classe II de 19.780 ± 15.260 MFI. Houve redução significativa da média de RCP de classe I seis meses após o tratamento, de $41,8 \pm 33,3\%$ ao diagnóstico para $21,1 \pm 21,7\%$ após o tratamento ($p < 0,01$), enquanto a RCP de classe II permaneceu inalterada. A redução da RCP de classe I permaneceu ao longo do seguimento, atingindo $16,8 \pm 17,6\%$ ao final do primeiro ano ($p < 0,01$). Houve redução significativa do número de anticorpos anti-HLA não-DSA de classe I detectáveis após seis meses ($3,6 \pm 4,2$, $p = 0,04$) e doze meses ($1,8 \pm 2,1$, $p < 0,01$) de tratamento. Dezoito pacientes (51,4%) apresentavam DSA detectável após o tratamento, sendo a maioria ($n = 15$, 83,3%) com DSA de classe II. Estes pacientes foram tratados com PF ($n = 11$, 61,1%) e IVIG ($m = 18$, 100%), com resposta parcial [Tabela 2].

A intensidade de fluorescência dos DSAs de classe I diminuiu significativamente durante o seguimento, sendo para DSA-A de 7.198 ± 4.982 MFI ao diagnóstico para 2.988 ± 4.118 MFI final ($p = 0,03$) e, para DSA-B, de 5.254 ± 2.761 MFI para 1.401 ± 1.742 MFI ($p = 0,04$). Apenas três pacientes apresentaram DSA-DR detectável ao diagnóstico, com intensidade de fluorescência inferior a 3.500 MFI, e esses anticorpos tornaram-se indetectáveis 6 meses após o tratamento. A intensidade do DSA-DQ, que foi de 23.520 ± 13.597 MFI ao diagnóstico, permaneceu estável, atingindo 21.287 ± 14.658 MFI ao final do primeiro ano ($p = 0,60$).

O tratamento de RMA resultou em redução significativa de intensidade de fluorescência de DSA de classe I (-A e -B) durante o primeiro ano pós-tratamento

[Figura 1]. Como a maioria (74,1%) desses pacientes foi tratada com IVIG e PF, não foi possível comparar os efeitos isolados de cada um desses dois tratamentos na dinâmica do anticorpo. DSA-DR foi detectado em apenas três pacientes com RMA, tornando-se indetectável após seis meses de seguimento em dois, um deles tratado com IVIG e PF, e o outro com ajuste de medicação imunossupressora de manutenção. O terceiro caso apresentou óbito com enxerto funcionante, por causa cardiovascular, aos três meses após o transplante renal, sem a realização de pesquisa de DSA pós-tratamento. Dos trinta pacientes que apresentaram DSA-DQ ao diagnóstico de RMA, 20 (66,7%) receberam IVIG e PF, nove (30%) apenas IVIG, e um (3,3%) não recebeu tratamento específico. Em nenhum desses casos houve redução significativa na intensidade de fluorescência do DSA ao longo do seguimento [Figura 5].

Tabela 2. Imunologia e função do enxerto ao diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos (RMA) e após o tratamento.

	RMA	6 meses pós-tratamento	p [†]	12 meses pós-tratamento	p [‡]
Pacientes com enxerto funcional, n (%)	42 (100,0)	37 (88,1)		35 (83,3)	
RCP classe I (%)	41,8 ± 33,3	21,1 ± 21,7	<0,01 ^x	16,8 ± 17,6	<0,01 ^x
RCP classe II (%)	54,7 ± 34,7	58,7 ± 28,3	0,63 ^x	51,8 ± 32,5	0,75 ^x
DSA, n (%)	42 (100,0)	21 (56,7)		18 (51,4)	
Apenas DSA classe I	11 (26,2)	2 (9,5)	0,28 ^ª	3 (16,7)	0,24 ^ª
Apenas DSA classe II	18 (42,8)	12 (57,1)	0,76 ^ª	9 (50,0)	0,35 ^ª
DSA classes I e II	13 (31,0)	7 (33,4)		6 (33,3)	
DSA _{SOMA}	20.427 ± 16.329	23.558 ± 15.170	0,46 ^x	21.217 ± 14.874	0,86 ^x
DSA classe I _{SOMA}	4.074 ± 5.257	2.453 ± 3.524	0,19 ^x	2.009 ± 2.249	0,13 ^x
DSA A _{SOMA}	7.198 ± 4.982	4.537 ± 3.621	0,12 ^x	2.988 ± 4.118	0,03 ^x
DSA B _{SOMA}	5.254 ± 2.761	1.401 ± 1.742	0,04 ^x	1.124 ± 1.590	0,07 ^x
DSA classe II _{SOMA}	16.248 ± 15.612	19.780 ± 15.260	0,39 ^x	18.975 ± 15.455	0,54 ^x
DSA DR _{SOMA}	2.778 ± 947	0 ± 0	<0,01 ^x	0,0 ± 0,0	<0,01 ^x
DSA DQ _{SOMA}	23.520 ± 13.597	23.386 ± 13.471	0,97 ^x	21.2878 ± 14.658	0,60 ^x
DSA imunodominante _{MAX}	13.588 (945 – 24.883)	19.662 (1.400 – 24.647)	0,29 ^º	14.968 (1.400 – 22.859)	0,74 ^º
Não-DSA classe I [§]	7,4 ± 8,4	3,6 ± 4,2	0,04 ^x	1,8 ± 2,1	<0,01 ^x
Não-DSA classe II [§]	2,7 ± 2,4	2,3 ± 2,2	0,55 ^x	2,0 ± 1,9	0,27
Creatinina sérica, mg/dL	3,1 ± 1,9	2,8 ± 1,3	0,90 ^x	2,9 ± 1,5	0,93 ^x
TFG estimada (CKD-EPI), mL/min	30,3 ± 17,8	32,8 ± 18,3	0,59 ^x	31,9 ± 20,0	0,75 ^x
P/C, g/g	2,1 ± 3,1	1,4 ± 1,9	0,35 ^x	1,0 ± 0,9	0,15 ^x
P/C ≤ 0.15 g/g (%)	6 (14,3)	7 (18,9)	0,99 ^ª	7 (20,0)	0,99 ^ª
Sedimento urinário, n (%)					
Hemácias	2 (4,8)	0 (0,0)		0 (0,0)	
Leucócitos	13 (30,9)	4 (9,5)	0,20 ^ª	4 (9,5)	0,20 ^ª
Proteínas	23 (54,8)	18 (42,8)	0,88 ^ª	14 (33,3)	0,42 ^ª
Nível sanguíneo do tacrolimo (ng/mL)	5,3 ± 3,1	5,7 ± 1,8	0,49 ^x	5,6 ± 1,9	0,62 ^x

RMA, rejeição mediada por anticorpos; RCP, reatividade contra painel; DSA, anticorpo anti-HLA doador-específico, do inglês *donor specific antibody*; TFG, taxa de filtração glomerular; CKD-EPI, equação de estimativa de filtração glomerular, do inglês Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration; P/C, relação proteína urinária e creatinina urinária.

[†] Comparado ao apresentado na RMA.

[‡] Comparado ao apresentado na RMA.

^x Teste t não-pareado.

^ª Teste qui-quadrado.

^º Teste Mann Whitney.

[§] Número de Não-DSA com mediana de intensidade de fluorescência maior do que 1.500.

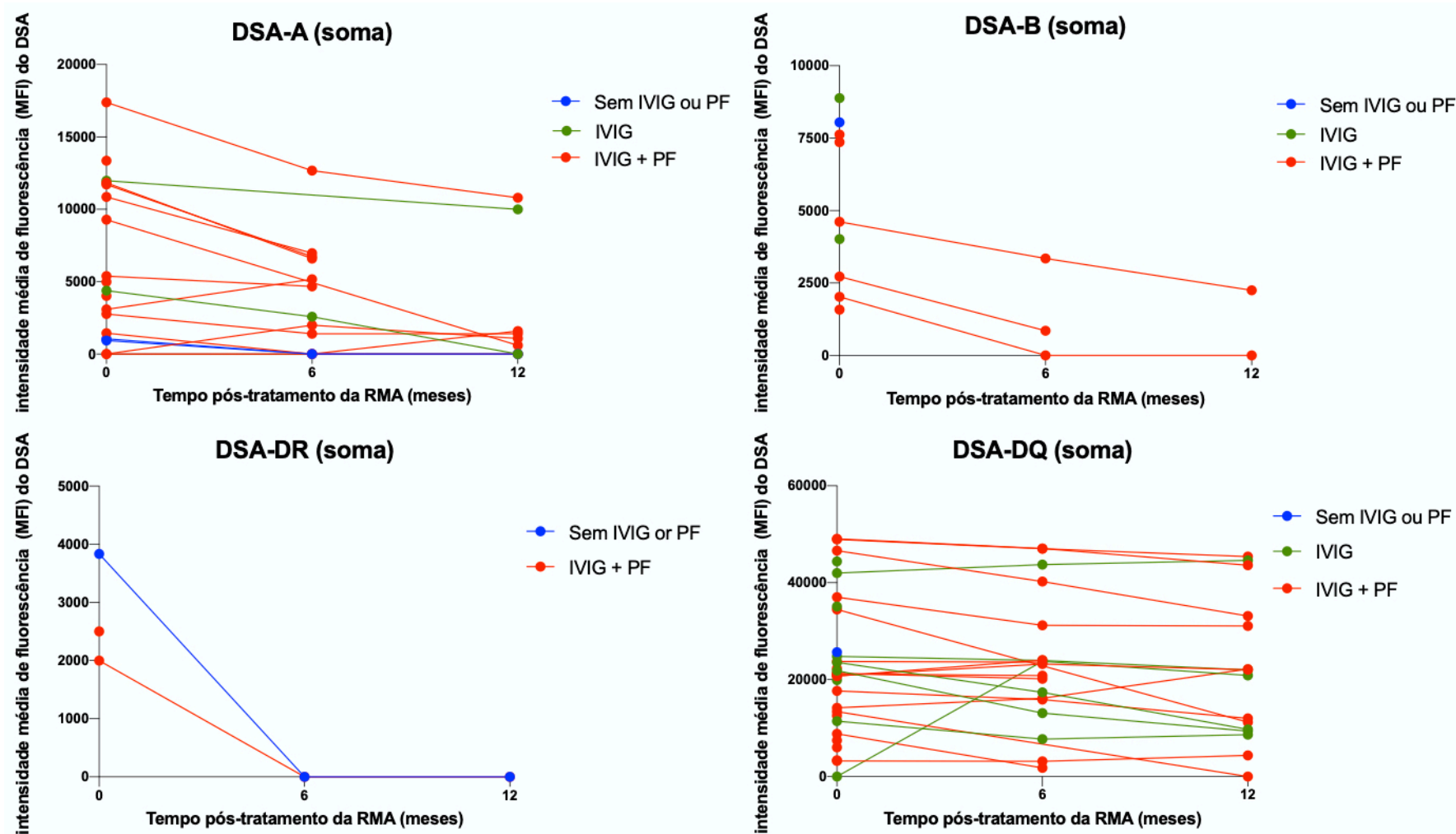


Figura 5. Dinâmica da intensidade média de fluorescência (MFI) de anticorpos anti-HLA doador-específicos (DSA) após o tratamento de rejeição mediada por anticorpos (RMA) com imunoglobulina endovenosa (IVIG) e/ou plasmaférese (PF).

4.3: Características histológicas

Ao diagnóstico de RMA, as biópsias renais avaliadas apresentaram média geral de inflamação microvascular (MVI) de $2,6 \pm 1,7$, com escore de C4d de $2,2 \pm 1,0$. Na avaliação geral dos casos, as biópsias pós-tratamento mostraram redução significativa do escore de inflamação (i), de $1,0 \pm 0,8$ para $0,5 \pm 0,6$ ($p < 0,05$), e no escore de depósito de C4d, de $2,2 \pm 1,0$ para $1,4 \pm 1,2$ ($p < 0,05$), sem alteração significativa dos demais parâmetros, em comparação às biópsias realizadas no diagnóstico de RMA [Tabela 3]. Não houve, durante o primeiro ano após o tratamento, diferença significativa no grau de esclerose glomerular ou nos escores de atrofia tubular (ct) ou fibrose intersticial (ci).

Os casos de RMA diagnosticados após 24 meses ($n=23$, 54,8%) apresentaram MVI de $3,2 \pm 1,4$, significativamente maior do que a MVI observada nos casos de RMA diagnosticados antes de 24 meses após o transplante ($1,9 \pm 1,8$, $p=0,01$). O escore de C4d dos casos de RMA diagnosticados mais tardiamente ($2,5 \pm 0,8$) também foi significativamente maior do que os casos de RMA mais precoces ($1,8 \pm 1,2$, $p=0,03$), bem como o escore de tubulite ($1,3 \pm 0,9$ versus $0,7 \pm 0,9$, tardio e precoce respectivamente, $p < 0,01$). Os achados de cronicidade, avaliados pela porcentagem de esclerose glomerular e escores de atrofia tubular e fibrose intersticial, foram também significativamente maiores nas biópsias dos casos de RMA tardios comparados aos de RMA precoce. Com o tratamento, os pacientes com RMA mais tardia apresentaram redução dos escores de inflamação, tubulite e C4d [Tabela 3]. Para os casos de RMA diagnosticados durante os dois primeiros anos após o transplante, entretanto, não observamos alterações significativas em nenhum dos parâmetros avaliados após o tratamento em relação aos achados histológicos no momento do diagnóstico de RMA [Figura 6].

A prevalência geral de duplicação de membrana basal glomerular foi de 16,7%, verificada em cinco pacientes (21,7%) com RMA diagnosticada após 24 meses de transplante, enquanto que 10,5% ($n=2$) dos pacientes com RMA mais precoce apresentaram tal achado. Essa alteração, entretanto, não foi significativamente

diferente entre os dois grupos avaliados. Não foram verificadas alterações significativas em depósitos de imunocomplexos, fusão de pedicelos podocitários ou duplicação de membrana basal glomerular nas biópsias pós-tratamento, quando comparadas àquelas realizadas no diagnóstico de RMA.

Tabela 3. Achados histopatológicos ao diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos (RMA) e após o tratamento.

	Geral			RMA ≤ 24 meses pós-Tx (precoce)			RMA > 24 meses pós-Tx (tardia)		
	RMA	Pós-tratamento	p	RMA	Pós-tratamento	p	RMA	Pós-tratamento	p
Número de biópsias, n (%)	42 (100,0)	30 (71,4)		19 (100,0)	10 (52,6)		23 (100,0)	20 (66,7)	
Tempo pós-Tx (meses)	39,6 ± 43,8 †	2,4 ± 3,0 ‡		6,7 ± 7,2	2,9 ± 3,4		66,9 ± 42,7	2,2 ± 2,9	
Esclerose glomerular (%)	11,0 ± 20,7	16,4 ± 21,9	0,29 ^x	2,8 ± 4,8	1,8 ± 5,5	0,60 ^x	17,8 ± 26,0	23,8 ± 23,5	0,44 ^x
Escore Banff									
i (0 a 3)	1,0 ± 0,8	0,5 ± 0,6	< 0,01 ^x	0,8 ± 0,7	0,7 ± 0,7	0,22 ^x	1,3 ± 0,9	0,6 ± 0,6	< 0,01 ^x
t (0 a 3)	1,0 ± 0,9	0,7 ± 0,9	0,15 ^x	0,7 ± 0,9	1,0 ± 1,3	0,45 ^x	1,3 ± 0,9	0,5 ± 0,6	< 0,01 ^x
v (0 a 3)	0,1 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,16 ^x	0,2 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,36 ^x	0,1 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,32 ^x
g (0 a 3)	1,1 ± 0,8	0,8 ± 1,0	0,25 ^x	0,8 ± 0,8	0,4 ± 0,5	0,16 ^x	1,3 ± 0,8	1,0 ± 1,2	0,38 ^x
ptc (0 a 3)	1,6 ± 1,0	1,3 ± 0,9	0,15 ^x	1,2 ± 1,2	1,1 ± 1,1	0,81 ^x	1,9 ± 0,7	1,3 ± 0,9	0,02 ^x
MVI g + ptc (0 a 6)	2,6 ± 1,7	2,0 ± 1,8	0,18 ^x	1,9 ± 1,8	1,4 ± 1,2	0,39 ^x	3,2 ± 1,4	2,4 ± 1,9	0,13 ^x
C4d (0 a 3)	2,2 ± 1,0	1,4 ± 1,2	< 0,01 ^x	1,8 ± 1,2	1,0 ± 1,0	0,12 ^x	2,5 ± 0,8	1,5 ± 1,3	< 0,01 ^x
ci (0 a 3)	1,0 ± 0,9	1,4 ± 1,0	0,17 ^x	0,6 ± 0,7	1,2 ± 0,9	0,07 ^x	1,4 ± 0,8	1,4 ± 1,0	0,94 ^x
ct (0 a 3)	1,2 ± 0,9	1,5 ± 0,9	0,10 ^x	0,8 ± 0,8	1,5 ± 0,7	0,03 ^x	1,5 ± 0,8	1,5 ± 0,9	0,93 ^x
Microscopia eletrônica, n (%)									
Depósitos de IC	7 (16,7)	2 (6,2)	0,76 ^ª	3 (15,8)	1 (10,0)	0,99 ^ª	4 (17,4)	2 (10,0)	0,97 ^ª
Fusão podocitária	10 (23,8)	3 (9,4)	0,62 ^ª	4 (21,0)	2 (20,0)	>0,99 ^ª	6 (26,1)	3 (15,0)	0,93 ^ª
Duplicação de MBG	7 (16,7)	3 (9,4)	0,93 ^ª	2 (10,5)	1 (10,0)	>0,99 ^ª	5 (21,7)	5 (25,0)	0,99 ^ª

Tx, transplante; RMA, rejeição mediada por anticorpos; i, inflamação; t, tubulite; v, arterite intimal; g, glomerulite; ptc, capilarite peritubular; MVI, inflamação microvascular; C4d, depósito do fragmento do componente C4 do complemento; ci, fibrose intersticial; ct, atrofia tubular; IC, imunocomplexo; MBG, membrana basal glomerular.

† Tempo pós-transplante.

‡ Tempo pós-tratamento de RMA.

^x Teste t não-pareado.

^ª Teste qui-quadrado.

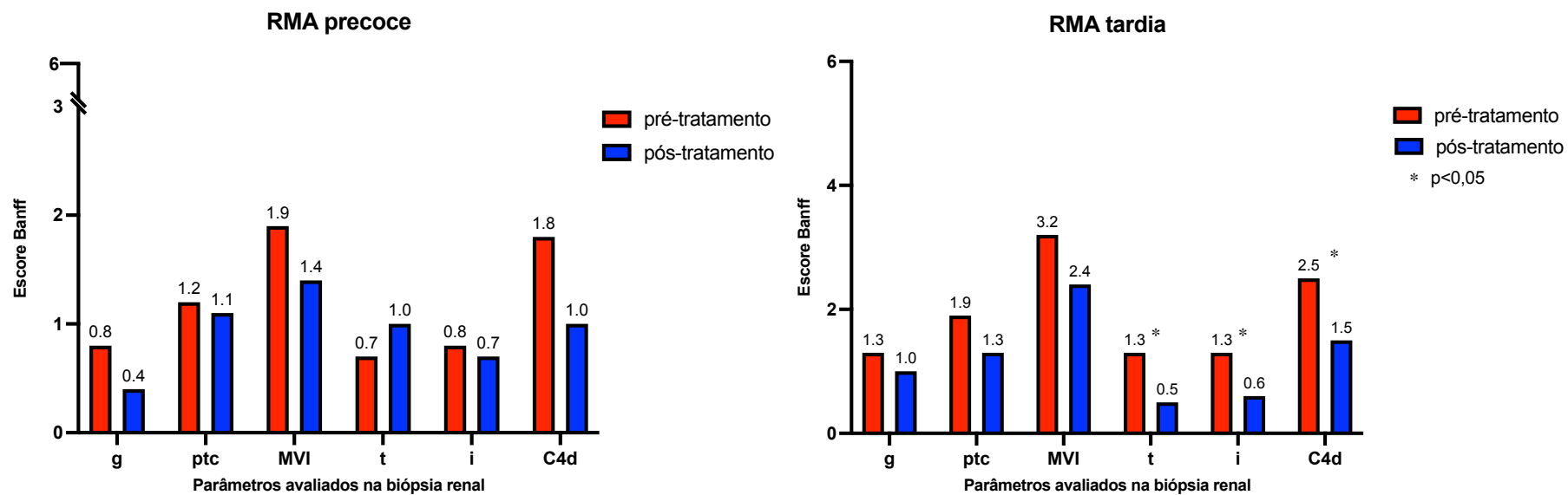


Figura 6. Evolução dos parâmetros de biópsia renal após o tratamento de rejeição mediada por anticorpos (RMA), de acordo com o tempo pós-transplante para ocorrência da rejeição. g, glomerulite; ptc, capilarite peritubular; MVI, inflamação microvascular; t, tubulite; i, inflamação; C4d, depósito do fragmento do componente C4 do complemento.

4.4: Nefropatia membranosa (NM) associada à RMA

Quatro pacientes da coorte apresentaram alterações histológicas compatíveis com nefropatia membranosa, com idades variando de 25 a 44 anos, sendo três do sexo feminino [Tabela 4]. Nenhum dos casos apresentava NM como etiologia da doença renal crônica. Todos os pacientes tinham antecedente de transfusão sanguínea, e nenhum deles apresentavam transplante de órgãos prévios. Todas as mulheres incluídas apresentavam gestação antes do transplante renal. Apenas um dos casos apresentava RCP superior a 30% antes do transplante renal, e nenhum dos pacientes apresentava DSA pré-formado. Todos os transplantes foram de doador falecido, com idade do doador variando de 17 a 35 anos, um deles com lesão renal aguda no momento do transplante renal. Apenas um dos casos apresentou tempo de isquemia fria superior a 24 horas, e metade dos pacientes evoluiu com atraso de função do enxerto.

O tempo pós-transplante para o diagnóstico de RMA variou de 10 a 92 meses. Ao diagnóstico, todos os pacientes recebiam imunossupressão com inibidor de calcineurina, droga antiproliferativa e corticoide, apresentavam TFG estimada superior a 30 mL/min, sendo que apenas um deles apresentava TFG maior do que 60 mL/min e proteinúria, ao diagnóstico, entre 2,3 g/g e 12,1 g/g. Dois pacientes apresentaram DSA-DQ, enquanto os demais apresentaram DSA de classe I. As biópsias de pacientes com maior tempo pós-transplante apresentaram inflamação microvascular mais intensa e maior grau de cronicidade tecidual.

Em todos os casos, foram verificadas alterações histológicas típicas de NM, com glomérulos apresentando espessamento de membrana basal glomerular à microscopia óptica; imunofluorescência com depósitos de IgG e C3 padrão granular em capilar glomerular, e depósitos subepiteliais com projeções em espículas na microscopia eletrônica [Figura 7]. Em dois casos, apesar da ausência de inflamação microvascular, houve detecção de depósitos de C4d nos capilares peritubulares, compatível com o diagnóstico de RMA. Os outros casos apresentavam glomerulite e capilarite peritubular à microscopia óptica, com presença de duplicação de membrana basal glomerular à microscopia eletrônica. Pesquisa de depósitos de IgG4, por imuno-histoquímica, foi realizada nos quatro casos, com resultado positivo leve em um e negativos nos demais. Imuno-histoquímica para PLA2R foi realizada em três casos,

com a detecção do antígeno em todos. Um paciente não apresentava material de biópsia adequado para a realização de imuno-histoquímica de PLA2R.

Um dos pacientes desta coorte não recebeu tratamento específico para RMA por apresentar quadro infeccioso em atividade. Todos os demais receberam tratamento com IVIG 2g/kg, e um dos paciente foi tratado com 5 sessões de PF. Entre as pacientes que apresentaram DSA de classe I, uma apresentou anticorpos indetectáveis seis meses após o tratamento, mas foi a óbito por causa infecciosa após 12 meses. Outra paciente que apresentava DSA-A permaneceu com anticorpos detectáveis com intensidade superior a 5.000 MFI, com falência de enxerto em seis meses do tratamento. Os demais pacientes permaneceram durante todo o seguimento com enxerto funcionante, em uso de medicações antiproteínúricas. Os dois pacientes que apresentavam DSA-DQ permaneceram com anticorpos detectáveis ao final do seguimento, com valores superiores a 20.000 MFI.

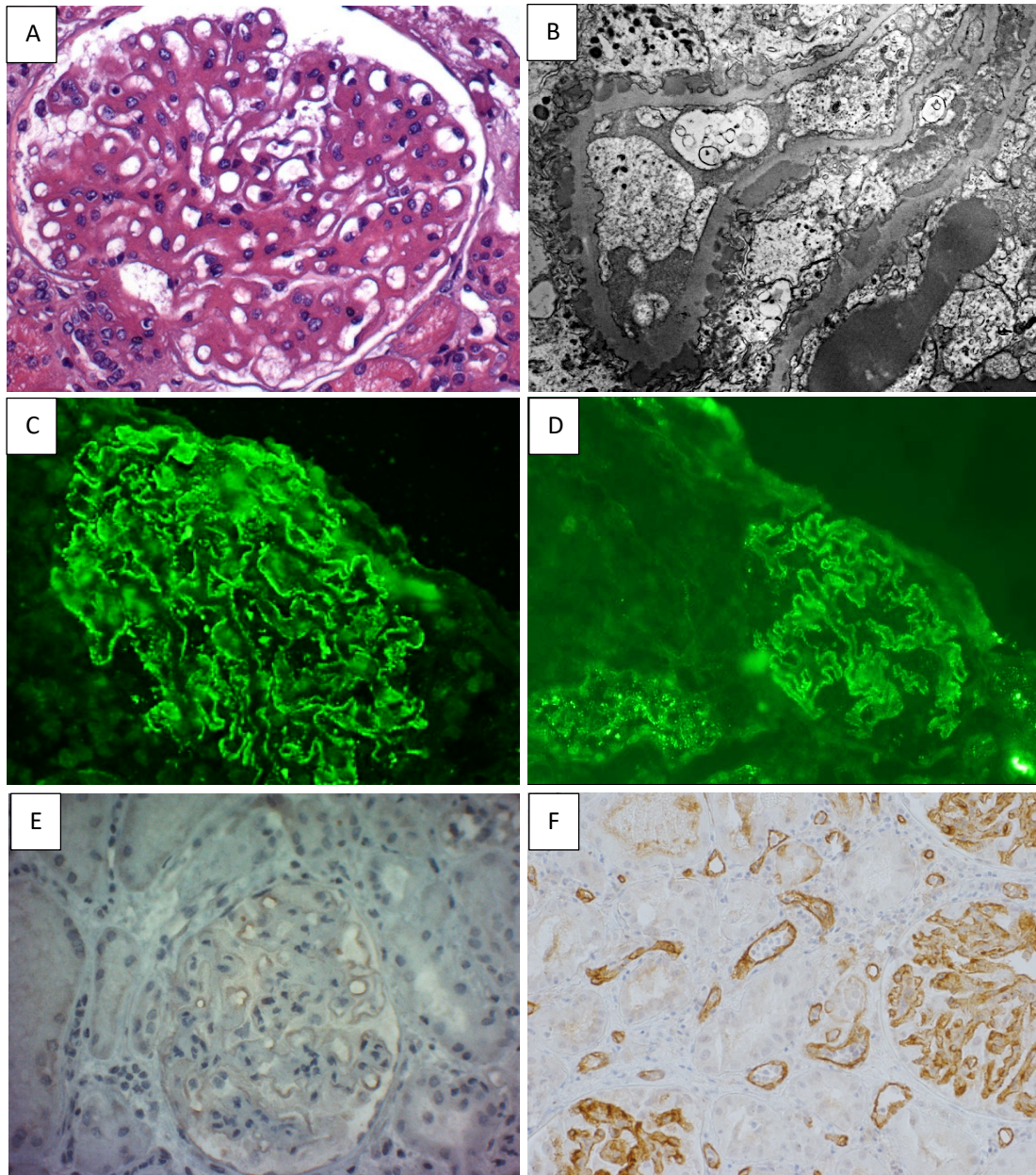


Figura 7. Fotomicrografia das biópsias renais dos pacientes com nefropatia membranosa associada a rejeição mediada por anticorpos. (A) Espessamento da membrana basal glomerular (microscopia óptica: hematoxilina e eosina, x400), (B) Espessamento difuso da membrana basal glomerular, depósitos elétron-densos subepiteliais e formação de espículas (microscopia eletrônica), (C) Depósitos de IgG ao longo da parede do capilar glomerular (imunofluorescência IgG, x400), (D) Depósitos de C3 ao longo da parede do capilar glomerular (imunofluorescência IgG, x400), (E) Marcação para receptor de fosfolipase A2 do tipo M (PLA2R) (imuno-histoquímica, x400), (F) Marcação para C4d (imuno-histoquímica, 400x).

Tabela 4. Características clínicas e histológicas dos casos de nefropatia membranosa (NM) associados à rejeição mediada por anticorpos (RMA).

Caso	1	2	3	4
<i>Receptores</i>				
Idade (anos)	25	44	44	28
Sexo	masculino	feminino	feminino	feminino
Etiologia da DRC	indeterminada	GESF	SHU	GESF
Transfusão pré-transplante	não	sim	sim	sim
Transplante prévio	não	não	não	não
Gestação pré-transplante	-	sim	sim	sim
Incompatibilidades HLA ABDR	3	4	6	1
RCP classe I pré-transplante (%)	0	0	27	78
RCP classe II pré-transplante (%)	0	0	0	0
DSA pré-formado	não	não	não	não
<i>Doadores</i>				
Tipo de doador	falecido	falecido	falecido	falecido
Idade (anos)	19	35	27	17
Sexo	masculino	masculino	masculino	masculino
Doadores de critério expandido	não	não	sim [†]	não
Creatinina sérica (mg/dL)	0,78	0,70	4,6	1,1
KDPI (%)	2	20	89	5
<i>Transplante</i>				
Imunossupressão inicial	IL2RAb/TAC/MYF	ATG/CYA/MYF	ATG/TAC/MYF	ATG/CYA/MYF
Tempo de isquemia fria (horas)	14,3	31,0	17,4	22,7
DGF	não	sim	sim	não
<i>Rejeição mediada por anticorpos</i>				
Tempo pós-transplante (meses)	24	92	10	36
Classe de DSA	II	II	I	I
DSA MFI _{SOMA}	44.115	23.794	945	13.356
DSA imunodominante MFI _{MAX}	22.745	23.794	945	13.356
Imunossupressão atual	TAC/MYF	CYA/MYF	CYA/MYF	CYA/MYF
Creatinina sérica, mg/dL	1,2	1,9	1,9	1,8
TFG (CKD-EPI), mL/min	83,5	30,9	30,8	37,6
P/C, g/g	6,19	11,8	2,3	12,1
<i>Morfologia do enxerto</i>				
Microscopia óptica - Banff				
i (0 a 3)	0	1	0	1
t (0 a 3)	1	1	0	1
v (0 a 3)	0	0	0	0
g (0 a 3)	0	2	0	2
ptc (0 a 3)	0	2	0	2
MVI g + ptc (0 a 6)	0	4	0	4
C4d (0 a 3)	3	2	1	3
ci (0 a 3)	0	2	1	0
ct (0 a 3)	0	2	2	1
Microscopia eletrônica				
Depósitos de IC	subepitelial	subepitelial	subepitelial	subepitelial
Fusão podocitária	não	difuso	não	difuso
Duplicação de MBG	não	sim	não	sim
Depósito de IgG4	não	leve	não	não
Positividade de imunofluorescência	IgG / C3	C3 / λ	IgG / C3	IgG / IgM / IgA
	κ / λ / C1q		κ / λ	C3 / κ / λ
Deteção de PLA2R	não disponível	sim	sim	sim

RMA, rejeição mediada por anticorpos; ATG, globulina anti-timócitos; DRC, doença renal crônica; CYA, ciclosporina; DGF, atraso de função do enxerto, do inglês *delayed graft function*; DSA, anticorpo anti-HLA doador-específico, do inglês *donor specific anti-HLA antibody*; TFG, taxa de filtração glomerular; GESF, glomeruloesclerose segmentar e focal; HLA, antígeno leucocitário humano, do inglês *human leukocyte antigen*; SHU, síndrome hemolítico-urêmica; IL-2R, IL2RAb, anticorpo anti-receptor de interleucina 2; KDPI, índice de perfil de doador renal, do inglês *kidney donor profile index*; MYF, micofenolato sódico; RCP, reatividade contra painel; TAC, tacrolimus; P/C, relação proteína urinária e creatinina urinária; i, inflamação; t, tubulite; v, arterite intimal; g, glomerulite; ptc, capilarite peritubular; MVI, inflamação microvascular; ci, fibrose intersticial; ct, atrofia tubular; IC, imunocomplexos; MBG, membrana basal glomerular, PLA2R, receptor de fosfolipase A2.

[†] Doador com lesão renal aguda.

A busca nas bases de dados bibliográficos resultou em 23 estudos. Estudos sem casos de NM associados a RMA foram excluídos. Um estudo foi excluído devido à ausência de confirmação da presença de DSA. Apenas 3 estudos preencheram os critérios e foram incluídos. As informações obtidas de cada estudo, tais como ano de publicação, desenho do estudo, número de casos de NM associados a RMA, tratamento utilizado e resposta ao tratamento, estão listadas na Tabela 5. Os tratamentos específicos, bem como a terapia imunossupressora de manutenção utilizada após o diagnóstico, foram considerados como abordagem terapêutica de cada caso. Foram considerados critérios de efetividade do tratamento a redução mantida da proteinúria em mais de 50% do valor apresentado ao diagnóstico de RMA, a melhora de função renal em mais de 50% para os casos com disfunção renal ao diagnóstico ou a redução de intensidade de anticorpos detectáveis ao longo do seguimento.

Tabela 5. Casos relatados de nefropatia membranosa (NM) de novo pós-transplante associada a rejeição mediada por anticorpos (RMA).

	Casos de NM	Infecção por VHC	Classe de DSA	Tratamento e efetividade
Sousa MV e cols.	4	Não	I e II	ICN, MYF, corticoide, IVIG, e IECA - efetivo ICN, MYF, corticoide, IVIG, e IECA - efetivo ICN, MYF, corticoide, e IECA [†] ICN, MYF, corticoide, IVIG, PF e IECA - não efetivo
Patel K e cols. 2013 (53)	1	Não	I e II	IVIG e rituximab - efetivo
Honda e cols. 2011 (31)	5	n/d	I e II	PF, ICN, MP, MMF e BRA – efetivo ICN e MP – não efetivo ICN, MMF e MP – não efetivo ICN, MP e DSG – não efetivo ICN, MP, DSG, PF, Pulso – não efetivo
El Kossi e cols. 2008 (54)	1	Não	II	Mudança de azatioprina para micofenolato - efetivo

NM, nefropatia membranosa; VHC, vírus da hepatite C; DSA, anticorpo anti-HLA doador-específico, do inglês *donor specific anti-HLA antibody*; IVIG, imunoglobulina endovenosa; IECA, inibidor da enzima conversora de angiotensina; PF, plasmaférese; ICN, inibidor de calcineurina; MYF, micofenolato sódico; MP, metilprednisolona; MMF, micofenolato mofetil; BRA, bloqueador do receptor de angiotensina; DSG, deoxysperguarin; Pulso, pulsoterapia endovenosa com corticóide; n/d, não disponível.

[†] Óbito com enxerto funcionante de causa infecciosa.

4.5: Fatores associados à falência do enxerto após o tratamento de RMA

Do grupo de quarenta e dois pacientes submetidos a tratamento de RMA, sete (16,7%) evoluíram com falência do enxerto no primeiro ano de seguimento pós-tratamento de RMA. As características gerais desse grupo foram semelhantes às dos pacientes que permaneceram com o enxerto funcionando no primeiro ano após o tratamento de RMA [Tabela 6]. Três pacientes (42,8%) que evoluíram com falência de enxerto apresentaram RMA nos primeiros dois anos após o transplante (precoce). A mediana de ocorrência de falência do enxerto foi de 4,9 (1,4 - 10,0) meses após o tratamento, sendo quatro (57,1%) desses nos primeiros 6 meses.

Não houve diferença significativa na terapia de indução de imunossupressão entre os dois grupos. Em ambos, a maioria dos pacientes fazia uso de ICN ao diagnóstico de RMA. Entre os pacientes que evoluíram para perda de enxerto, 85,7% recebeu tratamento com IVIG e todos foram submetidos a PF. Não houve diferença significativa no número de pacientes tratados com globulina anti-timócitos entre os grupos. O número de pacientes tratados com pulsoterapia de corticoide foi significativamente maior no grupo que evoluiu com perda de enxerto (n=6, 85,7%, $p=0,01$). Todos os pacientes que apresentaram falência do enxerto nos grupos de RMA precoce e tardia foram tratados com PF e IVIG [Tabela 7].

Tabela 6. Características gerais dos casos de enxerto funcionante e dos casos de falência de enxerto durante o primeiro ano após o tratamento de RMA.

	Enxerto funcionante	Falência de enxerto	p
<i>Receptores de transplante renal</i>			
Total, n (%)	35 (83,3)	7 (16,7)	
Idade (anos)	36,1 ± 12,4	37,8 ± 14,3	0,41 ^x
Masculino, n (%)	17 (48,6)	5 (71,4)	0,74 ^a
Etiologia da DRC (%)			
Glomerulonefrite crônica	7 (20,0)	1 (14,3)	0,09 ^a
Indeterminada	12 (34,3)	0 (0,0)	
Hipertensão arterial sistêmica	3 (8,6)	1 (14,3)	0,41 ^a
Diabetes mellitus	0 (0,0)	1 (14,3)	
Outras	13 (37,1)	4 (57,1)	0,23 ^a
Transfusão pré-transplante, n (%)	17 (48,6)	5 (71,4)	0,41 ^a
Transplante prévio, n (%)	5 (14,3)	0 (0,0)	
Mulheres - gestação pré-transplante, n (%)	8 (44,4)	1 (50,0)	1,00 ^a
Incompatibilidades HLA ABDR	3,8 ± 1,1	4,2 ± 1,2	0,37 ^x
RCP classe I pré-transplante (%)	14,0 ± 24,0	17 ± 31,8	0,77 ^x
RCP classe II pré-transplante (%)	13,7 ± 27,4	0,0 ± 0,0	0,19 ^x
DSA pré-formado, n (%)	8 (22,8)	1 (14,3)	1,00 ^a
Não-DSA pré-formados, n (%)	14 (40,0)	2 (28,6)	0,69 ^a
<i>Doadores</i>			
Doadores falecidos, n (%)	31 (88,6)	6 (85,7)	1,00 ^a
Idade (anos)	33,6 ± 15,1	40,1 ± 13,8	0,27 ^x
Masculino, n (%)	16 (45,7)	5 (71,4)	0,41 ^a
Doadores de critério expandido (%)	7 (20,0)	4 (57,1)	0,06 ^a
Creatinina sérica (mg/dl)	1,3 ± 1,1	1,2 ± 0,8	0,81 ^x
KDPI (%)	42,0 ± 26,6	47,0 ± 39,4	0,66 ^x
<i>Transplante</i>			
Terapia imunossupressora inicial			
Globulina anti-timócito (%)	13 (37,1)	3 (42,8)	1,00 ^a
Dose de globulina anti-timócito (mg/kg)	5,8 ± 1,2	5,7 ± 1,5	0,86 ^x
Anticorpo anti-receptor de IL-2 (%)	18 (51,4)	4 (57,1)	1,00 ^a
Tempo de isquemia fria (horas)	21,6 ± 6,7	19,0 ± 5,0	0,34 ^x
DGF, n (%)	19 (54,3)	5 (71,4)	0,68 ^a
<i>Rejeição mediada por anticorpos</i>			
Tempo pós-transplante (meses)			1,00 ^a
RMA ≤ 24 meses, n (%)	16 (45,7)	3 (42,9)	
RMA > 24 meses, n (%)	19 (54,3)	4 (57,1)	
ICN ao diagnóstico de RMA, n (%)	26 (74,3)	6 (85,7)	1,00 ^a
IVIG, n (%)	31 (88,6)	6 (85,7)	1,00 ^a
PF, n (%)	18 (51,4)	7 (100,0)	
Globulina anti-timócito, n (%)	9 (25,7)	4 (57,1)	0,18 ^a
Pulsoterapia com corticóide, n (%)	11 (31,4)	6 (85,7)	0,01 ^a

n, número; DRC, doença renal crônica; HLA, antígeno leucocitário humano, do inglês *human leukocyte antigen*; RCP, reatividade contra painel; DSA, anticorpos anti-HLA doador-específicos, do inglês *donor specific anti-HLA antibody*; KDPI, índice de perfil de doadores renais, do inglês *kidney donor profile index*; DGF, atraso de função do enxerto, do inglês *delayed graft function*; RMA, rejeição mediada por anticorpos; ICN, inibidor de calcineurina; IVIG, imunoglobulina endovenosa, do inglês *intravenous immunoglobulin*; PF, plasmáfereze.

^x Teste t não-pareado.

^a Teste qui-quadrado.

Tabela 7. Tratamento de rejeição mediada por anticorpos (RMA), de acordo com tempo de ocorrência de rejeição e funcionamento do enxerto ao final do seguimento.

	RMA precoce (n = 19)		RMA tardia (n = 23)	
	Enxerto funcionante	Falência de enxerto	Enxerto funcionante	Falência de enxerto
Total, n (%)	16 (84,2)	3 (15,8)	19 (82,6)	4 (17,4)
PF isolada, n (%)	0 (0,0)	1 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
IVIG isolada, n (%)	5 (31,2)	0 (0,0)	8 (42,1)	0 (0,0)
PF + IVIG, n (%)	9 (56,3)	3 (100,0)	10 (52,6)	4 (100,0)
Sem PF e sem IVIG, n (%)	2 (12,5)	0 (0,0)	1 (5,3)	0 (0,0)
Tratamento adicional				
Timoglobulina	3 (18,7)	0 (0,0)	5 (26,3)	0 (0,0)
Metilprednisolona	5 (31,3)	1 (33,3)	4 (21,0)	0 (0,0)
Timoglobulina + metilprednisolona	1 (6,3)	2 (66,7)	1 (5,3)	2 (50,0)
Sem tratamento adicional	7 (43,7)	0 (0,0)	9 (47,4)	2 (50,0)

RMA, rejeição mediada por anticorpos; n, número; PF, plasmaférese; IVIG, imunoglobulina endovenosa.

O grupo de pacientes que evoluiu para falência do enxerto no primeiro ano após o tratamento de rejeição apresentava, ao diagnóstico, taxa de filtração glomerular estimada significativamente menor em comparação aos pacientes que permaneceram com o enxerto funcionando no mesmo período ($p=0,01$) [Tabela 8]. Todos os pacientes que evoluíram para falência do enxerto apresentavam proteinúria ao diagnóstico de RMA, embora não tenha ocorrido diferença significativa no valor de proteinúria ao diagnóstico entre os dois grupos.

Os valores de RCP de classes I e II ao diagnóstico de RMA era semelhante entre os dois grupos [Tabela 8]. Entre os sete pacientes que evoluíram com falência de enxerto após o tratamento, dois apresentaram apenas DSA de classe I ao diagnóstico de RMA (DSA-A 4.024 - 13.356 MFI), dois apresentaram apenas DSA de classe II (DSA-DQ 3.400 - 22.327 MFI), dois com ambos DSA-A (3.084 - 5.000 MFI) e DSA-DQ (7.500 - 21.246 MFI) e um com ambos DSA-B (1.582 MFI) e DSA-DQ (12.575 MFI). O valor da soma de MFI dos DSA-DQ foi significativamente maior no grupo que permaneceu com o enxerto funcionando ao final do seguimento ($p=0,01$), sem diferença significativa para os DSAs de classe I e DSA-DQ.

Tabela 8. Imunologia e função do enxerto ao diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos (RMA) dos casos de enxerto funcionante e dos casos de falência de enxerto durante o primeiro ano após o tratamento de RMA.

	Enxerto funcionante	Falência de enxerto	p
Número de pacientes (%)	35 (83,3)	7 (16,7)	
RCP classe I na RMA(%)	42,8 ± 31,9	37,2 ± 40,6	0,67 ^x
RCP classe II na RMA (%)	55,1 ± 34,8	52,7 ± 36,4	0,86 ^x
DSA, n (%)			
Apenas DSA classe I	10 (28,6)	2 (28,6)	1,00 ^a
Apenas DSA classe II	15 (42,8)	2 (28,6)	1,00 ^a
DSA classes I e II	10 (28,6)	3 (42,8)	1,00 ^a
DSA _{SOMA}			
DSA classe I _{SOMA}	4.366,7 ± 5.473,0	3.243,3 ± 4.127,7	0,59 ^x
DSA A _{SOMA}	7.453,9 ± 5.216,9	6.355,0 ± 4.725,2	0,58 ^x
DSA B _{SOMA}	5.712,6 ± 2.558,1	1.582	
DSA classe II _{SOMA}	17.920,0 ± 16.467,8	9.139,1 ± 8.819,0	0,15 ^x
DSA DR _{SOMA}	2.778,3 ± 947,2	-	
DSA DQ _{SOMA}	23.998,0 ± 12.284,7	12.185,5 ± 8.021,1	0,01 ^x
DSA imunodominante _{MAX}	15.952,0 (945,0 – 24.883,0)	9.320,0 (4.000,0 – 21.246,0)	0,16 ^o
Não-DSA classe I §	6,7 ± 6,3	10,6 ± 15,3	0,25 ^x
Não-DSA classe II §	2,4 ± 2,2	4,1 ± 3,0	0,07
Creatinina sérica, mg/dL	2,7 ± 1,6	4,6 ± 1,9	<0,01 ^x
TFG estimada (CKD-EPI), mL/min	34,1 ± 17,9	16,6 ± 8,7	0,01 ^x
P/C, g/g	1,9 ± 2,7	3,0 ± 4,4	0,36 ^x
P/C ≤ 0.15 g/g (%)	3 (8,6)	0 (0,0)	
Sedimento urinário, n (%)			
Hemácias	1 (2,8)	1 (14,3)	0,31 ^a
Leucócitos	8 (22,8)	5 (71,4)	0,02 ^a
Proteínas	16 (45,7)	7 (100,0)	
Nível sanguíneo do tacrolimo (ng/mL)	5,5 ± 3,2	3,6 ± 0,9	0,10 ^x

RCP, reatividade contra painel; DSA, anticorpo anti-HLA doador-específico, do inglês *donor specific antibody*; TFG, taxa de filtração glomerular; CKD-EPI, equação de estimativa de filtração glomerular, do inglês *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*; P/C, relação proteína urinária e creatinina urinária.

^x Teste t não-pareado.

^a Teste qui-quadrado.

^o Teste Mann Whitney.

§ Número de Não-DSA com mediana de intensidade de fluorescência maior do que 1.500.

Na avaliação morfológica, não houve diferença significativa na ocorrência de esclerose glomerular entre os pacientes que evoluíram para falência de enxerto e os pacientes que permaneceram com rim funcionante [Tabela 9]. O grupo que apresentou falência de enxerto, entretanto, apresentou escores de tubulite ($1,8 \pm 1,0$ versus $0,8 \pm 0,9$, perda de enxerto versus enxerto funcionante, $p < 0,01$) e arterite intimal ($0,5 \pm 0,8$ versus $0,0 \pm 0,2$, perda de enxerto versus enxerto funcionante, $p < 0,01$) significativamente maiores ao diagnóstico de RMA. Não houve diferença entre os grupos nos escores de inflamação microvascular ou C4d. À microscopia eletrônica, nenhum dos pacientes que evoluiu para falência do enxerto no primeiro ano apresentou depósitos de imunocomplexos ou duplicação de membrana basal

glomerular no diagnóstico de RMA. Entretanto, fusão podocitária foi verificada em 14,3% das biópsias desse grupo.

Houve apenas um caso de óbito com enxerto funcionante durante o primeiro ano pós-tratamento, de causa cardiovascular.

Tabela 9. Achados histopatológicos ao diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos (RMA) dos casos de enxerto funcionante e dos casos de falência de enxerto durante o primeiro ano após o tratamento de RMA.

	Enxerto funcionante	Falência de enxerto	p
Tempo pós-transplante (meses)	40,7 ± 46,8	35,2 ± 31,3	0,75 ^x
Esclerose glomerular (%)	9,8 ± 16,2	16,1 ± 34,6	0,44 ^x
Escore Banff			
i (0 a 3)	1,0 ± 0,9	1,3 ± 0,5	0,37 ^x
t (0 a 3)	0,8 ± 0,9	1,8 ± 1,0	< 0,01 ^x
v (0 a 3)	0,0 ± 0,2	0,5 ± 0,8	< 0,01 ^x
g (0 a 3)	1,1 ± 0,9	1,3 ± 0,7	0,56 ^x
ptc (0 a 3)	1,5 ± 1,1	2,1 ± 0,6	0,14 ^x
MVI g + ptc (0 a 6)	2,4 ± 1,8	3,4 ± 1,1	0,14 ^x
C4d (0 a 3)	2,4 ± 0,9	1,6 ± 1,5	0,05 ^x
ci (0 a 3)	1,0 ± 0,9	1,4 ± 0,9	0,26 ^x
ct (0 a 3)	1,1 ± 0,9	1,4 ± 0,9	0,40 ^x
Microscopia eletrônica, n (%)			
Depósitos de IC	7 (20,0)	0 (0,0)	
Fusão podocitária	8 (22,8)	1 (14,3)	0,66 ^a
Duplicação de MBG	7 (20,0)	0 (0,0)	

RMA, rejeição mediada por anticorpos; i, inflamação; t, tubulite; v, arterite intimal; g, glomerulite; ptc, capilarite peritubular; MVI, inflamação microvascular; ci, fibrose intersticial; ct, atrofia tubular; IC, imunocomplexo; MBG, membrana basal glomerular.

^x Teste t não-pareado.

^a Teste qui-quadrado.

4.6: Divulgação dos resultados em periódicos

O artigo com os resultados da coorte retrospectiva intitulado *Treatment of Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation: Immunological Effects, Clinical Response, and Histological Findings*, foram aceitos para publicação em 13 de julho de 2020 no periódico *Annals of Transplantation*, eISSN 2329-0358, fator de impacto (2018) 1,369, DOI 10.12659/AOT.925488.

O relato de caso de RMA após infecção por febre amarela intitulado *Yellow Fever Disease in a Renal Transplant Recipient: Case Report and Literature Review* foi aceito para publicação em 21 de julho de 2019, no periódico *Transplant Infectious Disease*, eISSN 1399-3062, fator de impacto (2019) 2,071, DOI 10.1111/tid.13151.

A análise secundária dos casos de NM associada à RMA encontra-se em fase de submissão.

5. DISCUSSÃO

A RMA é uma condição de potencial impacto negativo na função e sobrevida do enxerto renal. O reconhecimento da importância dos DSAs no desencadeamento de lesões endoteliais no enxerto renal e da detecção desses anticorpos por métodos em fase sólida sensíveis, aliados à padronização das possíveis lesões histológicas provocadas pela ação desses anticorpos, possibilitou a identificação de um amplo espectro de manifestações clínicas e histológicas da RMA. No entanto, dados sobre a alternativa terapêutica mais efetiva dessa condição são escassos. O desenvolvimento de um protocolo de tratamento eficaz para RMA é necessário para aumento da sobrevida do enxerto e do receptor de transplante renal.

As formas clássicas de estímulo para produção de anticorpos anti-HLA ocorrem por exposição aos antígenos HLA estranhos ao organismo, por meio de hemotransfusão, transplante prévio ou gestação. Transfusão e gestação prévios ao transplante foram eventos frequentes na população estudada. Entretanto, a maioria dos pacientes que desenvolveu RMA após o transplante, neste estudo, apresentava RCP média pré-transplante inferior a 30% para HLAs de classes I e II, e menos de um terço deste grupo apresentava DSA pré-transplante detectável. Nesta série, a maioria dos pacientes incluídos (52,4%) recebeu terapia de indução de imunossupressão com anticorpo anti-receptores de interleucina 2, enquanto 38,1% receberam globulina anti-timócitos. Estudo de Brennan e cols. (55) mostrou menor incidência de rejeição aguda durante o primeiro ano após o transplante renal em receptores de alto risco imunológico que receberam globulina anti-timócitos quando comparados aos tratados com basiliximab. Uma revisão Cochrane (56) de oito estudos, incluindo 1.106 receptores de transplante renal de doadores falecidos, revelou maior incidência de rejeição aguda em um ano após o transplante no grupo que recebeu indução de imunossupressão com anti-receptores de interleucina-2 em comparação ao grupo tratado com globulina anti-timócitos (RR 1,3%, IC 95% 1,01-1,67). Dessa forma, uma das possíveis explicações para o desenvolvimento de DSA nas fases iniciais do transplante, no presente estudo, é que a maioria dos pacientes incluídos recebeu

terapia de indução de imunossupressão menos potente, favorecendo o surgimento dos anticorpos e das lesões histológicas compatíveis com rejeição.

Em um dos casos incluídos neste estudo, detectou-se DSA de novo após recuperação clínica de um quadro de febre amarela na forma selvagem, posteriormente à vacinação inadvertida contra essa doença. O uso de vacina contra febre amarela em pacientes em tratamento imunossupressor não é recomendado, uma vez que a imunogenicidade nesses pacientes não é bem conhecida e há risco potencial de desenvolvimento da doença pela cepa viral da vacina (57). A cepa vacinal provoca uma modulação de citocinas do sistema imune inato, mas a importância dos linfócitos T nesse processo permanece desconhecida (58). A vacinação levaria à geração de respostas de linfócitos B e T aos antígenos vacinais, com possível reação cruzada com aloantígenos, podendo desencadear a produção de anticorpos anti-HLA em receptores de órgãos sólidos, levando à rejeição do enxerto (59). Os linfócitos Th1 desenvolvem respostas de linfócitos T CD8+, enquanto as citocinas Th2 desencadeiam respostas de linfócitos B e anticorpos. Os linfócitos T CD8+ atingem o pico entre 14 e 30 dias após a vacinação, gerando células de memória aptas a responder rapidamente à reexposição a antígeno do vírus da febre amarela *in vitro*, embora essa resposta em humanos não seja completamente conhecida (58). Outros possíveis efeitos da vacina em hospedeiros imunossuprimidos seriam a estimulação de quiescência, respostas de memória alorreativa, ou ainda efeitos imunoestimuladores inespecíficos desencadeados pelos adjuvantes da vacina (59). Há poucos estudos controlados de qualidade conclusivos sobre o risco de formação de anticorpos anti-HLA após a vacinação (59). Mulley e cols (59), em um estudo por meta-análise que incluiu aqueles que avaliaram receptores de transplante que receberam vacinação, não verificaram maior risco de desenvolvimento de anticorpos anti-HLA ou de RMA após a vacinação. Diante disso, é possível que, no caso incluído nesse estudo, o estímulo para a produção de anticorpos anti-HLA possa ter sido a retirada dos imunossupressores durante a fase aguda da doença.

Os resultados da coorte revelaram que a rejeição foi mais intensa nos casos de RMA diagnosticados após dois anos de transplante. Isso poderia ser resultado do efeito protetor da terapia de indução de imunossupressão sobre a inflamação do enxerto nos casos de RMA mais precoces, embora não possa excluída a má adesão ao tratamento imunossupressor como provável causa do desenvolvimento dos anticorpos anti-HLA e consequente RMA, sobretudo nos casos diagnosticados após

dois anos de transplante. O grupo com RMA tardia apresentou, ao diagnóstico, escore de inflamação microvascular (MVI) significativamente superior ao grupo que teve diagnóstico mais precoce. Os casos de RMA tardia também apresentavam escores de fibrose intersticial (ci) e atrofia tubular (ct) significativamente superiores comparados aos pacientes com diagnóstico de RMA mais precoces. Os casos de RMA mais tardios, nessa série, também apresentaram escore de tubulite (t) significativamente maior do que os casos de RMA mais precoce, sugerindo um componente de rejeição mediada por células associado a estes casos de RMA de diagnóstico mais tardio. A melhor resposta ao tratamento verificada nesse grupo pode ser consequência da redução da inflamação e do componente celular da rejeição.

O principal alvo dos anticorpos é o endotélio, que é capaz de expressar moléculas de HLA, permitindo sua detecção pelo sistema imunológico do receptor (60). A expressão de antígenos HLA de classe I pode ser prontamente detectada no endotélio da microvasculatura renal, enquanto o HLA de classe II tem sua expressão aumentada em estados pró-inflamatórios, como a rejeição, principalmente os isotipos DR, seguidos de DP e DQ (60). A lesão glomerular, embora possa estar relacionada à presença de células polimorfonucleares nos casos de rejeição hiperaguda ou RMA precoces, está caracteristicamente associada às células mononucleares (61). A inflamação causa suprarregulação de moléculas HLA e de adesão no endotélio, resultando em ativação e proliferação de linfócitos T CD4+, alteração da polarização de linfócitos T e estímulo à ação de linfócitos T CD8+ ativados contra as células do enxerto (60). As células endoteliais ativadas têm ainda maior capacidade de recrutamento de monócitos, além de estimular sua diferenciação para um estado pró-inflamatório (60).

A lesão crônica dos anticorpos ao endotélio glomerular, sobretudo DSA de classe II, podem resultar em glomerulopatia do transplante, caracterizada pela presença de duplo contorno em mais de 10% das alças capilares glomerulares avaliadas à microscopia óptica (61). Em nossa série, verificamos evidências histológicas de rejeição mediada por células associada aos casos de RMA diagnosticados após 24 meses de transplante, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de glomerulopatia do transplante, uma vez que esse tipo de rejeição também tem sido apontada como potencial causa dessa glomerulopatia (61). No nosso estudo, a maioria dos casos não apresentou duplicação da membrana basal

glomerular na avaliação por microscopia eletrônica, o que poderia estar relacionado ao curto período de seguimento para o desenvolvimento e detecção dessas lesões.

Além da agressão endotelial glomerular verificada nos casos de RMA, as células podocitárias também podem ser diretamente atingidas pela agressão imunológica, sobretudo nas formas crônicas de rejeição (62). A agressão, direta ou indireta, ao podócito poderia explicar o surgimento de algumas glomerulopatias após o transplante renal. Os casos de NM de novo pós-transplante tem sido interpretados como uma forma peculiar de resposta imunológica dirigida contra a exposição de antígenos previamente ocultos, uma vez que em muitos desses casos não são identificados anticorpos específicos contra o PLA2R (32,63). Nesse caso, a agressão imunológica causaria lesão ao podócito, desencadeando a exposição de proteínas que poderiam ser reconhecidas como antígenos pelo sistema imune, levando à produção de anticorpos e formação de complexos imunes depositados em áreas subepiteliais (63). Em nossa série, entretanto, a maioria dos casos apresentou expressão do antígeno PLA2R na avaliação imuno-histoquímica, diferente do que foi relatado em outros estudos (54,64,65). Uma possível explicação para esse resultado é que, além da reatividade dos anticorpos contra os antígenos HLA de classe II expressos nos podócitos, os DSAs poderiam apresentar reação cruzada com antígenos não-HLA na superfície dos podócitos, tais como o PLA2R. Outra possibilidade é de que a RMA poderia estimular a produção de anticorpos anti-PLA2R, desencadeando lesão tecidual mesmo na ausência de DSA de classe II.

O tratamento considerado padrão para RMA consiste em PF associada à IVIG e à corticoterapia (38,39). Este tratamento tem sido indicado para casos de lesão mediada por anticorpos ativa, embora a evidência que suporte essa recomendação não seja forte, com poucos efeitos em longo prazo (21). Os dados sobre as mudanças imunofenotípicas causadas pelos tratamentos atualmente disponíveis são escassos. Plasmaférese e imunoadsorção removem diretamente as imunoglobulinas do soro, porém ocorre subsequente equilíbrio entre o sangue e o interstício em cerca de 48h após o procedimento, quando então outra sessão pode ser efetiva (66). Aproximadamente 75% de IgM está no espaço intravascular, de forma que um ou dois procedimentos são suficientes para reduzir rapidamente seus níveis, enquanto que apenas 45% da IgG está nesse espaço, e a cada 48 horas o nível de IgG plasmático retorna a cerca de 60% dos valores verificados antes da plasmaférese (67,68). Esse fato pode justificar a ausência de resposta ao tratamento em alguns estudos. Os

protocolos de tratamento de RMA com PF variam de cinco a seis sessões diárias ou em dias alternados (69). Em nossa coorte, as sessões de PF foram realizadas com intervalo de 48h a fim de aumentar a eficácia do método.

O potencial efeito benéfico da IVIG no tratamento de RMA está associado à sua ação imunomodulatória em linfócitos B e componentes do complemento, com capacidade de neutralizar DSAs e inibir sua ligação às células-alvo (16,23). Alguns estudos retrospectivos têm relatado o uso de IVIG como tratamento de RMA em receptores de transplante renal, com doses diárias variando de 100-500 mg/kg até obtenção de resposta, com dose máxima de 2g/kg, administrado em dose única ou fracionada (70–72). Nesta série, inicialmente realizamos a dose total de IVIG pós-PF. A partir de 2017, passamos a realizar infusão de IVIG na dose de 100 mg/kg intercalada às sessões de PF, com o restante da dose administrada após o término da PF até atingir a dose de 2g/kg. Não houve diferença na resposta entre os grupos com IVIG em doses intercaladas e não-intercaladas, mas o pequeno número de pacientes avaliados não permitiu análise efetiva. São descritos alguns possíveis efeitos colaterais ao tratamento com IVIG, como trombose, anemia hemolítica, piora de função renal e meningite séptica (70). No presente estudo, dois pacientes apresentaram cefaleia autolimitada com a infusão da medicação, sem eventos adversos graves durante o seguimento.

Nesta série, a sobrevida do enxerto foi superior a 80% durante o primeiro ano pós-tratamento de RMA, semelhante à observada em outro estudo de Ribeiro e cols. (73). Não houve episódios de infecção com necessidade de internação hospitalar, e verificamos um óbito com o enxerto funcionando por causa cardiovascular. Houve significativa redução da intensidade média de fluorescência dos DSAs de classe I, sem alteração significativa para os DSAs-DQ. Esse resultado evidencia a necessidade de desenvolvimento de terapias mais efetivas para casos com predomínio de DSA de classe II. No caso relatado de RMA após febre amarela, também observamos redução persistente de intensidade de fluorescência de DSA de classe I e manutenção da intensidade de fluorescência dos DSAs de classe II, semelhante ao verificado na avaliação geral da coorte.

A análise dos resultados da coorte também revelou redução significativa dos escores de inflamação e C4d após o tratamento, sem alteração significativa na inflamação microvascular. A ausência de efeito na glomerulite e capilarite peritubular poderia estar relacionada ao pequeno tamanho da amostra e ao curto período de

seguimento, mas também à maior intensidade de ligação de anticorpos ao endotélio, com menor capacidade regenerativa do que as células tubulares e as células circulantes. O tratamento utilizado foi mais efetivo na redução dos escores de inflamação, tubulite e C4d nos casos de RMA mais graves e diagnosticados após 24 meses de transplante. Apesar da ausência da descrição do escore cg na microscopia óptica, apenas 16,7% dos pacientes avaliados apresentaram duplicação de membrana basal na microscopia eletrônica, de modo que a maioria dos casos não apresentava lesões características de RMA crônica, classicamente descritas como menos responsivas ao tratamento padrão que as formas agudas.

A avaliação dos fatores associados ao pior prognóstico em nossa série revelou que os pacientes que evoluíram para perda de enxerto no primeiro ano após o tratamento apresentaram, ao diagnóstico de RMA, TFG significativamente menor e valores de proteinúria maiores do que os pacientes que permaneceram com o enxerto funcional ao final do mesmo período. Neste estudo, não houve associação de classe ou MFI de DSA com falência do enxerto ao final do primeiro ano. Os pacientes que evoluíram para falência de enxerto apresentaram médias de escores de tubulite e arterite intimal maiores do que o grupo que permaneceu com enxerto funcional, sem diferença significativa para inflamação microvascular ou C4d. Dessa forma, é possível que a presença de rejeição mediada por células no momento do diagnóstico de RMA possa ter exercido impacto negativo no prognóstico. Comparado aos pacientes que permaneceram com o enxerto funcional, o grupo que evoluiu para falência do enxerto apresentou um número maior de doadores de critério expandido e menor média de nível sanguíneo de inibidor de calcineurina ao diagnóstico de RMA, o que também pode ter contribuído para os desfechos observados. O número de pacientes que recebeu tratamento com terapia em pulso de corticoide foi significativamente maior no grupo que evoluiu para falência de enxerto, sem diferença nas outras formas de tratamento avaliadas. Isso pode estar relacionado à maior associação de rejeição mediada por células nesse grupo.

O estudo apresentou algumas limitações, como a ausência de biópsias protocolares, úteis na identificação de casos de RMA subclínica, e a ausência de realização de biópsia de controle na totalidade dos pacientes com RMA tratados. Entretanto, o estudo forneceu informações importantes sobre o impacto do tratamento padrão de RMA sobre as manifestações clínicas, laboratoriais e histológicas, bem como sobre os efeitos do tratamento sobre a cinética dos DSAs. A persistência dos

DSAs dirigidos contra antígenos DQ no sangue periférico dos pacientes com diagnóstico de RMA, nesta série, evidenciou o efeito insatisfatório do tratamento na redução desses anticorpos. Esses antígenos tem expressão aumentada após o transplante tanto em condições de estabilidade como em quadros de disfunção do enxerto, com expressão estimulada por quadros inflamatórios (60). Dessa forma, embora o desenvolvimento de anticorpos contra esses antígenos tenha sido associado com a glomerulopatia do transplante, a importância desses anticorpos no prognóstico do transplante renal permanece incerta.

6. CONCLUSÕES

- A RMA pode se manifestar como disfunção renal e proteinúria, que podem comprometer a sobrevida do enxerto a longo prazo.
- Alguns pacientes com diagnóstico de RMA tiveram achados compatíveis com diagnóstico de NM de novo, o que pode corresponder a uma manifestação histológica da rejeição desencadeada por mecanismos ainda não esclarecidos.
- Os casos de RMA diagnosticados após 24 meses de transplante, nesta série, apresentaram lesões histológicas mais graves, com maior prevalência de lesões compatíveis com rejeição mediada por células associada.
- Houve predomínio de DSAs de classe II entre os casos incluídos, embora não observamos, nesta série, influência de classe ou intensidade média de fluorescência dos DSAs na intensidade das manifestações clínicas ou histológicas verificadas.
- Neste estudo, a resposta ao tratamento instituído foi mais satisfatória nos casos de RMA tardia do que no grupo que apresentou RMA mais precoce.
- A menor gravidade das lesões histológicas, nos casos de RMA diagnosticados mais precocemente, poderia estar associada ao efeito protetor da terapia de indução de imunossupressão.
- O tratamento de RMA, nessa série, resultou em redução de inflamação tecidual e intensidade de depósito de C4d nos capilares peritubulares, sem efeitos na glomerulite e na capilarite peritubular. O tratamento promoveu, ainda, redução dos DSAs de classe I e DR, sem efeito sobre os anticorpos anti-DQ.

- Os casos que evoluíram para perda do enxerto renal em um ano após o tratamento de RMA apresentaram menores taxas de filtração glomerular e maiores valores de proteinúria ao diagnóstico de rejeição, além de médias de escores de tubulite e arterite intimal maiores do que o grupo que permaneceu com o enxerto funcionante.
- Não observamos influência de classe ou intensidade média de fluorescência dos DSAs no funcionamento do enxerto no primeiro ano após o tratamento de RMA.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O presente estudo permitiu o entendimento do efeito do tratamento padrão de RMA sobre a cinética dos DSAs, dado não disponível na literatura.
- A ausência de efeito do tratamento de RMA sobre os anticorpos anti-HLA-DQ sugere necessidade de desenvolvimento de terapias adicionais nesses casos.
- A descrição dos casos de nefropatia membranosa associada a RMA é escassa, e os mecanismos fisiopatológicos envolvidos são pouco conhecidos.
- Não observamos associação, em nossa série, entre classe e intensidade média dos DSAs com a gravidade das lesões teciduais na RMA, sugerindo a necessidade de estudos adicionais a respeito dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento e progressão das lesões teciduais mediadas por esses anticorpos.
- A persistência de DSA-DQ detectável com intensidade média de fluorescência elevada após o tratamento de RMA em pacientes com enxerto funcionante no primeiro ano sugere que tais anticorpos não sejam determinantes para os desfechos precoces no transplante renal, embora sua ação sobre o desenvolvimento de glomerulopatia do transplante ainda permaneça pouco esclarecida.
- As evidências sobre o benefício do tratamento com PF e IVIG são consideradas fracas, mas o tratamento instituído, nesse estudo, foi efetivo em reduzir inflamação e C4d, o que determinou o estabelecimento do protocolo de tratamento atualmente utilizado no serviço [Anexo 9.8] e a proposta de um

fluxograma de tratamento para os casos de RMA isoladas ou associadas a rejeição celular aguda [Anexo 9.9].

8. REFERÊNCIAS

1. Webster AC, Nagler E V, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. Lancet (London, England) [Internet]. 2017;389(10075):1238–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27887750>
2. Neves PDM de M, Sesso R de CC, Thomé FS, Lugon JR, Nasicmento MM. Brazilian Dialysis Census: analysis of data from the 2009-2018 decade. J Bras Nefrol [Internet]. 2020 May 20;42(2):191–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32459279>
3. Registro Brasileiro de Transplante - RBT. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2012-2019). Veic Of da Assoc Bras Transpl Orgãos - ABTO. 2019;
4. Tong A, Hanson CS, Chapman JR, Halleck F, Budde K, Papachristou C, et al. The preferences and perspectives of nephrologists on patients' access to kidney transplantation: a systematic review. Transplantation [Internet]. 2014 Oct 15;98(7):682–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25119129>
5. Montgomery RA, Tatapudi VS, Leffell MS, Zachary AA. HLA in transplantation. Nat Rev Nephrol [Internet]. 2018;14(9):558–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29985463>
6. Nakamura T, Shirouzu T, Nakata K, Yoshimura N, Ushigome H. The Role of Major Histocompatibility Complex in Organ Transplantation- Donor Specific Anti-Major Histocompatibility Complex Antibodies Analysis Goes to the Next Stage - . Int J Mol Sci [Internet]. 2019 Sep 13;20(18):4544. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/18/4544>
7. Goldberg AC, Rizzo LV. MHC structure and function – antigen presentation. Part 1. Einstein (São Paulo) [Internet]. 2015 Mar 24;13(1):153–6. Available from:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082015000100027&lng=en&tlng=en

8. Alelign T, Ahmed MM, Bobosha K, Tadesse Y, Howe R, Petros B. Kidney Transplantation: The Challenge of Human Leukocyte Antigen and Its Therapeutic Strategies. *J Immunol Res* [Internet]. 2018;2018:1–18. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/5986740/>
9. Robson KJ, Ooi JD, Holdsworth SR, Rossjohn J, Kitching AR. HLA and kidney disease: from associations to mechanisms. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2018 Oct 11;14(10):636–55. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41581-018-0057-8>
10. Reindl-Schwaighofer R, Heinzl A, Gualdoni GA, Mesnard L, Claas FHJ, Oberbauer R. Novel insights into non-HLA alloimmunity in kidney transplantation. *Transpl Int* [Internet]. 2020 Jan 28;33(1):5–17. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tri.13546>
11. Karahan GE, Claas FHJ, Heidt S. B Cell Immunity in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Jan 10;7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00686/full>
12. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2003 Nov;3(11):867–78. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri1222>
13. Tinckam KJ, Chandraker A. Mechanisms and Role of HLA and non-HLA Alloantibodies. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2006 May;1(3):404–14. Available from: <https://cjasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.2215/CJN.00270106>
14. Zachary AA, Klingman L, Thorne N, Smerglia AR, Teresi GA. Variations of the lymphocytotoxicity test. An evaluation of sensitivity and specificity. *Transplantation* [Internet]. 1995;60(5):498–503. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7676500
15. Picascia A, Infante T, Napoli C. Luminex and antibody detection in kidney transplantation. Vol. 16, *Clinical and Experimental Nephrology*. 2012. p. 373–81.

16. Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2018 Jan 6;13(1):182–92. Available from: <http://cjasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.2215/CJN.00700117>
17. Valenzuela NM, Hickey MJ, Reed EF. Antibody Subclass Repertoire and Graft Outcome Following Solid Organ Transplantation. *Front Immunol* [Internet]. 2016 Oct 24;7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00433/full>
18. Jordan SC, Vo A a. Donor-specific antibodies in allograft recipients: etiology, impact and therapeutic approaches. *Curr Opin Organ Transplant* [Internet]. 2014;1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25304815>
19. Cross AR, Lion J, Poussin K, Assayag M, Taupin J-L, Glotz D, et al. HLA-DQ alloantibodies directly activate the endothelium and compromise differentiation of FoxP3high regulatory T lymphocytes. *Kidney Int* [Internet]. 2019 May; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253819304855>
20. Cross AR, Lion J, Loiseau P, Charron D, Taupin J-L, Glotz D, et al. Donor Specific Antibodies are not only directed against HLA-DR: Minding your Ps and Qs. *Hum Immunol* [Internet]. 2016 Nov;77(11):1092–100. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885916300428>
21. Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. Ingelfinger JR, editor. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Sep 20;379(12):1150–60. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1802677>
22. Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins LS, Fonseca I, Beirão I, et al. Analysis of preformed donor-specific anti-HLA antibodies characteristics for prediction of antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transpl Immunol*. 2015;32(2):66–71.
23. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2005 Oct 20;5(10):807–17. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri1702>
24. Mehra NK, Baranwal AK. Clinical and immunological relevance of antibodies in solid organ transplantation. *Int J Immunogenet* [Internet]. 2016 Dec;43(6):351–68. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/iji.12294>

25. Haas M, Mirocha J, Reinsmoen NL, Vo AA, Choi J, Kahwaji JM, et al. Differences in pathologic features and graft outcomes in antibody-mediated rejection of renal allografts due to persistent/recurrent versus de novo donor-specific antibodies. *Kidney Int* [Internet]. 2017 Mar;91(3):729–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253816306561>
26. Randhawa P, Roufosse C. The expanding spectrum of antibody-mediated rejection: Should we include cases where no anti-HLA donor-specific antibody is detected? *Am J Transplant* [Internet]. 2019 Mar;19(3):622–4. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ajt.15114>
27. Filippone EJ, McCue PA, Farber JL. Transplant glomerulopathy. *Mod Pathol* [Internet]. 2018 Feb 13;31(2):235–52. Available from: <http://www.nature.com/articles/modpathol2017123>
28. Colvin RB. Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection: Diagnosis and Pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2007 Apr;18(4):1046–56. Available from: <http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2007010073>
29. Panzer SE, Joachim E, Parajuli S, Zhong W, Astor BC, Djamali A. Glomerular C3 Deposition Is an Independent Risk Factor for Allograft Failure in Kidney Transplant Recipients With Transplant Glomerulopathy. *Kidney Int Reports* [Internet]. 2019 Apr;4(4):582–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468024919300415>
30. Haas M. Transplant Glomerulopathy: The View from the Other Side of the Basement Membrane. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2015 Jun;26(6):1235–7. Available from: <https://jasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2014090945>
31. Honda K, Horita S, Toki D, Taneda S, Nitta K, Hattori M, et al. De novo membranous nephropathy and antibody-mediated rejection in transplanted kidney. *Clin Transplant* [Internet]. 2011 Mar;25(2):191–200. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0012.2010.01213.x>
32. Leon J, Pérez-Sáez MJ, Batal I, Beck LH, Rennke HG, Canaud G, et al. Membranous Nephropathy Posttransplantation: An Update of the Pathophysiology and Management. *Transplantation* [Internet]. 2019

- Oct;103(10):1990–2002. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/TP.0000000000002758>
33. Doreille A, Dieudé M, Cardinal H. The determinants, biomarkers, and consequences of microvascular injury in kidney transplant recipients. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2019 Jan 1;316(1):F9–19. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00163.2018>
 34. 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* [Internet]. 1999 Feb;55(2):713–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9987096>
 35. 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* [Internet]. 2008 Apr;8(4):753–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-6143.2008.02159.x>
 36. Loupy A, Haas M, Solez K, Racusen L, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2015 Kidney meeting report: Current challenges in rejection classification and prospects for adopting molecular pathology. *Am J Transplant* [Internet]. 2016; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27862883>
 37. Bartel G, Schwaiger E, Böhmig GA. Prevention and treatment of alloantibody-mediated kidney transplant rejection. *Transpl Int* [Internet]. 2011 Dec;24(12):1142–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-2277.2011.01309.x>
 38. Cooper JE. Evaluation and Treatment of Acute Rejection in Kidney Allografts. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2020 Mar 6;15(3):430–8. Available from: <http://cjasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.2215/CJN.11991019>
 39. Nickerson PW. What have we learned about how to prevent and treat antibody-mediated rejection in kidney transplantation? *Am J Transplant* [Internet]. 2020 Jun 15;20(S4):12–22. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ajt.15859>
 40. Schinstock CA, Mannon RB, Budde K, Chong AS, Haas M, Knechtle S, et al. Recommended Treatment for Antibody-mediated Rejection After Kidney

- Transplantation. Transplantation [Internet]. 2020 May;104(5):911–22. Available from: <http://journals.lww.com/10.1097/TP.0000000000003095>
41. de Back DZ, Neyrinck MM, Vrielink H. Therapeutic plasma apheresis: Expertise and indications. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2019 Jun;58(3):254–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473050219300576>
 42. Chaigne B, Mouthon L. Mechanisms of action of intravenous immunoglobulin. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2017 Feb;56(1):45–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473050216302038>
 43. Lefaucheur C, Nochy D, Andrade J, Verine J, Gautreau C, Charron D, et al. Comparison of Combination Plasmapheresis/IVIg/Anti-CD20 Versus High-Dose IVIg in the Treatment of Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant* [Internet]. 2009 May;9(5):1099–107. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-6143.2009.02591.x>
 44. Webster AC, Wu S, Tallapragada K, Park MY, Chapman JR, Carr SJ. Polyclonal and monoclonal antibodies for treating acute rejection episodes in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2017 Jul 20; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD004756.pub4>
 45. Bailly E, Ville S, Blancho G, Morelon E, Bamoulid J, Caillard S, et al. An extension of the RITUX-ERAH study, multicenter randomized clinical trial comparing rituximab to placebo in acute antibody-mediated rejection after renal transplantation. *Transpl Int* [Internet]. 2020 May 5;tri.13613. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tri.13613>
 46. Böhmig GA, Eskandary F, Doberer K, Halloran PF. The therapeutic challenge of late antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transpl Int* [Internet]. 2019 May 7;tri.13436. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tri.13436>
 47. Moreso F, Crespo M, Ruiz JC, Torres A, Gutierrez-Dalmau A, Osuna A, et al. Treatment of chronic antibody mediated rejection with intravenous immunoglobulins and rituximab: A multicenter, prospective, randomized, double-blind clinical trial. *Am J Transplant* [Internet]. 2018 Apr;18(4):927–35. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajt.14520>

48. DeVos JM, Gaber AO, Knight RJ, Land GA, Suki WN, Gaber LW, et al. Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation. *Kidney Int* [Internet]. 2012 Sep;82(5):598–604. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S008525381555597X>
49. Tanriover B, Mohan S, Cohen DJ, Radhakrishnan J, Nickolas TL, Stone PW, et al. Kidneys at Higher Risk of Discard: Expanding the Role of Dual Kidney Transplantation. *Am J Transplant* [Internet]. 2014 Feb;14(2):404–15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajt.12553>
50. de Sousa MV, Gonçalves AC, Zollner RL, Mazzali M. Effect of Preformed or De Novo Anti-HLA Antibodies on Function and Graft Survival in Kidney Transplant Recipients. *Ann Transplant*. 2018;23.
51. Sampaio WLV, Mazzali M. C4d Deposits in Borderline Rejection: An Early Marker for Chronic Renal Dysfunction? *Transplant Proc* [Internet]. 2014 Jul;46(6):1710–2. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041134514003625>
52. Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Am J Transplant* [Internet]. 2003 Apr;3(s4):114–25. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-6143.3.s4.11.x>
53. Patel K, Hirsch J, Beck L, Herlitz L, Radhakrishnan J. De novo Membranous Nephropathy in Renal Allograft Associated With Antibody-Mediated Rejection and Review of the Literature. *Transplant Proc* [Internet]. 2013 Nov;45(9):3424–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041134513007513>
54. El Kossi M, Harmer A, Goodwin J, Wagner B, Shortland J, Angel C, et al. De novo membranous nephropathy associated with donor-specific alloantibody. *Clin Transplant* [Internet]. 2007 Jul;070701175610001-??? Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0012.2007.00741.x>
55. Brennan DC, Daller JA, Lake KD, Cibrik D, Del Castillo D. Rabbit Antithymocyte Globulin versus Basiliximab in Renal Transplantation. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Nov 9;355(19):1967–77. Available from:

<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa060068>

56. Webster AC, Ruster LP, McGee RG, Matheson SL, Higgins GY, Willis NS, et al. Interleukin 2 receptor antagonists for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2010 Jan 20; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD003897.pub3>
57. Stucchi RSB, Lopes MH, Kumar D, Manuel O. Vaccine Recommendations for Solid-Organ Transplant Recipients and Donors. *Transplantation* [Internet]. 2018;102(2S Suppl 2):S72–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29381581>
58. Watson A, Klimstra W. T Cell-Mediated Immunity towards Yellow Fever Virus and Useful Animal Models. *Viruses* [Internet]. 2017 Apr 11;9(4):77. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4915/9/4/77>
59. Mulley WR, Dendle C, Ling JEH, Knight SR. Does vaccination in solid-organ transplant recipients result in adverse immunologic sequelae? A systematic review and meta-analysis. *J Hear Lung Transplant* [Internet]. 2018 Jul;37(7):844–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053249818313822>
60. Cross AR, Glotz D, Mooney N. The Role of the Endothelium during Antibody-Mediated Rejection: From Victim to Accomplice. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Jan 29;9. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00106/full>
61. Filippone EJ, Farber JL. The specificity of acute and chronic microvascular alterations in renal allografts. *Clin Transplant* [Internet]. 2013 Nov;27(6):790–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ctr.12258>
62. Yang Y, Hodgins JB, Afshinnia F, Wang SQ, Wickman L, Chowdhury M, et al. The Two Kidney to One Kidney Transition and Transplant Glomerulopathy: A Podocyte Perspective. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2015 Jun;26(6):1450–65. Available from: <http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2014030287>
63. Ponticelli C, Moroni G, Glassock RJ. De Novo Glomerular Diseases after Renal Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2014 Aug 7;9(8):1479–87. Available from: <http://cjasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.2215/CJN.12571213>

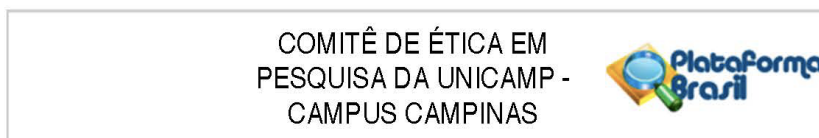
64. Debiec H, Martin L, Jouanneau C, Dautin G, Mesnard L, Rondeau E, et al. Autoantibodies Specific for the Phospholipase A2 Receptor in Recurrent and De Novo Membranous Nephropathy. *Am J Transplant* [Internet]. 2011 Oct;11(10):2144–52. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-6143.2011.03643.x>
65. Larsen CP, Walker PD. Phospholipase A2 Receptor (PLA2R) Staining Is Useful in the Determination of De Novo Versus Recurrent Membranous Glomerulopathy. *Transplant J* [Internet]. 2013 May;95(10):1259–62. Available from: <http://journals.lww.com/00007890-201305270-00012>
66. Montgomery RA, Loupy A, Segev DL. Antibody-mediated rejection: New approaches in prevention and management. *Am J Transplant* [Internet]. 2018 Jan;18:3–17. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajt.14584>
67. Kaplan AA. Therapeutic Plasma Exchange: Core Curriculum 2008. *Am J Kidney Dis* [Internet]. 2008 Dec;52(6):1180–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0272638608007075>
68. Kaplan AA. Toward the Rational Prescription of Therapeutic Plasma Exchange: The Kinetics of Immunoglobulin Removal. *Semin Dial* [Internet]. 2007 Oct 1;5(3):227–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1525-139X.1992.tb00482.x>
69. Padmanabhan A, Connelly-Smith L, Aqui N, Balogun RA, Klingel R, Meyer E, et al. Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice – Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Eighth Special Issue. *J Clin Apher* [Internet]. 2019 Jun 10;34(3):171–354. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jca.21705>
70. Kim M, Martin ST, Townsend KR, Gabardi S. Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation: A Review of Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment Options. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther* [Internet]. 2014 Jul;34(7):733–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/phar.1426>
71. White NB, Greenstein SM, Cantafio AW, Schechner R, Glicklich D, McDonough P, et al. Successful Rescue Therapy with Plasmapheresis and Intravenous

Immunoglobulin for Acute Humoral Renal Transplant Rejection. Transplantation [Internet]. 2004 Sep 15;78(5):772–4. Available from: <https://journals.lww.com/00007890-200409150-00027>

72. Jordan SC, Quartel AW, Czer LSC, Admon D, Chen G, Fishbein MC, et al. Posttransplant therapy using high-dose human immunoglobulin (intravenous gammaglobulin) to control acute humoral rejection in renal and cardiac allograft recipients and potential mechanism of action. Transplantation [Internet]. 1998 Sep;66(6):800–5. Available from: <http://journals.lww.com/00007890-199809270-00017>
73. Ribeiro, Adriana Reginato; Berdichevski, Roberto Herz; Silva, Daniel Melquiades; Mazzali, Marilda; Gonçalves, Luiz Felipe dos Santos; Manfro RC. Tratamento da rejeição humoral em receptores de transplante renal. J Bras Transpl. 2009;12(2):1092–5.

9. ANEXOS

9.1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UNICAMP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo retrospectivo, unicêntrico, sobre o impacto da presença de anticorpos pré-formados ou desenvolvidos após o transplante renal, na evolução clínica e função do enxerto.

Pesquisador: MARCOS VINICIUS DE SOUSA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51485415.6.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.398.959

Apresentação do Projeto:

“Os antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês Human Leucocyte Antigen) são genes que codificam moléculas constitutivamente expressas na superfície de células nucleadas, que determinam a histocompatibilidade entre tecidos transplantados, com importância na ocorrência de rejeição e na gravidade da mesma. Na espécie humana, esses genes localizam-se no braço curto do cromossomo 6, são herdados em bloco dos cromossomos de origem paterna e materna, com expressão codominante. A identificação do sistema HLA, realizada por método de citotoxicidade celular mediada por anticorpo e dependente de complemento ou por métodos moleculares por meio da extração de ácido desoxirribonucleico de células nucleadas, é importante para a distribuição de órgãos, realizada de acordo com a compatibilidade entre doador e receptor, e para a identificação de anticorpos dirigidos contra antígenos presentes no enxerto. A presença de tais anticorpos na circulação sanguínea de receptores de transplante renal consiste de um dos critérios diagnósticos de rejeição mediada por anticorpos, juntamente com alteração de função renal e achados compatíveis de rejeição à biópsia do enxerto e presença de C4d no tecido renal. A identificação de anticorpos dirigidos contra o sistema HLA, específicos do doador ou inespecíficos, poderia representar um fator de risco à ocorrência de rejeição, aguda ou crônica, com impacto no funcionamento e sobrevida do enxerto a longo prazo, e implicação na escolha do tratamento

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.398.959

imunossupressor de manutenção ou resgate em casos de rejeição diagnosticada. O presente estudo tem como objetivo avaliar as características, evolução clínica e laboratorial e sobrevida de paciente e enxerto, de receptores de transplante renal com anticorpos anti-HLA, inespecíficos ou específicos, pré formados ou de novo, por meio da análise retrospectiva de dados clínicos e laboratoriais de pacientes transplantados renais do Programa de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. Os dados coletados em formulário específico serão transcritos para planilha Excell. Os resultados numéricos serão expressos como média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística será realizada através do programa Prisma Graph Pad versão 6.0, e será considerada como significância estatística se $p < 0.05$.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar as características, evolução clínica e laboratorial e sobrevida de paciente e enxerto, de receptores de transplante renal com anticorpos anti-HLA, inespecíficos ou específicos, pré formados ou de novo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nesta pesquisa serão analisadas informações obtidas a partir do prontuário médico e dos registros dos participantes no banco de dados do programa de transplante renal do HC-Unicamp, assim, os riscos da pesquisa estão relacionados ao sigilo e preservação da identidade dos participantes. Os pesquisadores informam que os dados dos participantes serão analisados de forma anônima e os resultados apresentados de forma agregada, não permitindo a identificação dos participantes.

Não há benefícios diretos aos participantes

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa apresentada como trabalho de Marcos Vinícius de Sousa para o Programa de Transplante Renal do Hospital de Clínicas da Unicamp, o qual será realizado sob a orientação da Profa. Dra. Marilda Mazzali. Nesta pesquisa, pretende-se avaliar as características, evolução clínica e laboratorial e sobrevida de paciente e enxerto, de receptores de transplante renal com anticorpos anti-HLA, inespecíficos ou específicos, pré-formados ou de novo. As informações necessárias para a realização do estudo (descritas no projeto e formulário da plataforma Brasil) serão obtidas a partir do prontuário médico e dos registros dos participantes no banco de dados do programa de transplante renal do HC-Unicamp. A ficha de coleta de dados não inclui nome ou HC dos participantes, fato que contribuirá para a preservação da identidade dos participantes. Pretende-se incluir no estudo 60 pares de doadores-receptores submetidos ao

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.398.959

transplante renal. Os participantes serão distribuídos por 4 grupos experimentais com o n (correto) igual a 30 participantes por grupo (15 doadores e 15 receptores do transplante: (1) Inpré: receptores com anticorpos anti HLA formados antes do transplante, mas inespecíficos para o doador; (2) DSApré: receptores com anticorpos anti HLA formados antes do transplante, específicos para o doador; (3) Inpós: receptores que desenvolveram anticorpos anti HLA de novo pós transplante, porém inespecíficos para o doador; (4) DSApós: receptores que desenvolveram anticorpos anti HLA de novo pós transplante, específicos contra o doador. Os pesquisadores propõem dispensa do TCLE justificando: "Trata-se de um estudo observacional, em que as informações utilizadas estão disponíveis em banco de dados da instituição e prontuários médicos. Os dados serão analisados de forma anônima e os resultados apresentados de forma agregada, não permitindo a identificação dos participantes de pesquisa".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada pela pesquisadora responsável, Marcos Vinicius Souza e por Antônio Gonçalves de Oliveira Filho, Coordenador de Assistência do Hospital de Clínicas da Unicamp, instituição indicada como proponente;
3. Novo formulário da Plataforma Brasil com as informações básicas sobre o projeto, corrigido quanto ao número de participantes e cronograma.
4. Projeto completo.
5. Arquivo pdf denominado Ficha de Coleta de Dados.
6. Carta resposta ao CEP

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pendências e inadequações foram corrigidas conforme indicado no parecer consubstanciado 1.383.756 de 5 de janeiro de 2016. Recomenda-se a dispensa do TCLE para o estudo. Não há mais pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**



Continuação do Parecer: 1.398.959

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_625511.pdf	07/01/2016 09:00:54		Aceito
Outros	cartaresposta.pdf	07/01/2016 09:00:10	MARCOS VINICIUS DE SOUSA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	27/11/2015 21:47:00	MARCOS VINICIUS DE SOUSA	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.398.959

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCompleto.pdf	16/11/2015 15:32:16	MARCOS VINICIUS DE SOUSA	Aceito
Outros	fichacoletadedados.pdf	12/11/2015 15:55:58	MARCOS VINICIUS DE SOUSA	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	12/11/2015 15:55:17	MARCOS VINICIUS DE SOUSA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 01 de Fevereiro de 2016

Assinado por:

Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

9.2: Anticorpos Anti-HLA detectáveis pelo método LABScreen® Single Antigen HLA Class I LS1A04

Especificidade	Especificidade	Especificidade	Especificidade	Especificidade	Especificidade
Alélica	Antigênica	Alélica	Antigênica	Alélica	Antigênica
A*01:01	A1	B*13:01	B13	B*51:02	B51
A*02:01	A2	B*13:02	B13	B*52:01	B52
A*02:03	A2	B*14:01	B64	B*53:01	B53
A*02:06	A2	B*14:02	B65	B*54:01	B54
A*03:01	A3	B*15:01	B62	B*55:01	B55
A*11:01	A11	B*15:02	B75	B*56:01	B56
A*11:02	A11	B*15:03	B72	B*57:01	B57
A*23:01	A23	B*15:10	B71	B*57:03	B57
A*24:02	A24	B*15:11	B75	B*58:01	B58
A*24:03	A24	B*15:12	B76	B*59:01	B59
A*25:01	A25	B*15:13	B77	B*67:01	B67
A*26:01	A26	B*15:16	B63	B*73:01	B73
A*29:01	A29	B*18:01	B18	B*78:01	B78
A*29:02	A29	B*27:05	B27	B*81:01	B81
A*30:01	A30	B*27:08	B27	B*82:01	B82
A*30:02	A30	B*35:01	B35	C*01:02	Cw1
A*31:01	A31	B*37:01	B37	C*02:02	Cw2
A*32:01	A32	B*38:01	B38	C*03:02	Cw10
A*33:01	A33	B*39:01	B39	C*03:03	Cw9
A*33:03	A33	B*40:01	B60	C*03:04	Cw10
A*34:01	A34	B*40:02	B61	C*04:01	Cw4
A*34:02	A34	B*40:06	B61	C*05:01	Cw5
A*36:01	A36	B*41:01	B41	C*06:02	Cw6
A*43:01	A43	B*42:01	B42	C*07:02	Cw7
A*66:01	A66	B*44:02	B44	C*08:01	Cw8
A*66:02	A66	B*44:03	B44	C*12:03	Cw12
A*68:01	A68	B*45:01	B45	C*14:02	Cw14
A*68:02	A68	B*46:01	B46	C*15:02	Cw15
A*69:01	A69	B*47:01	B47	C*16:01	Cw16
A*74:01	A74	B*48:01	B48	C*17:01	Cw17
A*80:01	A80	B*49:01	B49	C*18:02	Cw18
B*07:02	B7	B*50:01	B50		
B*08:01	B8	B*51:01	B51		

9.3: Anticorpos anti-HLA detectáveis pelo método LABScreen® Single Antigen HLA Class II LS2A01

Especificidade Alélica	Especificidade Antigênica	Especificidade Alélica	Especificidade Antigênica	Especificidade Alélica	Especificidade Antigênica
DRB1*01:01	DR1	DRB3*03:01	DR52	DQA1*04:01, -, DQB1*04:02	DQA4 DQ4
DRB1*01:02	DR1	DRB4*01:01	DR53	DQA1*05:01, -, DQB1*02:01	DQA5 DQ2
DRB1*01:03	DR103	DRB3*03:01	DR52	DQA1*05:03, -, DQB1*03:01	DQA5 DQ7
DRB1*03:01	DR17	DRB4*01:01	DR53	DQA1*05:05, -, DQB1*03:01	DQA5 DQ7
DRB1*03:02	DR18	DRB4*01:03	DR53	DQA1*06:01, -, DQB1*03:01	DQA6 DQ7
DRB1*04:01	DR4	DRB5*01:01	DR51	DPA1*01:03, -, DPB1*01:01	DPA1 DP1
DRB1*04:02	DR4	DRB5*02:02	DR51	DPA1*01:03, -, DPB1*02:01	DPA1 DP2
DRB1*04:03	DR4	DQA1*01:01, -, DQB1*03:02	DQA1 DQ8	DPA1*01:03, -, DPB1*03:01	DPA1 DP3
DRB1*04:04	DR4	DQA1*01:01, -, DQB1*05:01	DQA1 DQ5	DPA1*01:03, -, DPB1*04:01	DPA1 DP4
DRB1*04:05	DR4	DQA1*01:01, -, DQB1*06:02	DQA1 DQ6	DPA1*01:03, -, DPB1*04:02	DPA1 DP4
DRB1*07:01	DR7	DQA1*01:02, -, DQB1*05:02	DQA1 DQ5	DPA1*01:03, -, DPB1*11:01	DPA1 DP11
DRB1*08:01	DR8	DQA1*01:02, -, DQB1*06:02	DQA1 DQ6	DPA1*01:03, -, DPB1*19:01	DPA1 DP19
DRB1*09:01	DR9	DQA1*01:02, -, DQB1*06:04	DQA1 DQ6	DPA1*01:04, -, DPB1*18:01	DPA1 DP18
DRB1*09:02	DR9	DQA1*01:02, -, DQB1*06:09	DQA1 DQ6	DPA1*01:05, -, DPB1*03:01	DPA1 DP3
DRB1*10:01	DR10	DQA1*01:03, -, DQB1*06:01	DQA1 DQ6	DPA1*01:05, -, DPB1*11:01	DPA1 DP11
DRB1*11:01	DR11	DQA1*01:03, -, DQB1*06:03	DQA1 DQ6	DPA1*01:05, -, DPB1*13:01	DPA1 DP13
DRB1*11:04	DR11	DQA1*02:01, -, DQB1*02:01	DQA2 DQ2	DPA1*01:05, -, DPB1*18:01	DPA1 DP18
DRB1*12:01	DR12	DQA1*02:01, -, DQB1*02:02	DQA2 DQ2	DPA1*01:05, -, DPB1*28:01	DPA1 DP28
DRB1*12:02	DR12	DQA1*02:01, -, DQB1*03:01	DQA2 DQ7	DPA1*02:01, -, DPB1*01:01	DPA2 DP1
DRB1*13:01	DR13	DQA1*02:01, -, DQB1*03:02	DQA2 DQ8	DPA1*02:01, -, DPB1*03:01	DPA2 DP3
DRB1*13:03	DR13	DQA1*02:01, -, DQB1*03:03	DQA2 DQ9	DPA1*02:01, -, DPB1*05:01	DPA2 DP5
DRB1*14:01	DR14	DQA1*02:01, -, DQB1*04:01	DQA2 DQ4	DPA1*02:01, -, DPB1*06:01	DPA2 DP6
DRB1*14:02	DR14	DQA1*02:01, -, DQB1*04:02	DQA2 DQ4	DPA1*02:01, -, DPB1*09:01	DPA2 DP9
DRB1*14:54	DR14	DQA1*03:01, -, DQB1*02:01	DQA3 DQ2	DPA1*02:01, -, DPB1*10:01	DPA2 DP10
DRB1*15:01	DR15	DQA1*03:01, -, DQB1*03:01	DQA3 DQ7	DPA1*02:01, -, DPB1*13:01	DPA2 DP13
DRB1*15:02	DR15	DQA1*03:01, -, DQB1*03:02	DQA3 DQ8	DPA1*02:01, -, DPB1*14:01	DPA2 DP14
DRB1*15:03	DR15	DQA1*03:01, -, DQB1*03:03	DQA3 DQ9	DPA1*02:01, -, DPB1*15:01	DPA2 DP15
DRB1*16:01	DR16	DQA1*03:02, -, DQB1*03:02	DQA3 DQ8	DPA1*02:01, -, DPB1*17:01	DPA2 DP17
DRB1*16:02	DR16	DQA1*03:02, -, DQB1*03:03	DQA3 DQ9	DPA1*02:01, -, DPB1*18:01	DPA2 DP18
DRB3*01:01	DR52	DQA1*03:03, -, DQB1*04:01	DQA3 DQ4	DPA1*02:01, -, DPB1*23:01	DPA2 DP23
DRB3*02:02	DR52	DQA1*04:01, -, DQB1*02:01	DQA4 DQ2	DPA1*02:01, -, DPB1*28:01	DPA2 DP28

9.4: Publicação dos resultados da coorte retrospectiva: *Treatment of Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation: Immunological Effects, Clinical Response, and Histological Findings* – Annals of Transplantation



ORIGINAL PAPER

e-ISSN 2329-0358
© Ann Transplant, 2020; 25: e925488
DOI: 10.12659/AOT.925488

Received: 2020.04.27
Accepted: 2020.07.13
Available online: 2020.09.09
Published: 2020.XX.XX

Treatment of Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation: Immunological Effects, Clinical Response, and Histological Findings

Authors' Contributions:
Study Design: A
Data Collection: B
Statistical Analysis: C
Data Interpretation: D
Manuscript Preparation: E
Literature Search: F
Funds Collection: G

ABCDEF 1 **Marcos Vinicius de Sousa**
CD 2 **Ana Claudia Gonzalez**
DE 3 **Ricardo de Lima Zollner**
ADE 1 **Marilda Mazzali**

1 Renal Transplant Research Laboratory, Renal Transplant Unit, Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil
2 Histocompatibility Laboratory, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil
3 Laboratory of Translational Immunology, Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

Corresponding Author: Marcos Vinicius de Sousa, e-mail: marcosnefro@gmail.com
Source of support: Departmental sources

APPROVED GALLEY PROOF

Background: Antibody-mediated rejection (AMR) presents with diverse clinical manifestations and can have a potential negative impact on graft function and survival. If not treated successfully, AMR can lead to 20-30% graft loss after 1 year. Little is known about the efficacy of AMR treatment, and the most appropriate therapeutic strategy has not yet been determined. This study evaluated the effects of AMR treatment with plasmapheresis (PP) and intravenous immunoglobulin (IVIg) on renal function, intensity of anti-HLA antibodies, and graft biopsy morphology.

Material/Methods: This single-center retrospective cohort study included renal transplant recipients with biopsy-proven AMR who were treated with PP and/or IVIg. Clinical findings, mean fluorescence intensity of donor-specific anti-HLA antibodies (DSA), and graft histology findings, classified according to Banff score at the time of AMR and 6 and 12 months later, were evaluated.

Results: Of the 42 patients who met the inclusion criteria, 38 (90.5%) received IVIg and 26 (61.9%) underwent PP. At AMR diagnosis, 36 (85.7%) patients had proteinuria, with their estimated glomerular filtration rate remaining stable during follow-up. During the first year, 8 (19.0%) patients experienced graft failure, but none died with a functioning graft. Reductions in the class I panel of reactive antibodies were observed 6 and 12 months after AMR treatment, with significant reductions in DSA-A and -B fluorescence intensity, but no changes in DSA-DQ. Graft biopsy showed reductions in inflammation and C4d scores, without improvements in microvascular inflammation.

Conclusions: AMR treatment reduced biopsy-associated and serological markers of AMR, but did not affect DSA-DQ.

MeSH Keywords: **Biopsy • Graft Rejection • Graft Survival • HLA Antigens • Immunoglobulins, Intravenous • Plasmapheresis**

Full-text PDF: <https://www.annalsoftransplantation.com/abstract/index/idArt/925488>

3169 3 1 22



Background

About 6.7% of kidney transplant recipients experience antibody-mediated rejection (AMR) [1]. If not successfully treated, an estimated 20–30% of patients with AMR experience allograft loss within 1 year [2]. The main antigenic targets of AMR are the human leukocyte antigens (HLAs), molecules expressed at the surface of nucleated cells with allorecognition function [2]. Previous exposure to foreign HLAs, such as during pregnancy, blood transfusion, or transplantation, can elicit the production of anti-HLA antibodies, increasing the risk of AMR following kidney transplantation [1,2]. In addition to preformed donor-specific anti-HLA antibodies (DSA), *de novo* DSA can emerge at any time after transplantation, often as a result of insufficient immunosuppression or non-adherence to immunosuppressive therapy [3]. Besides the HLA, autoantigens expressed by endothelial cells, such as major histocompatibility complex class I polypeptide-related chain A (MICA), and agonistic angiotensin II type 1 receptor antibodies, can also elicit antibody production, which can result in later rejection and graft loss [1,3].

The presence of DSA is a crucial component for the diagnosis of AMR in kidney transplant recipients [3]. DSA can be detected by 2 methods: cell-based tests, including complement-dependent lymphocytotoxicity and flow cytometric crossmatch assays; and solid-phase tests, including enzyme-linked immunosorbent assays and multianalyte single-bead tests by flow cytometry or Luminex assays [2]. Furthermore, the diagnosis of AMR requires biopsy evidence of current or recent antibody-vascular endothelium interaction, with identification of tissue deposits of C4d, a digestion product of the complement component C4, and evidence of microvascular inflammation (MVI) and/or macrovascular lesions [3]. C4d deposits can be detected by immunoperoxidase and immunofluorescence assays [3], whereas graft MVI can be detected histologically by capillary dilatation, endothelial cell cytoplasmic swelling or enlargement, and vacuolization. Macrovascular lesions present with severe intimal arteritis and monocytic and lymphocytic inflammation of the intima, with or without transmural necrosis [3].

AMR is a disease process with a continuum of severity, varying from subclinical indolent microvascular abnormalities to chronic damage, dysfunction, and graft loss [3]. The aims of AMR treatment are the removal of harmful alloantibodies from the circulation, with plasmapheresis (PP) or immunoadsorption; and the modulation of components of acquired and innate immunity, by treatment with intravenous immunoglobulin (IVIG), the anti-CD20 antibody rituximab, the proteasome inhibitor bortezomib, the anti-C5 antibody eculizumab, or splenectomy [1,4]. PP promptly removes formed antibodies and is associated with an 80–90% reversal of AMR and 80% graft survival at 18 months [2], whereas IVIG is potentially useful due to its immunomodulatory effects [1]. The monoclonal anti-CD20

antibody rituximab binds to the surface of precursor and mature B cells, resulting in transient B cell depletion [1]. PP and IVIG, with or without rituximab, are considered standard treatments of acute AMR [5,6], with The Transplantation Society (TTS) recommending that AMR be treated with PP, IVIG, and steroids, followed, if necessary, by adjuvant therapy with rituximab [6,7]. The addition of rituximab to PP plus IVIG has been associated with a more significant reduction in DSA and improved graft survival [5,7,8]. In contrast, a systematic review [9] and another multicenter prospective trial [10] showed that the addition of rituximab had no benefit in patients with AMR. Therefore, despite its widespread use, rituximab-associated B cell depletion has not shown proven benefit in the treatment of AMR [6]. Moreover, targeting of antibody-producing plasma cells with the proteasome inhibitor bortezomib did not improve histology, molecular signatures, or DSA levels in patients with AMR, but had significant toxicity [6]. In contrast, the addition of an alternative irreversible proteasome inhibitor, carfilzomib, to IVIG and PP was found to reduce DSA levels with a favorable toxicity profile [11]. Small studies showed that complement inhibitors had limited efficacy in AMR treatment, with no or only minor clinical effects [11]. Other emerging therapeutic strategies are currently under investigation, such as the anti-interleukin 6 monoclonal antibody tocilizumab, but little progress has been made in the development of effective AMR therapies [6].

High quality data on interventions and drugs for the treatment of AMR are lacking [6,12], and the most appropriate therapeutic strategy remains undetermined. This retrospective study analyzed the effects of treatment with PP and/or IVIG on clinical outcomes, the intensity of anti-HLA antibodies, and the morphological characteristics of biopsy specimens in patients with AMR during the first year after treatment.

Material and Methods

This single-center retrospective study included renal transplant recipients aged >18 years at the time of transplantation who were treated for biopsy-proven AMR. AMR was diagnosed by the presence of microvascular injury in the graft biopsy and the presence of DSA in peripheral blood. Patients were excluded if they were aged <18 years, lacked DSA, or lacked histological confirmation of AMR. The endpoints of the study were renal function, the mean fluorescence intensity of DSA, and graft biopsy morphology at AMR and after treatment. The study protocol was approved by the University of Campinas Ethics Committee (CAAE: 51485415.6.0000.5404), which waived the requirement for informed consent due to the retrospective design of this study and the non-identification of the participants. The choice of AMR treatment was based on clinical indication and available therapy.

All transplant recipients were HLA-typed and screened for anti-HLA antibodies with solid-phase tests, as previously described [13,14]. HLA was typed by polymerase chain reaction (PCR) amplification of genomic deoxyribonucleic acid (DNA) samples, and anti-HLA antibodies were screened with solid-phase tests (LABScreen™ Single Antigen HLA Class I LS1A04 and LABScreen™ Single Antigen HLA Class II LS2A01). All included kidney transplant recipients were negative for both T- and B cell complement-dependent cytotoxicity crossmatch at the time of transplant. The study included recipients who received grafts from standard and expanded criteria donors, according to the criteria of the United Network for Organ Sharing (UNOS) [15].

Immunosuppression was induced in recipients from standard kidney donors and those with low immunological risk, defined as <30% panel-reactive antibodies (PRA) and the absence of DSA, by administration of the monoclonal anti-IL-2 receptor antibody basiliximab (20 mg IV) on the day of transplantation and on the fourth-day post-transplantation, or anti-thymocyte globulin (3 mg/kg) on the day of transplantation. Induction therapy in recipients of kidneys from expanded criteria donors, non-identical HLA living donors, and donors with high immunological risk (PRA >50% or presence of DSA) consisted of anti-thymocyte globulin (4.5 to 7 mg/kg IV), dose-adjusted by total lymphocyte count. Some recipients of organs from living donors did not receive immunosuppressive induction therapy due to national and regional laws. All recipients received pulse corticosteroid therapy with methylprednisolone 500 mg IV at the time of transplantation and were maintained on prednisone ≤10 mg/day during follow-up. Maintenance immunosuppression consisted of tacrolimus 0.1 mg/kg bid, dose-adjusted according to blood levels, and sodium mycophenolate 720 mg bid, adjusted according to body surface area, gastrointestinal tolerance, and peripheral blood white and red cell counts. None of the included patients received a desensitization protocol before transplantation.

Rejection was suspected in patients who showed a >20% increase in serum creatinine concentration from baseline or new-onset proteinuria, and was confirmed by allograft biopsy, according to the Banff 2013 classification [16]. Grafts were biopsied through percutaneous access under real-time ultrasound guidance. All samples were analyzed by light microscopy, immunofluorescence, and electron microscopy. Two experienced renal pathologists routinely screened C4d deposits in peritubular capillaries by peroxidase staining [17]. The diagnosis of AMR required the detection of compatible histological findings and the presence of DSA. The descriptions of graft biopsies, according to Banff 2013 classifications, were available in patients' medical records; the tissue samples were not reviewed for this study. The protocol for AMR treatment consisted of 5–7 sessions of PP, with a 48-h interval between sessions

when patients received IVIG 100 mg/kg/day. After the last PP session, the patients received IVIG over 3 to 4 days to a final total dose of 2 g/kg, with a tacrolimus trough blood level of 6–8 ng/dL and a full dose of an antiproliferative drug during treatment and follow-up, according to each patient's clinical conditions and tolerability. If allograft biopsy showed a mixed pattern, with associated cellular acute rejection, patients categorized as Banff 1A received an additional pulse of methylprednisolone 500 mg IV for 3 days, whereas those categorized as Banff 1B or higher received 6 mg/kg anti-thymocyte globulin. Treatment response in most patients was assessed by clinical evaluation, histological findings on post-treatment control graft biopsies, and DSA screening 1 month after treatment and every 3 months subsequently. Patients with persistently elevated DSA MFI or worsening of histological findings were preferentially treated with IVIG 2 g/kg. The study included a period during which this standard of care had not been fully established; thus, some patients included in the analysis did not receive the described treatment. Of these, some received only IVIG 2 g/kg, and others were treated with thymoglobulin or by adjustment of maintenance immunosuppressive therapy.

Clinical and laboratory data were retrospectively collected from patients' medical records and the Renal Transplant Program databases at the time of AMR and 6 and 12 months after treatment, using a Microsoft Excel worksheet. The primary outcomes were (a) allograft function, estimated using the study equation of the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) [18], and proteinuria, as determined by protein/creatinine ratio in urine samples; (b) the presence and mean fluorescence intensity of DSA, according to solid-phase assay detection and measurement; and (c) graft biopsy score according to the revised 2015 Banff criteria [19].

Statistical analysis

Numerical data were expressed as the mean±standard deviation, median and range, or number and percentage. Continuous variables were compared by unpaired *t*-tests and Mann-Whitney U-tests, whereas categorical variables were compared by Pearson χ^2 tests. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.0c™ for Mac (La Jolla CA, USA), with $p < 0.05$ considered statistically significant.

Results

Forty-two patients, 22 (52.4%) men and 20 (47.6%) women, of mean age 36.4 ± 12.6 years, fulfilled the inclusion criteria, with 19 (45.2%) having chronic glomerulonephritis of unknown etiology. Analysis of the pre-transplant sensitizing risk factors showed that 22 (52.4%) patients had received a previous blood transfusion and 9 (45%) of the women had previously

Table 1. General characteristics of the kidney transplant recipients who underwent treatment for biopsy-proven antibody-mediated rejection (AMR).

Transplant recipients	
Total, n	42
Age (years)	36.4±12.6
Male, n (%)	22 (52.3)
Etiology of CKD (%)	
Chronic glomerulonephritis	19 (45.2)
Unknown	12 (28.6)
Systemic arterial hypertension	4 (9.5)
Diabetes mellitus	1 (2.4)
Others	6 (14.3)
Transfusions pre transplant, n (%)	22 (52.4)
Previous transplantation, n (%)	5 (11.9)
Women with pre transplant pregnancies, n (%)	9 (45.0)
HLA ABDR Mismatches	3.9±1.1
Pre transplant Class I PRA (%)	14.6±25.2
Pre transplant Class II PRA (%)	11.1±25.2
Preformed DSA, n (%)	8 (19.0)
Preformed non-DSA, n (%)	16 (38.1)
Donors	
Deceased donors, n (%)	37 (88.1)
Age (years)	34.9±14.9
Male, n (%)	21 (50.0)
Expanded criteria donors (%)	6 (14.3)
Serum creatinine (mg/dl)	1.3±1.1
KDPI index (%)	43.1±28.8
Transplantation	
Initial immunosuppressive therapy	
Antithymocyte (%)	16 (38.1)
Antithymocyte dose (mg/kg)	5.8±1.2
IL-2 receptor (%)	22 (52.4)
Cold ischemia (hours)	21.2±6.5
DGF, n (%)	10 (23.8)
Antibody-mediated rejection	
Time post-transplant (months)	27.2 (0.3–213.0)
AMR ≤24 months, n (%)	19 (45.2)
AMR >24 months, n (%)	23 (54.8)
CNI at diagnosis, n (%)	32 (76.2)
IVIg, n (%)	38 (90.5)
PP, n (%)	26 (61.9)
Antithymocyte, n (%)	8 (19.0)
Steroid pulse therapy, n (%)	17 (40.5)

n – number; CKD – chronic kidney disease; HLA – human leukocyte antigen; PRA – panel reactive antibody; DSA – donor specific anti-HLA antibody; KDPI – kidney donor profile index; DGF – delayed graft function; AMR – antibody-mediated rejection; CNI – calcineurin inhibitor; IVIG – intravenous immunoglobulin; PP – plasmapheresis.

been pregnant. Eight (19%) patients had preformed DSA, and 16 (38.1%) had preformed non-DSA. Thirty-seven (88.1%) kidneys were from deceased donors, with a mean KDPI index of 43.1±28.8 and a mean 3.9±1.1 mismatches in HLA-A, -B, and -DR. Immunosuppressive induction therapy consisted of monoclonal anti-IL-2 receptor antibodies in 22 (52.4%) patients and anti-thymocyte globulin (mean dose, 5.8±1.2 mg/kg) in 16 (38.1%). AMR treatment consisted of IVIG in 38 (90.5%) patients and PP in 26 (61.9%) (Table 1). Thirteen patients (31.0%) received only IVIG 2 g/kg, and 3 (7.1%) were treated with thymoglobulin or adjustment of maintenance immunosuppressive therapy.

AMR was diagnosed a median 27.2 months (range 0.3 to 213 months) after transplantation. Proteinuria was observed in 36 (85.7%) patients at AMR diagnosis, with mean concentrations of 2.1±3.1 g/g at diagnosis and 1.0±0.9 g/g at the end of follow-up (Table 2). Estimated glomerular filtration rate did not change

significantly during follow-up. Eight (19.0%) patients exhibited graft failure, occurring a mean 4.6±3.2 months after AMR treatment, including 5 (62.5%) within the first 6 months. All of these patients had been treated with IVIG and PP. Two presented only with class I DSA (DSA-A 4024 to 13 356 MFI), 3 with only class II DSA (DSA-DQ 3400 to 22 327 MFI), 2 with both DSA-A (3084 to 5000 MFI) and DSA-DQ (7500 to 21 246 MFI) and 1 with both DSA-B (1582 MFI) and DSA-DQ (12 575 MFI). There were no deaths with functioning grafts during the first year.

At AMR diagnosis, 18 (42.8%) patients presented with only class II DSA, 11 (26.2%) with only class I, and 13 (31.0%) with both classes I and II. The immunodominant DSA mean fluorescence intensity (MFI) ranged from 945 to 24 883, with a class I DSA sum of 4074±5257 MFI and a class II DSA sum of 16 248±15 612 MFI (Table 2). Six months after treatment, 37 (88.1%) patients had functioning grafts, with a mean class I DSA sum of 2453±3524 MFI and a mean class II DSA sum of 19 780±15 260 MFI. Mean class I PRA decreased from 41.8±33.3% at diagnosis to 21.1±21.7% after 6 months of treatment (p=0.01), whereas class II PRA did not change significantly. The reduction of class I PRA continued throughout follow-up, reaching 16.8±17.6% at the end of the first year (p<0.05). DSA remained

Table 2. Immunopathology and kidney function at diagnosis of antibody-mediated rejection (AMR) and after treatment.

	At AMR	6 months after treatment	p*	12 months after treatment	p**
Patients with functioning graft, n (%)	42 (100.0)	37 (88.1)		35 (83.3)	
Class I PRA (%)	41.8±33.3	21.1±21.7	<0.01 [#]	16.8±17.6	<0.01 [#]
Class II PRA (%)	54.7±34.7	58.7±28.3	0.63 [#]	51.8±32.5	0.75 [#]
DSA, n (%)	42 (100.0)	21 (56.7)		18 (51.4)	
Only class I DSA	11 (26.2)	2 (9.5)	0.28 [#]	3 (16.7)	0.24 [#]
Only class II DSA	18 (42.8)	12 (57.1)	0.76 [#]	9 (50.0)	0.35 [#]
Class I and II DSA	13 (31.0)	7 (33.4)		6 (33.3)	
DSA _{SUM}	20,427±16,329	23,558±15,170	0.46 [#]	21,217±14,874	0.86 [#]
Class I DSA _{SUM}	4,074±5,257	2,453±3,524	0.19 [#]	2,009±2,249	0.13 [#]
DSA A _{SUM}	7,198±4,982	4,537±3,621	0.12 [#]	2,988±4,118	0.03 [#]
DSA B _{SUM}	5,254±2,761	1,401±1,742	0.04 [#]	1,124±1,590	0.07 [#]
Class II DSA _{SUM}	16,248±15,612	19,780±15,260	0.39 [#]	18,975±15,455	0.54 [#]
DSA DR _{SUM}	2,778±947	0±0	<0.01 [#]	0.0±0.0	<0.01 [#]
DSA DQ _{SUM}	23,520±13,597	23,386±13,471	0.97 [#]	21,287±14,658	0.60 [#]
Immunodominant DSA _{MAX}	13,588 (945.0–24,883)	19,662 (1,400–24,647)	0.29 [#]	14,968 (1,400–22,859)	0.74 [#]
Class I Non-DSA [®]	7.4±8.4	3.6±4.2	0.04 [#]	1.8±2.1	<0.01 [#]
Class II Non-DSA [®]	2.7±2.4	2.3±2.2	0.55 [#]	2.0±1.9	0.27
SCr, mg/dL	3.1±1.9	2.8±1.3	0.90 [#]	2.9±1.5	0.93 [#]
eGFR (CKD-EPI), mL/min	30.3±17.8	32.8±18.3	0.59 [#]	31.9±20.0	0.75 [#]
UPC, g/g	2.1±3.1	1.4±1.9	0.35 [#]	1.0±0.9	0.15 [#]
UPC < 0.15 g/g	6 (14.3)	7 (18.9)	0.99 [#]	7 (20.0)	0.99 [#]
Urinalysis, n (%)					
Red cells	2 (4.8)	0 (0.0)		0 (0.0)	
Leukocytes	13 (30.9)	4 (9.5)	0.20 [#]	4 (9.5)	0.20 [#]
Protein	23 (54.8)	18 (42.8)	0.88 [#]	14 (33.3)	0.42 [#]
Tacrolimus blood level (ng/mL)	5.3±3.1	5.7±1.8	0.49 [#]	5.6±1.9	0.62 [#]

AMR – acute mediated rejection; PRA – panel reactive antibody; DSA – donor specific antibody; SCr – serum creatinine; eGFR – estimated glomerular filtration rate; CKD-EPI, UPC – urine protein-to-creatinine ratio. * Compared to that presented at AMR; ** compared to that presented at AMR; [#] unpaired t-test; ^{##} Chi-square test; [®] Mann-Whitney test; ^{®®} number of Non-DSA with mean fluorescence intensity higher than 1,500.

detectable in 18 (51.4%) patients with functioning grafts at the end of follow-up; all were treated with IVIG and 11 (61.1%) with PP, and 15 (83.3%) presented with class II DSA (Table 2). DSA-A intensity decreased significantly, from 7198±4982 MFI at AMR diagnosis to 2988±4118 MFI at the end of follow-up (p=0.03), as did DSA-B intensity, from 5254±2761 MFI to

1401±1742 MFI (p=0.04). Only 3 patients were positive for detectable DSA-DR at the diagnosis of AMR, with intensities lower than 3500 MFI, but DSA-DR became undetectable 6 months after treatment. DSA-DQ intensity, which was 23 520±13 597 MFI at AMR diagnosis, was similar, at 21 287±14 658 MFI, after 12 months (p=0.60).

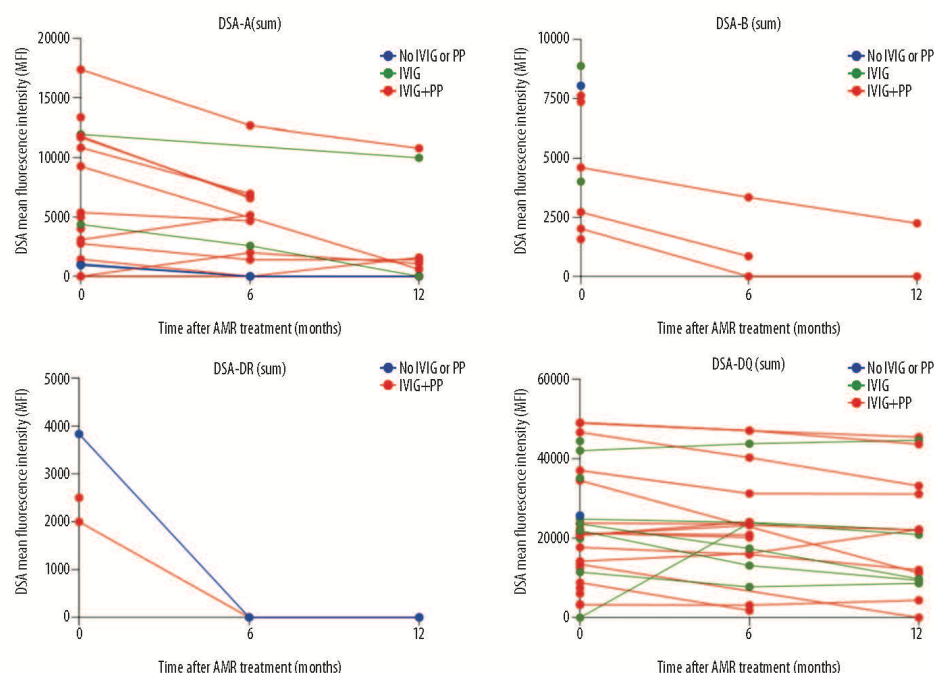


Figure 1. Dynamics of mean fluorescence intensity (MFI) of donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) after the treatment of antibody-mediated rejection (AMR) with intravenous immunoglobulin (IVIg) and/or plasmapheresis (PP).

AMR treatment resulted in a significant reduction in class I DSA (-A and -B) MFI during the first year after therapy (Figure 1). Because most (74.1%) of these patients were treated with both IVIg and PP, it was not possible to compare the effects of these 2 treatments on DSA dynamics. DSA-DR was detectable in only 3 patients with AMR, becoming undetectable after 6 months of follow-up in 2, 1 treated with IVIg and PP and 1 with an adjustment of maintenance immunosuppression. Of the 30 patients who presented with DSA-DQ at AMR diagnosis, 20 (66.7%) received IVIg and PP, 9 (30%) received IVIg alone, and 1 (3.3%) had no specific treatment. None of these patients showed significant changes in DSA MFI throughout follow-up (Figure 1).

Post-treatment graft biopsies showed significant reductions in inflammation score, from 1.0 ± 0.8 to 0.5 ± 0.6 ($p < 0.05$), and in C4d deposit score, from 2.2 ± 1.0 to 1.4 ± 1.2 ($p < 0.05$), without significant changes in other parameters (Table 3). Electron microscopy showed no changes in immune complex deposits, podocyte effacement, or glomerular basement membrane duplication when post-treatment biopsies were compared with biopsies at AMR diagnosis (Table 3). The 23 (54.8%) patients with biopsy-proven AMR more than 2 years after transplantation showed significantly higher scores for glomerular sclerosis,

tubulitis (t), peritubular capillaritis (ptc), microvascular inflammation (MVI), and C4d and interstitial fibrosis (ci) when compared with patients with AMR ≤ 2 years after transplantation ($p < 0.05$); there were no significant differences in other parameters tested. Following treatment, these patients showed reductions in inflammation, tubulitis, and C4d scores (Table 3).

Discussion

The development of an effective treatment protocol for AMR is necessary to improve graft and patient survival, but limited information is available about the immunophenotypic changes that occur after current AMR treatments. PP and immunoadsorption directly remove IgG from serum, but subsequent re-equilibration occurs between the blood and interstitium within 48 h, after which other antibody removal processes may be effective [20]. This may explain the inefficiency of some treatment protocols in the removal of DSA. According to current recommendations for AMR treatment, PP was performed in our patients with a 48-h interval between sessions to increase the efficacy of the method, as the effect of additional therapy remains unclear [6,7].

Table 3. Histopathological findings at diagnosis of antibody-mediated rejection (AMR) and after treatment.

	General			AMR ≤24 months post-Tx			AMR >24 months post-Tx		
	At AMR	After treatment	P	At AMR	After treatment	P	At AMR	After treatment	P
Number of graft biopsies, n (%)	42 (100.0)	30 (71.4)		19 (100.0)	10 (52.6)		23 (100.0)	20 (66.7)	
Time (months)	39.6±43.8*	2.4±3.0**		6.7±7.2	2.9±3.4		66.9±42.7	2.2±2.9	
Glomerular sclerosis (%)	11.0±20.7	16.4±21.9	0.29 [#]	2.8±4.8	1.8±5.5	0.60 [#]	17.8±26.0	23.8±23.5	0.44 [#]
Banff score									
i (0 to 3)	1.0±0.8	0.5±0.6	<0.01 [#]	0.8±0.7	0.7±0.7	0.22 [#]	1.3±0.9	0.6±0.6	<0.01 [#]
t (0 to 3)	1.0±0.9	0.7±0.9	0.15 [#]	0.7±0.9	1.0±1.3	0.45 [#]	1.3±0.9	0.5±0.6	<0.01 [#]
v (0 to 3)	0.1±0.4	0.0±0.0	0.16 [#]	0.2±0.6	0.0±0.0	0.36 [#]	0.1±0.3	0.0±0.0	0.32 [#]
g (0 to 3)	1.1±0.8	0.8±1.0	0.25 [#]	0.8±0.8	0.4±0.5	0.16 [#]	1.3±0.8	1.0±1.2	0.38 [#]
ptc (0 to 3)	1.6±1.0	1.3±0.9	0.15 [#]	1.2±1.2	1.1±1.1	0.81 [#]	1.9±0.7	1.3±0.9	0.02 [#]
MVI g + ptc (0 to 6)	2.6±1.7	2.0±1.8	0.18 [#]	1.9±1.8	1.4±1.2	0.39 [#]	3.2±1.4	2.4±1.9	0.13 [#]
C4d (0 to 3)	2.2±1.0	1.4±1.2	<0.01 [#]	1.8±1.2	1.0±1.0	0.12 [#]	2.5±0.8	1.5±1.3	<0.01 [#]
ci (0 to 3)	1.0±0.9	1.4±1.0	0.17 [#]	0.6±0.7	1.2±0.9	0.07 [#]	1.4±0.8	1.4±1.0	0.94 [#]
ct (0 to 3)	1.2±0.9	1.5±0.9	0.10 [#]	0.8±0.8	1.5±0.7	0.03 [#]	1.5±0.8	1.5±0.9	0.93 [#]
Electron microscopy, n (%)									
IC deposits	7 (16.7)	2 (6.2)	0.76 [#] 3(15.8)	1 (10.0)	0.99 [#]		4 (17.4)	2 (10.0)	0.97 [#]
Podocyte effacement	10 (23.8)	3 (9.4)	0.62 [#] 4(21.0)	2 (20.0)	>0.99 [#]		6 (26.1)	3 (15.0)	0.93 [#]
GBM duplication	7 (16.7)	3 (9.4)	0.93 [#] 2(10.5)	1 (10.0)	>0.99 [#]		5 (21.7)	5 (25.0)	0.99 [#]

AMR – antibody-mediated rejection; i – inflammation; t – tubulitis; v – intimal arteritis; g – glomerulitis; ptc – peritubular capillaritis; MVI – microvascular inflammation; ci – interstitial fibrosis; ct – tubular atrophy; IC – immune complex; GBM – glomerular basement membrane. * Time post-transplant; ** time post-AMR treatment; [#] unpaired t-test; ^{##} Chi-square test.

Another option for AMR treatment is IVIG, possibly due to its ability to neutralize DSAs and inhibit the binding of DSA to target cells in about 80% of patients [1]. The IVIG molecules prevent complement binding or activation, leading to suppression of DSA production [21]. IVIG also inhibits mixed lymphocyte reactions and induces apoptosis, mainly in B cells, reducing the numbers of B cells and monocytes, as well as reducing CD19, CD20, and CD49 expression by B cells, thereby modulating B cell signaling [1]. Multiple retrospective studies have reported the use of IVIG in kidney transplant recipients with AMR, with daily doses ranging from 100–500 mg/kg until response, to a maximum of 2 g/kg, whether administered as a single dose or over several days [2]. Reactions to IVIG can occur within 30 min after the beginning of infusion, and mild reactions are often well managed by reducing the infusion rate [2]. Thrombosis, hemolytic anemia, renal failure, and septic meningitis are possible adverse events of IVIG [2]. In the present study, 2 patients experienced self-limiting headaches during IVIG infusion, with no severe adverse events at follow-up.

Although agents directly inhibiting B cell immunity, including rituximab and IVIG, are frequently used to treat AMR, there is limited information on their effectiveness in reversing allograft injury, in reducing DSA generation, and in predicting graft survival [22].

In this series, graft survival was >80% during the first year after AMR diagnosis. No patient with a functioning graft died during this period, and none had severe infection episodes requiring hospitalization after treatment. AMR treatment significantly reduced the MFIs of class I DSAs, without changing DSA-DQ MFI. This finding showed that treatment was ineffective in reducing the MFI of antibodies in patients with AMR related to DSA-DQ, highlighting the need to develop more effective adjunctive therapies for these patients. Treatment also significantly reduced tissue inflammation and C4d scores. The clearance of C4d from the tissue often occurred after the end of antibody response. Moreover, C4d is frequently lost as early as 8 days after treatment [1], similar to our findings. There

was no significant change in MVI, measured as the sum of glomerulitis and peritubular capillaritis scores, possibly due to the small sample size and the short follow-up. MVI scores in most of our patients indicated mild to moderate involvement, which may have influenced the response of these parameters to treatment.

AMR was generally more severe 2 years than 1 year after kidney transplantation. The greater severity at 2 years may have been due to the protective effect of immunosuppression on graft inflammation at early diagnosis of AMR. Also, although we did not identify patients with poor adherence to treatment, this possibility cannot be totally excluded, especially in patients later diagnosed with AMR. Treatment was effective in reducing inflammation, tubulitis, and C4d scores in patients with more severe AMR. Despite the absence of cg scores on light microscopy, only 16.7% of our patients with AMR presented with glomerular basement membrane (GBM) duplication on electron microscopy.

Limitations of this study included the lack of protocol biopsy to identify patients with subclinical AMR and the absence of a control biopsy in all treated patients. This study, however, provides important clinical, laboratory, and histological information about the impact of AMR treatment. Another limitation

of this study was the absence of additional treatment with rituximab, as this agent has been associated with better outcomes in previous studies.

Conclusions

AMR treatment with IVIG and PP resulted in a significant reduction of class I DSA MFI, without significantly changing DSA-DQ MFI, during the first year of follow-up. The graft biopsies performed after AMR treatment showed significant reductions in inflammation and C4d scores, without improving microvascular inflammation. Treatment did not significantly impair estimated glomerular filtration rate or proteinuria.

Acknowledgments

The authors would like to thank Leandro Luiz Lopes de Freitas, who evaluated the graft biopsies and discussed the histological findings.

Conflict of interest

None.

References:

- Colvin RB, Smith RN: Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol*, 2005; 5(10): 807–17
- Kim M, Martin ST, Townsend KR, Gabardi S: Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: A review of pathophysiology, diagnosis, and treatment options. *Pharmacotherapy*, 2014; 34(7): 733–44
- Loupy A, Lefaucheur C: Antibody-mediated rejection of solid-organ allografts. *N Engl J Med*, 2018; 379(12): 1150–60
- Bartel G, Schwaiger E, Böhmig GA: Prevention and treatment of alloantibody-mediated kidney transplant rejection. *Transpl Int*, 2011; 24(12): 1142–55
- Cooper JE: Evaluation and treatment of acute rejection in kidney allografts. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2020; 15(3): 430–38
- Nickerson PW: What have we learned about how to prevent and treat antibody-mediated rejection in kidney transplantation? *Am J Transplant*, 2020; 20(Suppl. 4): 12–22
- Schinstock CA, Mannon RB, Budde K et al: Recommended treatment for antibody-mediated rejection after kidney transplantation: The 2019 expert consensus from the Transplantation Society Working Group. *Transplantation*, 2020; 104(5): 911–22
- Lefaucheur C, Nochy D, Andrade J et al: Comparison of combination plasmapheresis/IVig/anti-CD20 versus high-dose IVig in the treatment of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*, 2009; 9(5): 1099–107
- Webster AC, Wu S, Tallapragada K et al: Polyclonal and monoclonal antibodies for treating acute rejection episodes in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017; 7(7): CD004756
- Bailey E, Ville S, Blanco G et al: An extension of the RITUX-ERAH study, multicenter randomized clinical trial comparing rituximab to placebo in acute antibody-mediated rejection after renal transplantation. *Transpl Int*, 2020; 33(7): 786–95
- Böhmig GA, Eskandary F, Doberer K, Halloran PF: The therapeutic challenge of late antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transpl Int*, 2019; 32(8): 775–88
- Moreso F, Crespo M, Ruiz JC et al: Treatment of chronic antibody mediated rejection with intravenous immunoglobulins and rituximab: A multicenter, prospective, randomized, double-blind clinical trial. *Am J Transplant*, 2018; 18(4): 927–35
- de Sousa MV, Gonçalves AC, de Lima Zollner R, Mazzali M: Effect of preformed or *de novo* anti-HLA antibodies on function and graft survival in kidney transplant recipients. *Ann Transplant*, 2018; 23: 457–66
- de Sousa MV, de Lima Zollner R, Mazzali M: Renal transplant patients with preformed anti-HLA antibodies: Early biopsy findings and clinical outcomes. *Braz J Nephrol*, 2020; 42(2): 201–10
- Metzger RA, Delmonico FL, Feng S et al: Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Am J Transplant*, 2003; 3(Suppl. 4): 114–25
- Haas M, Sis B, Racusen LC et al: Banff 2013 meeting report: Inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant*, 2014; 14(2): 272–83
- Sampaio WL, Mazzali M: C4d deposits in borderline rejection: An early marker for chronic renal dysfunction? *Transplant Proc*, 2014; 46(6): 1710–12
- Levey AS, Stevens LA, Schmid CH et al: A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*, 2009; 150(9): 604–12
- Loupy A, Haas M, Solez K et al: The Banff 2015 kidney meeting report: Current challenges in rejection classification and prospects for adopting molecular pathology. *Am J Transplant*, 2017; 17(1): 28–41
- Montgomery RA, Loupy A, Segev DL: Antibody-mediated rejection: New approaches in prevention and management. *Am J Transplant*, 2018; 18(Suppl. 3): 3–17
- Zhang R: Donor-specific antibodies in kidney transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2018; 13(1): 182–92
- Parajuli S, Mandelbrot DA, Muth B et al: Rituximab and monitoring strategies for late antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *Transplant Direct*, 2017; 3(12): e227

9.5: Publicação do relato de caso de RMA após vacinação e infecção por febre amarela: *Yellow Fever Disease in a Renal Transplant Recipient: Case Report and Literature Review*

Received: 6 February 2019 | Revised: 16 July 2019 | Accepted: 21 July 2019

DOI: 10.1111/tid.13151

CASE REPORT

WILEY

Yellow fever disease in a renal transplant recipient: Case report and literature review

Marcos Vinicius de Sousa^{1,2}  | Ricardo de Lima Zollner^{1,2} | Raquel Silveira Bello Stucchi³ | Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin⁴ | Elaine Cristina de Ataíde⁴ | Marilda Mazzali^{1,2}

¹Renal Transplant Research Laboratory, Renal Transplant Unit, Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

²Laboratory of Translational Immunology, Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

³Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

⁴Liver Transplant Unit, Surgery Department, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

Correspondence

Marcos Vinicius de Sousa, Renal Transplant Research Laboratory, Renal Transplant Unit, Division of Nephrology, School of Medical Sciences, University of Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil.
Email: marcosnefro@gmail.com

Abstract

Yellow fever (YF) is a viral disease, with clinical presentation among immunosuppressed patients not fully understood. YF vaccination (YFV), a live vaccine, is contraindicated in patients receiving immunosuppressive treatment due to the risk of developing the disease after vaccination. We report a case of a 50-year-old male recipient who presented wild-type YF five years after a deceased donor kidney transplant. He lived in a YF endemic area and inadvertently received YFV. One day after YFV, the patient presented nausea, vomiting, fever, diarrhea, polyarthralgia, thrombocytopenia, and increased levels of liver function enzymes. The serological test was compatible with YF disease, and quantitative viral load confirmed the diagnosis of wild-type YF. The patient received supportive care for twelve days, with hospital discharge in good clinical condition and stable renal function. One month after discharge, the patient developed de novo donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) and histological evidence of endothelial lesion, with a diagnosis of acute antibody-mediated rejection (AMR), treated with plasmapheresis and human IVIg therapy. Six months after therapy, he presented normal renal function with a reduction of DSA MFI. In the reported case, we observed a clinical wild-type YF diagnosed even after YF vaccine administration, with good clinical outcome. De novo DSA and AMR occurred after the recovering of disease, with an adequate response to therapy and preserved allograft function. We reviewed the published literature on YF and YFV in solid organ transplantation.

KEYWORDS

antibody-producing cells, arbovirus infections, graft rejection, HLA antigens, immunosuppression, plasmapheresis

1 | BACKGROUND

Yellow fever (YF) is a mosquito-borne RNA virus that causes an acute infection, with clinical manifestations ranging from mild non-specific illness to severe hemorrhagic disease.¹ The wild transmission occurs between non-human primates and sylvan mosquitoes,

while the urban cycle involves the transmission of the virus from urban mosquitoes, predominantly *Aedes aegypti*, and humans.¹ The last report of the urban cycle of YF in Brazil was in 1942, and all confirmed cases since that period resulted from wild cycle transmission. Between December 2016 and February 2017 occurred an outbreak of YF in Brazil, with 1345 suspected cases, in which 295

confirmed cases and 215 deaths.¹ According to Epidemiological Update—Yellow Fever (Pan American Health Organization/World Health Organization), there was an increase in YF confirmed cases in Brazil during the first four weeks of 2018, and in the states of Sao Paulo and Rio de Janeiro, YF reports significantly exceed numbers from preceding season (2016/2017).

Yellow fever vaccine (YFV) produces a high level of protection, with seroconversion rates exceeding 95% within 30 days and protection lasting over 10 years.² Incidence of severe side effects in the general population ranges from 0.2 to 0.4 cases in 100 000 doses of vaccine, including neurotropic and acute viscerotropic reactions.³ Live vaccines such as YF are contraindicated in patients receiving immunosuppressive treatment and should be administered during the pre-transplant period.⁴ Recipients of solid organ transplants suffer more severe or rapid progression of infectious diseases, and their reaction to immunization is not as effective as in healthy controls,⁴ since it is reported that they have less YF-neutralizing antibodies in the long term.⁵ There are limited published data on long term outcomes of YF disease in solid organ transplant recipients.

2 | CASE PRESENTATION

2.1 | Past medical history

A 50-year-old man, resident of a rural zone in Atibaia, Sao Paulo—Brazil, area of YF outbreak in 2018, with chronic renal disease of unknown etiology, treated with hemodialysis for two years, received a deceased kidney transplant 5 years ago. The pre-transplant panel reactive antibody (PRA) was 6% class I, zero class II, and negative for donor-specific anti-HLA antibodies (DSA). The patient denied previous blood transfusion. His donor was a deceased 24-year-old male, encephalic death due to head trauma, with acute kidney injury (serum creatinine 194.5 $\mu\text{mol/L}$ at donation) without histological abnormalities in the preimplantation kidney graft biopsy. HLA compatibility showed only one match in HLA-B. Induction immunosuppressive therapy included basiliximab, tacrolimus, sodium mycophenolate and steroids, and immunosuppressive maintenance regimen contained tacrolimus, sodium mycophenolate, and steroids. Delayed graft function was observed, with the need for four hemodialysis sessions. Hospital discharge was on the 15th day after transplant, with a serum creatinine of 282.9 $\mu\text{mol/L}$ and urine output of 3.4 ml/kg/h. The trough level of tacrolimus was 5–8 ng/mL during the first 5 years after transplant. Anti-HLA antibody screening and graft biopsy were not performed during follow-up, because of a stable allograft renal function (serum creatinine of 79.6 $\mu\text{mol/L}$). Despite the recommendation to not receive YFV after transplantation, the patient received a YFV fractional dose (0.1 mL, one-fifth of the standard dose containing the minimum of 1000 UI of attenuated viruses substrain 17 DD or the equivalent dose in plaque-forming unit—PFU, growth in chicken embryo) in a vaccination campaign during an outbreak of YF in his residence area.

2.2 | Diagnosis and clinical course of the present disease

The patient presented to the emergency unit with nausea, vomiting, fever of 100.4°F, diarrhea without mucus or blood, and non-migratory polyarthralgia of large joints one day after receiving YF vaccination. He denied jaundice, rash, petechiae, bleeding, or even urinary, respiratory, digestive, or circulatory symptoms. On physical examination, he presented normal blood pressure and respiratory rate, anicteric, afebrile, absence of lymphadenopathy, normal oroscopy, absence of respiratory or cardiovascular alterations, and a painless palpable liver at 4 cm from the right costal border.

On admission, the patient presented normal renal function (serum creatinine 101.7 $\mu\text{mol/L}$), tacrolimus blood level of 6.7 ng/mL, high aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels (8941 U/L and 3893 U/L, respectively), creatinine phosphokinase level of 359 U/L, total bilirubin of 26.5 $\mu\text{mol/L}$, thrombocytopenia (54 000/mm),³ and normal blood coagulation test (prothrombin time of 17.2 seconds, international normalized ratio of 1.48, partial thromboplastin time of 36.6 seconds, and ratio of 1.27). The patient received intensive care, with hydration, antibiotic therapy (ampicillin with sulbactam and fluconazole), and interruption of the immunosuppressive drugs (tacrolimus and sodium mycophenolate). Serology for viral hepatitis, dengue, leptospirosis, and NS1 dengue antigen was negative. Serological test was compatible with YF disease, and the quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) confirmed the diagnosis of wild-type yellow fever, but the vaccine strain virus was not identified in these samples. No serial RT-PCR was performed during the follow-up. Ultrasound elastography revealed portal fibrosis without septa (F1 on the METAVIR score system). The patient remained under supportive care for twelve days, without blood transfusion during hospitalization, and with hospital discharge in good clinical condition and stable renal function (serum creatinine 85.7 $\mu\text{mol/L}$). Immunosuppressive therapy was restarted at discharge, with re-introduction of sodium mycophenolate at a progressive dose and subsequent re-introduction of tacrolimus.

During routine follow-up, 1 month after hospital discharge, presence of de novo DSA was detected, with higher mean intensity of fluorescence (MFI) value of 24 883 and sum of all DSA MFI values of 56 686 (anti-HLA-A 36:7627 MFI; anti-HLA-DQB1 2:24 176 MFI; and anti-HLA-DQB1 03(7): 24 883 MFI). Renal allograft biopsy revealed mild glomerulitis, peritubular capillaritis, and tubulitis (Banff score g1, ptc1, t1), without other histopathological changes at light microscopy. Deposits of C4d occurred in more than 50% of the peritubular capillaries, and electron microscopy showed a focal thickening of the glomerular basement membrane, compatible with the diagnosis of subclinical antibody-mediated rejection (AMR). The treatment for the AMR was five sessions of plasmapheresis followed by venous infusion of human immunoglobulin (IVIg), in the total dose of 2 g/kg of body weight. Renal function remained stable throughout the follow-up (serum creatinine 93.7 $\mu\text{mol/L}$), with normal urinalysis. Post-treatment graft biopsy showed absence of glomerulitis or peritubular capillaritis, with maintenance of mild tubulitis (Banff

score g0, ptc0, t1), and serological reduction of class I and II antibodies MFI one month after the treatment (DSA sum of 50,926 MFI [anti-HLA-A36: 4,135 MFI; anti-HLA-DQB1 2:24,485 MFI; and anti-HLA-DQB1 03(7): 22,306 MFI]). Six months after the end of AMR treatment, renal function remained stable (serum creatinine 79.6 μ mol/L), without proteinuria, immunosuppression with tacrolimus and sodium mycophenolate with a persistent reduction of class I antibodies MFI (anti-HLA-A 36:1998 MFI) and maintenance of class II antibodies MFI (anti-DQ 2:24 647 MFI and anti-DQ 7:22 432 MFI).

3 | DISCUSSION

We presented a case of a benign course yellow fever disease in a renal transplant recipient with a quite low risk of rejection, characterized by the absence of anti-HLA antibodies, appropriate adherence to immunosuppressive treatment, normal graft function and free of infectious diseases within the first 5 years of transplant. There is a lack of reports on the clinical course of YF in immunocompromised patients, although reports on other most studied arboviruses such as dengue and Chikungunya suggest that the immunological status of transplant recipients may interfere in the clinical course of the disease.⁶ In our transplant center, YFV is contraindicated for transplant recipients, according to recommendations of Centers for Disease Control and Prevention (CDC)⁷ and Brazil's Ministry of Health⁸; however, due to YF outbreak in the area, the patient was inadvertently vaccinated against yellow fever, without presenting vaccination-related side effects, but developing wild-type yellow fever disease 1 day after vaccination. After the recovery of yellow fever disease, a subclinical acute antibody-mediated rejection was identified, possibly due to immunosuppressive therapy withdrawal during disease. Likewise, the YF vaccine and YF disease might have affected the immune system.^{9,10}

In order to identify association between yellow fever and transplant, we performed a literature review through a PubMed search using the terms "yellow fever," "yellow fever vaccination,"

"transplantation," "transplant," "solid organ transplantation," "solid organ transplant," "kidney transplantation," and "renal transplant." The search terms were used in combination to search databases. We selected studies with cases of yellow fever disease and yellow fever vaccination after solid organ transplantation. The literature search returned twenty-four studies that met our criteria. Information from each record was extracted on year of publication, study design, number of solid organ transplant recipients, number of cases of post-transplant yellow fever vaccination, number of post-transplant yellow fever, number of cases of infection through vaccine strain, presence of local or systemic adverse severe events, and number of deaths due to yellow fever. Table 1 summarizes the reported cases.¹¹⁻¹⁴

As part of the response to the YF outbreak in Brazil during January 2018, federal and state authorities conducted mass vaccination campaigns to immunize residents of infected areas, when our patient received the YFV. The YFV immunogenicity is unknown, but there is potential risk for the development of the disease by the vaccine viral strain.¹⁵ Despite this, some solid organ transplant recipients received YFV inadvertently without occurrence of severe side effects.^{11,14,15} In cases of patients using only one immunosuppressive agent and with inevitably travel to an endemic YF area at least twice a year, there is a weak evidence recommendation to consider YFV after careful evaluation, informed consent of the patient, and reduction or discontinuation of immunosuppressive therapy.¹⁶

Wild-type YF virus is primarily viscerotropic, with a broad spectrum of clinical severity.¹⁷ The liver is the most affected organ, with apoptosis probably induced by transforming growth beta (TGF-beta) in severe YF.¹⁷ The clinical outcome of YF appears to correlate with the degree of liver damage, and renal failure is also considered a hallmark of severe and fatal YF.¹⁷ Clinical severity of YF seems to be related to the virus strain virulence and to host factors such as prior immunity.¹⁷ Previous studies in the general populations have shown association between high concentration of transaminases, bilirubin, blood urea nitrogen, serum level

TABLE 1 Cases of yellow fever vaccination (YFV) after transplantation and cases of wild-type yellow fever and vaccine strain yellow fever

	Study design	YFV	YF ^a	Wild-type YF	Vaccine YF	SAEs	Death ^b	Rejection
Present report	Case report	1	1	1	no	no	no	AMR
Azevedo LS et al ¹¹	Retrospective survey	19	no	no	no	no	no	n/a
Slifka MK et al ¹²	Case report	1	no	no	no	no	no	n/a
Wieten RW et al ¹³	Retrospective cohort	1	no	no	no	no	no	n/a
Croce E et al ¹⁴	Systematic review	20	no	no	no	no	no	no
Pierroti LC et al ²⁵	Case report	1	1	1	no	no	1	n/a

Abbreviations: AMR, antibody-mediated rejection; n/a, not available; SAEs, serious adverse events; YF, yellow fever; YFV, yellow fever vaccination.

^aGeneral cases of YF (wild-type or vaccine-associated disease).

^bDeath due to yellow fever disease.

of lipase, and factor V as risk factors for death.¹⁸⁻²⁰ The behavior of YF and other arbovirus infections in solid organ transplant recipients remains not fully understood.⁶

Previous reports showed a lower frequency of classic symptoms and a higher incidence of severe disease and mortality among dengue-infected solid organ transplant recipients,²¹ without infection-related graft rejection.⁶ Little is known about the natural history of Zika virus infection in organ recipients, with some fatal cases reported.^{6,22,23} Chikungunya infection otherwise was associated with a benign course in solid organ transplant recipients, without chronic recurrent arthritis, possibly due to the effect of immunosuppressive drugs.²⁴ YF has been considered the most severe disease, with a high mortality rate. Pierroti et al²⁵ reported a fatal case of wild-type YF in a kidney transplant recipient during the YF outbreak in southeastern Brazil. Our patient developed wild-type YF disease, presented with jaundice and acute renal failure, without hemorrhagic phenomena and with a total recovery after twelve days of hospitalization. Our patient received YFV in the day before hospitalization. Yellow fever 17D vaccine provokes a rapid and robust innate immune response, preceding the adaptive response, including NK-cells, interferon and multiple interferon-stimulated genes, and the complement system,¹⁷ and its effect could not be excluded in the present case. Immunity toward wild-type infections is based on cases of severe disease. However, the immune response in less severe disease with clinical recovery, as in our case, remains uncertain. Experimental and epidemiological data support the hypothesis that antibodies to heterotypic flaviviruses, particularly dengue, may protect against YF by reducing the virus titers in the blood, under the threshold for infection of mosquito vectors.¹⁷ Therefore, there were no studies on the possible influence of those infections in the clinical course of YF. Furthermore, it is not possible to rule out the effect of immunosuppressive therapy and immunosuppression withdrawn during YF disease in our case, as interruption of tacrolimus and mycophenolate could restore cellular response against viral infection.

It is possible that the cytokine profile stimulated by viral infection promoted the recovery of the YF disease, but also contributed to the development of rejection afterward. In the reported case, the temporary reduction in immunosuppressive therapy during YF disease remains as the leading risk factor for the development of anti-HLA antibodies, resulting in the subclinical AMR.

4 | CONCLUSION

The clinical course of YF disease in immunosuppressed patients is not fully understood. In the present case, we observed wild-type yellow fever disease, with benign clinical outcome. De novo DSA and AMR were observed after the recovering of disease, which can be attributed both to temporary immunosuppressive therapy withdrawal or to viral disease, with an adequate response to therapy, and preserved allograft function.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Carla Feitosa do Valle, Leonardo Figueiredo Camargo, Gabriel Giollo Rivelli, Rodrigo Dias de Meira, and Rodrigo Nogueira Angerami, who helped to patient's care during hospitalization for YF and AMR therapy, and Leandro Cesar Mendes, who performed liver elastography ultrasound.

CONFLICT OF INTEREST

Authors have no conflict of interest to declare.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Marcos Vinicius de Sousa collected data from the medical record and kidney transplant program database, performed literature review and wrote the paper. Ricardo de Lima Zollner, Raquel Silveira Bello Stucchi, Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin, Elaine Cristina de Ataíde and Marilda Mazzali discussed data and reviewed the manuscript.

ORCID

Marcos Vinicius Sousa  <https://orcid.org/0000-0002-0280-1069>

REFERENCES

- Goldani LZ. Yellow fever outbreak in Brazil, 2017. *Brazilian J Infect Dis*. 2017;21(2):123-124.
- Sicre de Fontbrune F, Arnaud C, Cheminant M, et al. Immunogenicity and safety of yellow fever vaccine in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients after withdrawal of immunosuppressive therapy. *J Infect Dis*. 2018;217(3):494-497.
- Saúde BMDSSdAa. Febre amarela: guia para profissionais de saúde TT - Yellow fever: a guide for health professionals. 2017;59.
- Löbermann M, Boršo D, Hilgendorf I, Fritzsche C, Zettl UK, Reisinger EC. Immunization in the adult immunocompromised host. *Autoimmun Rev*. 2012;11(3):212-218.
- Wyposz B, Burdet C, François H, et al. Persistence of yellow fever vaccine-induced antibodies after solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13(9):2458-2461.
- Moura-Neto JA, Braga Silva CA, Moura AF, Rocco Suassuna JH. Emergent arboviruses and renal transplantation: a global challenge. *Kidney Int Reports*. 2019;4(5):647-655.
- Staples JE, Gershman M, Fischer M, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Yellow fever vaccine: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2010;59(RR-7):1-27.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde D de V das DT. Manual De Normas E Procedimentos Para Vacinação. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
- Watson A, Klimstra W. T cell-mediated immunity towards yellow fever virus and useful animal models. *Viruses*. 2017;9(4):77.
- Mulley WR, Dendle C, Ling J, Knight SR. Does vaccination in solid-organ transplant recipients result in adverse immunologic sequelae? A systematic review and meta-analysis. *J Hear Lung Transplant*. 2018;37(7):844-852.
- Azevedo LS, Lasmar EP, Contieri F, et al. Yellow fever vaccination in organ transplanted patients: is it safe? A multicenter study. *Transpl Infect Dis*. 2012;14(3):237-241.

12. Slifka MK, Hammarlund E, Lewis MW, et al. Antiviral immune response after live yellow fever vaccination of a kidney transplant recipient treated with IVIG. *Transplant J*. 2013;95(9):e59-e61.
13. Wieten RW, Goorhuis A, Jonker E, et al. 17D yellow fever vaccine elicits comparable long-term immune responses in healthy individuals and immune-compromised patients. *J Infect*. 2016;72(6):713-722.
14. Croce E, Hatz C, Jonker EF, Visser LG, Jaeger VK, Bühler S. Safety of live vaccinations on immunosuppressive therapy in patients with immune-mediated inflammatory diseases, solid organ transplantation or after bone-marrow transplantation – A systematic review of randomized trials, observational studies and case re. *Vaccine*. 2017;35(9):1216-1226.
15. Stucchi R, Lopes MH, Kumar D, Manuel O. Vaccine recommendations for solid-organ transplant recipients and donors. *Transplantation*. 2018;102:S72-S80.
16. de Jong W, de Man RA, Dalm VASH, Reusken CBEM, Goeijenbier M, van Gorp ECM. Yellow fever vaccination for immunocompromised travellers: unjustified vaccination hesitancy? *J Travel Med*. 2019; [Epub ahead of print].
17. Monath TP, Vasconcelos P. Yellow fever. *J Clin Virol*. 2015;64:160-173.
18. de Souza Pereira BB, Darrigo Junior LG, de Mello Costa TC, et al. Prolonged viremia in dengue virus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients and patients with hematological malignancies. *Transpl Infect Dis*. 2017;19(4):e12721.
19. Wilder-Smith A, Chen LH, Melo A, Visser LG. Improving clinical management of patients with severe yellow fever. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(7):678-679.
20. Casadio LVB, Salles APM, Malta FDM, et al. Lipase and factor V (but not viral load) are prognostic factors for the evolution of severe yellow fever cases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019;114(0):e190033.
21. Weerakkody RM, Patrick JA, Sheriff M. Dengue fever in renal transplant patients: a systematic review of literature. *BMC Nephrol*. 2017;18(1):15.
22. Schwartzmann PV, Ramalho LNZ, Neder L, et al. Zika Virus Meningoencephalitis in an Immunocompromised Patient. *Mayo Clin Proc*. 2017;92(3):460-466.
23. Nogueira ML, Estofete CF, Terzian ACB, et al. Zika virus infection and solid organ transplantation: a new challenge. *Am J Transplant*. 2017;17(3):791-795.
24. Rosso F, Rodríguez S, Cedano JA, Mora BL, Moncada PA, Velez JD. Chikungunya in solid organ transplant recipients, a case series and literature review. *Transpl Infect Dis*. 2018;20(6):e12978.
25. Pierrotti LC, Duarte-Neto AN, Song A, Ventura CG, David-Neto E, Azevedo LS. Fatal yellow fever in a kidney transplant patient. *Clin Infect Dis*. 2019; [Epub ahead of print].

How to cite this article: de Sousa MV, Zollner RDL, Stucchi RSB, Boin IDFSF, de Ataíde EC, Mazzali M. Yellow fever disease in a renal transplant recipient: Case report and literature review. *Transpl Infect Dis*. 2019;e13151. <https://doi.org/10.1111/tid.13151>

9.6: Autorização para uso do Artigo científico: *Yellow Fever Disease in a Renal Transplant Recipient: Case Report and Literature Review* – John Wiley & Sons – Transplantation Society – Transplant Infectious Disease: an official journal of the Transplantation Society



Marketplace™

John Wiley & Sons - Books - License Terms and Conditions

This is a License Agreement between Marcos Vinicius de Sousa ("You") and John Wiley & Sons - Books ("Publisher") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by John Wiley & Sons - Books, and the CCC terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC.

Order Date	02-Mar-2021	Type of Use	Educational/Instructional Program
Order license ID	1101184-1	Publisher	BLACKWELL
ISSN	1398-2273	Portion	MUNKSGAARD Chapter/article

LICENSED CONTENT

Publication Title	Transplant infectious disease : an official Journal of the Transplantation Society	Country	Denmark
Article Title	Yellow fever disease in a renal transplant recipient: Case report and literature review.	Rights holder	John Wiley & Sons - Books
Author/Editor	TRANSPLANTATION SOCIETY	Publication Type	Journal
Date	01/01/1999	Issue	5
Language	English	Volume	21

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Distribution	Other territories and/or countries
Page range(s)	1-5	Enter territories/countries	Brazil
Total number of pages	5	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Print, Electronic, Electronic-Secure	Copies for the disabled?	No
Who will republish the content?	Academic institution	Minor editing privileges?	No
Duration of Use	Life of current and all future editions	Incidental promotional use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	USD
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

Produced by	Marcos Vinicius de Sousa - University of Campinas - PhD program
-------------	---

Title	Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: determinants of clinical and histological presentations, response to treatment and prognosis	Expected publication date	2021-04-14
Author	Marcos Vinicius de Sousa		

ADDITIONAL DETAILS

Order reference number	N/A	The requesting person / organization to appear on the license	Marcos Vinicius de Sousa
------------------------	-----	---	--------------------------

REUSE CONTENT DETAILS

Title, description or numeric reference of the portion(s)	Yellow fever disease in a renal transplant recipient: Case report and literature review.	Title of the article/chapter the portion is from	Yellow fever disease in a renal transplant recipient: Case report and literature review.
Editor of portion(s)	Mazzali, Marilda; de Ataíde, Elaine Cristina; de Fátima Santana Ferreira Boin, Ilka; Stucchi, Raquel Silveira Bello; de Lima Zollner, Ricardo; de Sousa, Marcos Vinicius	Author of portion(s)	Mazzali, Marilda; de Ataíde, Elaine Cristina; de Fátima Santana Ferreira Boin, Ilka; Stucchi, Raquel Silveira Bello; de Lima Zollner, Ricardo; de Sousa, Marcos Vinicius
Volume of serial or monograph	21	Issue, if republishing an article from a serial	5
Page or page range of portion	1-5	Publication date of portion	2019-07-25

PUBLISHER TERMS AND CONDITIONS

No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto. You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley material. This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process. In no instance may the total amount of Wiley Materials used in any Main Product, Compilation or Collective work comprise more than 5% (if figures/tables) or 15% (if full articles/chapters) of the (entirety of the) Main Product, Compilation or Collective Work. Some titles may be available under an Open Access license. It is the Licensors' responsibility to identify the type of Open Access license on which the requested material was published, and comply fully with the terms of that license for the type of use specified. Further details can be found on Wiley Online Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/Id-410895.html>.

CCC Reproduction Terms and Conditions

1. Description of Service; Defined Terms. This Reproduction License enables the User to obtain licenses for reproduction of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Reproduction", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such reproduction.
2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a

particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a republication license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User republishes the Work in any fashion.

3. Scope of License; Limitations and Obligations.

- 3.1. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.
- 3.2. General Payment Terms: You may pay by credit card or through an account with us payable at the end of the month. If you and we agree that you may establish a standing account with CCC, then the following terms apply: Remit Payment to: Copyright Clearance Center, 29118 Network Place, Chicago, IL 60673-1291. Payments Due: Invoices are payable upon their delivery to you (or upon our notice to you that they are available to you for downloading). After 30 days, outstanding amounts will be subject to a service charge of 1-1/2% per month or, if less, the maximum rate allowed by applicable law. Unless otherwise specifically set forth in the Order Confirmation or in a separate written agreement signed by CCC, invoices are due and payable on "net 30" terms. While User may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the Order Confirmation, the license is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if complete payment for the license is not received on a timely basis either from User directly or through a payment agent, such as a credit card company.
- 3.3. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) is "one-time" (including the editions and product family specified in the license), (ii) is non-exclusive and non-transferable and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Order Confirmation or invoice and/or in these terms and conditions. Upon completion of the licensed use, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work (except for copies printed on paper in accordance with this license and still in User's stock at the end of such period).
- 3.4. In the event that the material for which a republication license is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) which are identified in such material as having been used by permission, User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service or otherwise) for, any of such third party materials; without a separate license, such third party materials may not be used.
- 3.5. Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any license granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Republished with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc." Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote but not as a separate electronic link) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.
- 3.6. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third

parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

4. Indemnity. User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy or other tangible or intangible property.
5. Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for this license. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors and assigns.
6. Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS". CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.
7. Effect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the license set forth in the Order Confirmation and/or these terms and conditions, shall be a material breach of the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions. Any breach not cured within 30 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such license without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.
8. Miscellaneous.
 - 8.1. User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to these terms and conditions, and CCC reserves the right to send notice to the User by electronic mail or otherwise for the purposes of notifying User of such changes or additions; provided that any such changes or additions shall not apply to permissions already secured and paid for.
 - 8.2. Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online here: <https://marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/privacy-policy>
 - 8.3. The licensing transaction described in the Order Confirmation is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions or any rights granted hereunder; provided, however, that User may assign such license in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in the new material which includes the Work(s) licensed under this Service.

- 8.4. No amendment or waiver of any terms is binding unless set forth in writing and signed by the parties. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the licensing transaction described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any terms set forth in the Order Confirmation and/or in these terms and conditions or CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.
- 8.5. The licensing transaction described in the Order Confirmation document shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such licensing transaction shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court. If you have any comments or questions about the Service or Copyright Clearance Center, please contact us at 978-750-8400 or send an e-mail to support@copyright.com.

9.7: Publicação da análise secundária dos dados: *De novo Membranous Nephropathy Associated with Antibody-Mediated Rejection in Renal Transplant Recipients*

De novo membranous nephropathy associated with antibody-mediated rejection in renal transplant recipients

Marcos Vinicius de Sousa^{a,b*}, Luis Gustavo Romani Fernandes^{b,a}, Leandro Luiz Lopes de Freitas^c, Ricardo de Lima Zollner^{b,a}, Marilda Mazzali^{a,b}

^aRenal Transplant Research Laboratory, Renal Transplant Unit, Division of Nephrology, Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, Brazil; ^b Laboratory of Translational Immunology, Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, Brazil, ^c Department of Pathology, School of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, Brazil

Authorship: Marcos Vinicius de Sousa collected data from the medical record and kidney transplant program database, performed a literature review, and wrote the paper.

Luis Gustavo Romani Fernandes performed special stainings, analyzed and discussed data and reviewed the manuscript.

Leandro Luiz Lopes de Freitas performed biopsy analysis, discussed data, and reviewed the manuscript.

Ricardo de Lima Zollner and Marilda Mazzali discussed data and reviewed the manuscript.

Funding: no funding.

Conflict of interest: Authors have no conflict of interest to declare.

Running title: Membranous nephropathy and antibody-mediated rejection

Keywords: glomerulonephritis, membranous nephropathy, renal graft rejection, HLA antigens, antibody-producing cells, plasmapheresis, PLA-2R

* Address correspondence:

Marcos Vinicius de Sousa,

Renal Transplant Research Laboratory, Renal Transplant Unit, Division of Nephrology, School of Medical Sciences, University of Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-970 - Campinas, São Paulo, Brazil.

E-mail: marcosnefro@gmail.com

Abstract

Membranous nephropathy (MN) is a rare autoimmune disease, that can develop a persistent nephrotic syndrome and end-stage kidney disease, with a recurrence rate of 30 to 40% after renal transplant. We report four cases of membranous nephropathy observed in a retrospective cohort of kidney transplant recipients with donor-specific anti-HLA antibodies and biopsy-proven antibody-mediated rejection (AMR). MN was diagnosed 10 to 92 months post-transplant, associated with de novo donor-specific antibodies (DSA), specific to class I in two cases, and class II in another two. All cases presented typical morphology of membranous nephropathy, with subepithelial deposits with spikes at electron microscopy. Immunostaining for IgG4 was negative in all cases, and podocyte-expressed M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) was detected in glomerular basement membrane of three cases. Biopsies from patients with longer follow-up showed more intense microvascular inflammation and chronic injury markers, possibly due to subclinical immunological injury. AMR therapy included immunoglobulin 2g/kg in three patients, isolated or associated with plasmapheresis in one patient. One patient was not treated because of active disseminated infection. Two patients remain with functioning grafts and under antiproteinuric therapy. Two grafts were lost, one due to chronic failure and one death secondary to infection. Despite treatment, DSA remains detectable in a six month follow up.

Abstract: 206 words

Keywords: glomerulonephritis, membranous nephropathy, renal graft rejection, HLA antigens, antibody-producing cells, plasmapheresis, PLA-2R.

1. Introduction

Membranous nephropathy (MN) is the most common cause of idiopathic nephrotic syndrome in nondiabetic white adults. It is a rare autoimmune disease, with 1.3 cases per 100,000, predominantly older than 50 years old [1]. About 80% of patients are primary (PMN), and 20% are secondary, associated with other systemic diseases, such as systemic infections, malignancy, autoimmune diseases, and drugs [2]. The histological MN diagnosis consists of immune complex deposits of immunoglobulins (IgG, mainly IgG4) and complement factors (C3 and C4) along the glomerular basement membrane [1], and electron dense subepithelial deposits with spikes at electron microscopy. Most cases of PMN present circulating IgG4 autoantibody to the podocyte-expressed M-type phospholipase A2 receptor (anti-PLA2R), thrombospondin type 1 domains containing 7A (THSD7A) (3-5%), or by other unidentified mechanisms (10%)[2]. One-third of patients present spontaneous remission with blockade of the renin-angiotensin system, while others develop a persistent nephrotic syndrome and end-stage chronic renal disease, with a 30 to 40% recurrence rate after renal transplant [1].

MN recurrence rate in renal transplant range from 10% to over 50%, depending on the indication of graft biopsies and their frequency, the sample size, and the immunosuppressive therapy [3]. Unlike PMN, the recurrent post-transplant MN usually is a progressive disease that requires treatment at the earliest stage [3]. MN is the most common form of *de novo* allograft glomerulonephritis, with a frequency between 0.7% and 9.3% [4]. *De novo* post-transplant MN might be related to immunological phenomena induced by transplantation, such as T cell-mediated rejection or antibody-mediated rejection (AMR) [4]. We reported a series of cases of biopsy-proven antibody-mediated rejection (AMR) that presented histological findings compatible with MN. We also reviewed the literature about *de novo* MN associated with AMR.

2. Material and methods

2.1. Patients and clinical data

Secondary analysis of a single-center retrospective cohort of kidney transplant recipients with donor-specific anti-HLA antibodies and biopsy-proven antibody-mediated rejection (AMR). In a previous study [5], we aimed to analyze the clinical and histological effects of the AMR treatment with intravenous immunoglobulins (IVIG) and plasmapheresis (PP). Inclusion criteria were recipients >18 years old at transplantation who received therapy for biopsy-proven AMR. Diagnosis of AMR included the presence of microvascular injury in the graft biopsy and detection of DSA in peripheral blood. Exclusion criteria were pediatric renal transplant recipients and incomplete data for AMR diagnosis.

For this secondary analysis, we included four patients with the diagnosis of MN associated with AMR, characterized by the presence of subepithelial deposits with spikes in the glomerular basement membrane at electron microscopy.

Data collection included demographic data: age at kidney transplantation, gender, etiology of the chronic kidney disease (CKD), pre-transplant blood transfusion, previous transplantation, pre-transplant pregnancies, HLA -A, -B and -DR mismatches, pre-transplant panel reactive antibodies, presence of preformed DSA, donor source, age and gender of donors, expanded criteria donors, renal function at donation, kidney profile donor index (KDPI). The transplantation's collected data included initial immunosuppressive therapy, length of cold ischemia, the occurrence of delayed graft function (DGF). AMR related data: time post-transplant, DSA class, mean of fluorescence intensity (MFI) in anti-HLA antibody screening by solid-phase assay, graft function, and proteinuria AMR.

The study protocol was approved by the University of Campinas Ethics Committee (CAAE: 51485415.6.0000.5404), which waived the requirement for informed consent due to the study's retrospective design and the non-identification of the participants.

2.2. Histological, immunohistochemistry, and electron microscopy analysis

The graft morphology was analyzed according to the Banff 2013 classification, revised in 2015 [6]. The paraffin-embedded biopsy sections were stained with monoclonal anti-C4d antibody, as previously described [7]. Transmission electron

microscopy analyzed the presence of immunocomplex deposits, podocyte effacement, and glomerular basement membrane duplication.

The renal biopsies were screened for the expression of PLA2R by immunohistochemistry on the paraffin-embedded graft section. Four micra biopsies were deparaffinized using three immersions in xylol (Labsynth, SP, Brazil) for five minutes each, and the tissues were rehydrated in sequential ethanol gradient (100/95/80%). Antigen was retrieved by incubation with Tris-EDTA buffer (pH 9.0) for 40 minutes at 95°C. After two washes cycles of five minutes with Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (Labsynth) (pH 7.4 – TBS-T), endogenous peroxidase was blocked by incubation with 3% H₂O₂ solution for 15 minutes. Protein blockade used protein blocking solution from Immunohistoprobe two-step polymer kit (Advanced Biosystems LLC, CA, USA), following the manufacture's recommendations. Primary antibody (mouse monoclonal anti-PLA2R, Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) was diluted at 1: 250 in 1% BSA-TBS and incubated for 18 hours at 4°C. After this period, three washes cycles with TBS-T were performed. Samples were incubated with the secondary anti-mouse antibody followed by HPR polymer, both from Immunohistoprobe two step polymer kit (Advanced Biosystems LLC, CA, USA), according to manufacturer's instructions. DAB staining kit (Dako North America, Inc., CA, USA) was used to reveal de immunostaining following the kit instructions and slides were counterstained with Hematoxylin solution (Dinâmica Química, SP, Brazil). Biopsies stained just with secondary HPR-polymer conjugated antibody was used to check the background of non-specific staining. Slides were analyzed by light microscopy (400 x magnification) using Nikon Eclipse 80i® microscope (Japan), and images captured and processed in real-time, using the NIS-Elements AR® program (Nikon, Japan).

2.3. Literature review

We performed a systematic literature review to answer the question: has membranous nephropathy been identified as an AMR histological feature in kidney transplantation? Two researchers searched in the databases Pubmed, Scopus and Web of Science, using the terms “membranous nephropathy”, “antibody-mediated rejection”, “DSA”, “anti-HLA antibodies, between March 2019 and December 2020. We selected case reports, systematic reviews, clinical trials, multicenter studies, and meta-analyses with MN cases associated with AMR. After reading the selected articles, the data were

categorized into study design, number of reported cases of MN, DSA class, hepatitis C virus infection, MN therapy and its effectiveness.

3. Results

Four kidney transplant recipients who presented MN associated with acute AMR were included in this study. The clinical and histological characteristics are shown in Table 1.

Patient 1: Male, 25-years-old, chronic kidney disease (CKD) of unknown etiology and negative serology to HIV, B and C hepatitis, syphilis, and Chagas disease. Recipient of a kidney from a standard deceased donor, KDPI of 2%, serum creatinine 88.4 $\mu\text{mol/L}$ at donation, preimplantation kidney donor biopsy without abnormalities. HLA compatibility showed one mismatch in each HLA-A, -B, -DR, and DQ loci. Induction therapy included basiliximab and steroids, and the maintenance regimen was of tacrolimus, with adjustment aiming at a trough level of 5-8 ng/mL, sodium mycophenolate, and steroids. Hospital discharge occurred at 6th-day post-transplant, with a serum creatinine of 219.3 $\mu\text{mol/L}$, with progressive renal function improvement reaching a serum creatinine of 109.6 $\mu\text{mol/L}$, without proteinuria, and normal urinalysis. Twenty-four months post-transplant, patient presented moderate peripheral edema, serum creatinine of 107.8 $\mu\text{mol/L}$, urine protein-to-creatinine ratio (UPC) of 6.19, dyslipidemia, serum albumin of 2.3 g/dL, and negative HIV, B, and C hepatitis serologies. Chest radiography and abdominal ultrasound were normal. He reported discontinuation of tacrolimus inadvertently for one week. Anti-HLA antibody screening by solid-phase assay showed *de novo* DSA anti-DQA3 (21,373 MFI) and anti-DQ8 (MFI 22,742 MFI). The graft biopsy, analyzed according to the Banff score, showed a cortical sample with eight glomeruli, thickened glomerular basement membrane, mild mesangial expansion, and mild tubulitis (t1). There was no glomerulitis (g0), peritubular capillaritis (ptc0), or glomerular basal membrane double contours (cg0). Immunofluorescence was positive for IgG, C3, kappa, and lambda in a granular capillary pattern, and C1q mesangial granular and negative for IgM, and IgA. There was no IgG4 expression in the glomerular capillary in the immunohistochemistry. C4d immunostaining was positive and diffuse along peritubular capillaries. PLA2R was not analyzed due to insufficient renal tissue for staining. Electron microscopy analysis revealed subepithelial deposits with spikes, without double contouring or multi-layering of the glomerular basement membrane. Histopathological findings were compatible with the diagnosis of MN associated with AMR. Rejection

therapy included tacrolimus reintroduction, a three-day pulse therapy of 500 mg methylprednisolone IV and human intravenous immunoglobulin 2g/kg. Likewise, adjuvant therapy included loop diuretic, angiotensin-converting-enzyme (ACE) blockade, and statins. Renal function remained stable during the first three months of treatment, with a reduction of UPC to 3.4 g/g, recovery of serum albumin to 3.5 g/dL, and complete remission of peripheral edema. One year post-treatment, the class II DSAs remained detected (anti-DQA3 24,429 MFI, and anti-DQ8 22,247 MFI), with persistent proteinuria (UPC 3.1 g/g), and a stable renal function (serum creatinine of 123.8 μ mol/L).

Patient 2: Female, 44 years-old, CKD secondary to focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), negative serology to HIV, B and C hepatitis, syphilis, and Chagas disease, without preformed anti-HLA antibodies. She received a kidney from a standard deceased donor, KDPI of 20%, and a normal preimplantation biopsy. There were two mismatches in each HLA-A and -B loci. The induction of immunosuppression consisted of thymoglobulin 7 mg/kg and steroids, and maintenance therapy included cyclosporine, sodium mycophenolate, and steroids. She presented delayed graft function (DGF) and chronic graft dysfunction during the follow-up (serum creatinine 159.1 μ mol/L), without proteinuria. Eight years post-transplant, patient developed proteinuria (UPC of 11.8 g/g) and *de novo* DSA anti-DQ7 (23,794 MFI). Graft biopsy showed a cortical sample with 18 glomeruli, with moderate glomerulitis (g2), thickened glomerular basement membrane, mild inflammation (i2), mild tubulitis (t1), moderate peritubular capillaritis (ptc2), mild interstitial fibrosis (ci1), and mild tubular atrophy (ct1). Immunofluorescence showed C3 and lambda granular deposits in glomerular capillaries and negative for IgG, IgM, IgA, C1q, and kappa. IHC showed mild IgG4 expression in the glomerular capillary, focal C4d staining of peritubular capillaries, and PLA2R expression in the glomeruli. Electron microscopy revealed subepithelial deposits with spikes, compatible with the diagnosis of MN associated with AMR, with double contouring of the glomerular basement membrane and diffuse podocyte effacement. Therapy included a three-day pulse therapy of 500 mg methylprednisolone IV, IVIG 2g/kg, and ACE blockade. Nine months after treatment, graft biopsy showed the persistence of glomerulitis and peritubular capillaritis, and reduction of tubulitis. Twenty months after AMR treatment, the DSA remained detectable (anti-DQ7 24,419 MFI), with chronic graft dysfunction (serum creatinine of 194.5 μ mol/L), and proteinuria (UPC 4.8 g/g).

Patient 3: Female, 44 years old, CKD secondary to hemolytic uremic syndrome (HUS), who underwent hemodialysis for six years. Past medical history of eclampsia in her second pregnancy, hypothyroidism, negative serology to HIV, B, and C hepatitis, syphilis, and Chagas disease. She reported two blood transfusions, with pre-transplant

PRA 26% class I and zero class II pre-transplant, without DSA. She received a kidney from a 27 years-old standard deceased donor, KDPI of 23%, with acute kidney injury at donation (serum creatinine 406.6 $\mu\text{mol/L}$), and normal preimplantation biopsy. The HLA compatibility showed two mismatches in each HLA-A, -B, -DR, and DQ loci. Induction immunosuppressive was thymoglobulin 6 mg/kg, and steroids and maintenance regimen included sodium mycophenolate and steroids. There was no need for hemodialysis, with hospital discharge at 14th-day post-transplant, with a serum creatinine of 116.7 $\mu\text{mol/L}$. Calcineurin inhibitor was introduced at the 21st-day post-transplant, with tacrolimus adjustment aiming at a thought level of 5-8 ng/mL. Due to the donor's tuberculosis diagnosis, confirmed after transplantation, the recipient received isoniazid for six months. Three months after transplantation, the patient presented graft dysfunction (serum creatinine raised from 132.6 $\mu\text{mol/L}$ to 212.2 $\mu\text{mol/L}$), proteinuria (UPC of 0.81 g/g), and presence of decoy cells in routine urine cytology screening. Tacrolimus dose was progressively reduced, and switched to sirolimus. Ten months after the transplantation, proteinuria increased to 2.3 g/g and *de novo* DSA anti-A2 (945 MFI) was detected. Graft biopsy showed a cortical sample with 12 glomeruli, thickened glomerular basement membrane without glomerulitis (g0), peritubular capillaritis (ptc0), tubulitis (t0), tubular cells viral inclusions, vascular or interstitial abnormalities. Immunofluorescence was positive for IgG, C3, kappa and lambda in a granular capillary pattern. There was no IgG4 expression in the glomerular capillary in the IHC, C4d staining in peritubular capillaries was minimal, and PLA2R expression was present. Electron microscopy revealed subepithelial deposits with spikes, without double contouring or multi-layering of the glomerular basement membrane, compatible with the diagnosis of MN associated with AMR. Therapy included calcineurin inhibitor reintroduction, and DSA was undetectable after three months. The patient persisted with graft dysfunction (serum creatinine of 196.2 $\mu\text{mol/L}$) and proteinuria (UPC of 1.0 g/g). Thirty months after transplant, patient returned to dialysis due to infectious complications.

Patient 4: Female, 28-years-old, CKD secondary to FSGS, who underwent hemodialysis five years, pre-transplant PRA 78% class I and zero class II, and negative serology to HIV, B and C hepatitis, syphilis, and Chagas disease. She received a kidney from a 17 years-old standard donor, KDPI of 5%, serum creatinine 97.2 $\mu\text{mol/L}$ at donation and normal preimplantation biopsy. The HLA compatibility showed one mismatch in each HLA-A and -DR loci, without DSA. Induction therapy included thymoglobulin 4.5 mg/kg and steroids, and the maintenance regimen consisted of cyclosporine, sodium mycophenolate, and steroids. She presented post-transplant DGF, and chronic graft dysfunction (serum creatinine 159.1 $\mu\text{mol/L}$) during follow-up, without proteinuria. Three

years after transplant, the patient developed proteinuria (UPC 12,1 g/g) and *de novo* DSA anti-A1 (13,356 MFI). The graft biopsy showed a cortical sample with 18 glomeruli, with moderate glomerulitis (ptc2), thickened glomerular basement, moderate peritubular capillaritis (ptc2), mild tubulitis (t1), and tubular atrophy (ct1). Immunofluorescence revealed capillary granular deposits of IgG, IgA, IgM, C3, kappa and lambda, without C1q. There was no glomerular IgG4 expression in the IHC, diffuse C4d staining was present in peritubular capillaries, and PLA2R expression was noticed in glomeruli. Electron microscopy showed subepithelial deposits with spikes, double contouring of the glomerular basement membrane, and diffuse podocyte effacement. Histopathological findings were compatible with the diagnosis of MN associated with AMR. Therapy included a switch from cyclosporine by tacrolimus, three plasmapheresis sessions and IVIG 2g/kg. After treatment, the DSA persisted detectable (anti-A1 7,760 MFI), with the progression of graft dysfunction, and graft failure after 7.3 months.

4. Discussion

After renal transplantation, membranous nephropathy can occur either as a recurrence of the disease or *de novo* glomerular disease [8]. In the present series, none of the patients had MN as the etiology of CKD. In case 1, the etiology of CKD was unknown and, although it is not possible to rule out MN, clinical data, such as young age at diagnosis and absence of nephrotic syndrome, differs from the natural history of MN, most often affecting elderly patients, with nephrotic syndrome and a slower progression to end-stage CKD [9]. Favoring *de novo* MN, the onset of post-transplant symptoms coincided with the interruption of calcineurin inhibitor and *de novo* DSA detection in the peripheral blood. The C4d deposits on graft verified by immunostaining consist of additional AMR criteria, despite the absence of glomerulitis or peritubular capillaritis in the biopsy.

Patients 2 and 4, which primary renal disease was FSGS, developed proteinuria and AMR later after transplant. The morphology of MN was associated with more intense microvascular inflammation and markers of chronic graft lesion, suggesting the occurrence of continuous subclinical immunological injury. The patient 2 *de novo* DSA could be a consequence of poor adherence to immunosuppressive treatment. Patient 4 presented an increased risk of developing AMR, due to a previous HLA sensitization, with a pre-transplant class I PRA of 78%, without DSA. The patient 3 post-

transplant Polyomavirus infection was associated with the need to reduction in immunosuppressive therapy, which could trigger the development of *de novo* DSA.

Several studies in renal transplant recipients reported *de novo* MN associated with HCV infection, but few studies showed *de novo* MN associated with AMR (Table 2). Patel et al. [8] reported one case of *de novo* MN associated AMR, with detection of class I and II DSA and treated with intravenous immunoglobulin and rituximab, with reduction of proteinuria and intensity of DSA fluorescence after nine months. Honda et al. [4], in a series of 17 patients with *de novo* MN, detected four who presented *de novo* DSA at the time of MN diagnosis, been the majority class II DSA. El Kossi et al. [10] reported a case of *de novo* MN associated with DSA directed against HLA DQ7 at 50th-month post-transplant, treated with angiotensin receptor blocker and switched from azathioprine to mycophenolate mofetil, with resolution of proteinuria and improvement of renal function. However, the DSA remained detectable, with a reduction of MFI.

MN is an antibody-mediated glomerular disease that binds antibodies to podocyte antigens and favors deposition of immune complexes [11]. The anti-PLA2R antibodies are present in most primary MN in native kidneys, and positive anti-PLA2R MN has also been reported in patients with sarcoidosis, autoimmune liver disease, hepatitis B virus infection, and class V lupus nephritis [11].

In normal renal tissue, PLA2R is found in the cytoplasm of podocytes. In patients with primary MN, PLA2R is concentrated in subepithelial deposits, while cytoplasmic expression decreases [12]. In general, the glomerular search for the antigen is more sensitive than the serum measurement of the antibody [13,14]. The PLA2R antigen can still be detected in glomerular deposits, even in the absence of circulating antibody [13].

The post-transplantation MN can result from two types of mechanisms: recurrence of primary MN or *de novo* MN [11]. Unlike the cases of primary MN recurrence, where anti-PLA2R and IgG4 are usually detected, *de novo* MN might represent a form of immune response triggered by exposure of hidden antigens, probably different from those antigens observed in idiopathic MN, and IgG1 staining seems to be dominant [15]. The donor's graft endothelium expresses histocompatibility complex molecules that target antibody production and complement activation, resembling C4d positivity in peritubular capillaries [16]. Endothelial cell activation is associated with circulating DSAs, mainly class II, and accompanies vascular injury in AMR [17]. In the reported cases, we observed *de novo* circulating anti-DQ antibodies and C4d deposits in the graft. Probably, these antigens elicited immune response, which can lead to damage of podocytes and release of cytoplasmic- or membrane-associated

podocytes proteins [15], with a production of antibodies and immunocomplex and its deposition in the subepithelial area. In our series, none of the cases presented IgG4 as the dominant or codominant IgG subclass in the glomerular deposits, in agreement with other studies [18,19]. However, most of our patients showed PLA2R expression, different from the other authors' reports [10,13,20]. We hypothesized that besides the antibody reactivity to HLA class II antigens expressed on podocytes, the anti-HLA antibodies might have cross-linked with non-HLA antigens on the podocyte surface, such as PLA2R. Another possible explanation is that the AMR could stimulate anti-PLA2R production and cause tissue damage, even in the absence of anti-HLA class II antibodies.

AMR treatment aims to remove circulating antibodies, block their effects, and reduce their production [21]. Despite the lack of strong evidence from reliable randomized clinical trials in AMR therapy, plasmapheresis is widely used, combined with IVIG and anti-rejection drugs [22,23]. The goal of plasmapheresis is the removal of alloantibodies from the circulation, mainly DSA. Additional therapies include intravenous immunoglobulin (IVIG, 2g/kg), anti-CD20 antibody, and lymphocyte-depleting antibody, with or without steroids [23,24]. IVIG has strong immunomodulatory effects, regulating the Fc antibody receptors' expression and function, interfering with the activation of complement and the cytokine network, providing anti-idiotypic antibodies, and exerting effector functions on T and B cells [25]. Anti-CD20 antibodies can suppress antibody production, including DSAs [23]. The treatment with high-dose steroids and lymphocyte-depleting antibodies can increase sepsis and cancer [26]. Its use must be carefully indicated, considering the severity of rejection severity and chronic graft dysfunction intensity.

In our center, once diagnosed AMR, we add a calcineurin-inhibitor (CNI) to the maintenance immunosuppressive therapy in cases that it had not already in use, associated with the antiproliferative drug, preferably mycophenolate, and steroids. The treatment usually includes 2g/kg IVIG and five alternate-day plasma exchanges using 5% human serum albumin. In the reported cases, the treatment consisted of CNI reintroduction in cases where it had been withdrawn, or switch from cyclosporine to tacrolimus due to its higher immunosuppressive potential. A three-day intravenous steroid pulse was administered in case of associated acute cellular rejection, with interstitial inflammation. Three subjects received IVIG 2g/kg, except the third case, due to its infectious events. Because of the low clearance of anti-DQ antibodies in other AMR cases treated with plasma exchange in our center, we decided not to perform plasmapheresis in patients 1 and 2. Additional therapies were antiproteinuric and statins.

We observed one death due to infectious events and one graft failure in our series. The other two patients remain with functioning grafts and receiving antiproteinuric drugs. DSA remains detectable in these cases, with routine solid-phase DSA test control every six months.

5. Conclusion

De novo MN is a rare manifestation of AMR in kidney transplant recipients, which could be suspected in the presence of proteinuria and de novo DSA. Treatment of AMR associated with antiproteinuric drugs can reduce proteinuria and prolongs graft survival. The occurrence of PLA2R in *de novo* MN suggests antibody-mediated activation, despite the use of maintenance immunosuppression.

6. References

- [1] Seitz-Polski B, Lambeau G, Esnault V. Glomérulonéphrite extramembraneuse : mécanismes et histoire naturelle. *Néphrologie & Thérapeutique* 2017;13:S75–81. doi:10.1016/j.nephro.2017.01.012.
- [2] Couser WG. Primary Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017;12:983–97. doi:10.2215/CJN.11761116.
- [3] Filippone EJ, Farber JL. Membranous nephropathy in the kidney allograft. *Clin Transplant* 2016;30:1394–402. doi:10.1111/ctr.12847.
- [4] Honda K, Horita S, Toki D, Taneda S, Nitta K, Hattori M, et al. De novo membranous nephropathy and antibody-mediated rejection in transplanted kidney. *Clin Transplant* 2011;25:191–200. doi:10.1111/j.1399-0012.2010.01213.x.
- [5] de Sousa MV, Gonçalves AC, Zollner R de L, Mazzali M. Treatment of Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation: Immunological Effects, Clinical Response, and Histological Findings. *Ann Transplant* 2020;25:1–8. doi:10.12659/AOT.925488.
- [6] Loupy A, Haas M, Solez K, Racusen L, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2015

- Kidney meeting report: Current challenges in rejection classification and prospects for adopting molecular pathology. *Am J Transplant* 2016. doi:10.1111/ajt.14107.
- [7] Sampaio WL V, Mazzali M. C4d deposits in borderline rejection: An early marker for chronic renal dysfunction? *Transplant. Proc.*, vol. 46, 2014, p. 1710–2. doi:10.1016/j.transproceed.2014.05.014.
 - [8] Patel K, Hirsch J, Beck L, Herlitz L, Radhakrishnan J. De novo Membranous Nephropathy in Renal Allograft Associated With Antibody-Mediated Rejection and Review of the Literature. *Transplant Proc* 2013;45:3424–8. doi:10.1016/j.transproceed.2013.05.011.
 - [9] Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet* 2012;379:165–80. doi:10.1016/S0140-6736(11)60178-5.
 - [10] El Kossi M, Harmer A, Goodwin J, Wagner B, Shortland J, Angel C, et al. De novo membranous nephropathy associated with donor-specific alloantibody. *Clin Transplant* 2007;070701175610001-??? doi:10.1111/j.1399-0012.2007.00741.x.
 - [11] Leon J, Pérez-Sáez MJ, Batal I, Beck LH, Rennke HG, Canaud G, et al. Membranous Nephropathy Posttransplantation. *Transplantation* 2019;103:1990–2002. doi:10.1097/TP.0000000000002758.
 - [12] VanBeek C, Haas M. Anti-PLA2R-associated membranous nephropathy: a review with emphasis on diagnostic testing methods. *Clin Nephrol* 2015;84 (2015):1–9. doi:10.5414/CN108602.
 - [13] Debiec H, Martin L, Jouanneau C, Dautin G, Mesnard L, Rondeau E, et al. Autoantibodies Specific for the Phospholipase A2 Receptor in Recurrent and De Novo Membranous Nephropathy. *Am J Transplant* 2011;11:2144–52. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03643.x.
 - [14] Svobodova B, Honsova E, Ronco P, Tesar V, Debiec H. Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28:1839–44. doi:10.1093/ndt/gfs439.
 - [15] Ponticelli C, Moroni G, Glasscock RJ. De Novo Glomerular Diseases after Renal Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014;9:1479–87. doi:10.2215/CJN.12571213.
 - [16] Morozumi K, Takeda A, Otsuka Y, Horike K, Gotoh N, Narumi S, et al. Reviewing

- the pathogenesis of antibody-mediated rejection and renal graft pathology after kidney transplantation. *Nephrology* 2016;21:4–8. doi:10.1111/nep.12777.
- [17] Cross AR, Lion J, Poussin K, Assayag M, Taupin J-L, Glotz D, et al. HLA-DQ alloantibodies directly activate the endothelium and compromise differentiation of FoxP3^{high} regulatory T lymphocytes. *Kidney Int* 2019. doi:10.1016/j.kint.2019.04.023.
 - [18] Kearney N, Podolak J, Matsumura L, Houghton D, Troxell M. Patterns of IgG Subclass Deposits in Membranous Glomerulonephritis in Renal Allografts. *Transplant Proc* 2011;43:3743–6. doi:10.1016/j.transproceed.2011.10.042.
 - [19] Wen J, Xie K, Zhang M, Chen J, Zhang J, Cheng D, et al. HLA-DR, and not PLA2R, is expressed on the podocytes in kidney allografts in de novo membranous nephropathy. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e4809. doi:10.1097/MD.0000000000004809.
 - [20] Larsen CP, Walker PD. Phospholipase A2 Receptor (PLA2R) Staining Is Useful in the Determination of De Novo Versus Recurrent Membranous Glomerulopathy. *Transplant J* 2013;95:1259–62. doi:10.1097/TP.0b013e31828a947b.
 - [21] Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med* 2018;379:1150–60. doi:10.1056/NEJMr1802677.
 - [22] Comai G, Ravaioli M, Baraldi O, Cuna V, Gasperoni L, D'Arcangelo GL, et al. Treatment of Acute Antibody-Mediated Rejection, 2017, p. 156–67. doi:10.1159/000468962.
 - [23] Clark WF, Huang S-HS, Walsh MW, Farah M, Hildebrand AM, Sontrop JM. Plasmapheresis for the treatment of kidney diseases. *Kidney Int* 2016;90:974–84. doi:10.1016/j.kint.2016.06.009.
 - [24] Special Issue: KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant* 2009;9:S1–155. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02834.x.
 - [25] Kazatchkine MD, Kaveri S V. Immunomodulation of Autoimmune and Inflammatory Diseases with Intravenous Immune Globulin. *N Engl J Med* 2001;345:747–55. doi:10.1056/NEJMr993360.
 - [26] Clayton PA, McDonald SP, Russ GR, Chadban SJ. Long-Term Outcomes after Acute Rejection in Kidney Transplant Recipients: An ANZDATA Analysis. *J Am*

Soc Nephrol 2019;ASN.2018111101. doi:10.1681/ASN.2018111101.

Table 1. Clinical and histological characteristics of the cases of membranous nephropathy associated with antibody-mediated rejection.

Case	1	2	3	4
Transplant recipients				
Age (years)	25	44	44	28
Sex	male	female	female	female
Etiology of CKD	unknown	FSGS	HUS	FSGS
Transfusions pre transplant	no	yes	yes	yes
Previous transplantation	no	no	no	no
Pre-transplant pregnancies	-	yes	yes	yes
HLA ABDR Mismatches	3	4	6	1
Pre-transplant Class I PRA (%)	0	0	27	78
Pre-transplant Class II PRA (%)	0	0	0	0
Preformed DSA	no	no	no	no
Donors				
Type of donors	deceased	deceased	deceased	deceased
Age (years)	19	35	27	17
Sex	male	male	male	male
Expanded criteria donors	no	no	yes [†]	no
Serum creatinine (μmol/L)	68.9	61.9	406.6	97.2
KDPI index (%)	2	20	89	5
Transplantation				
Initial immunosuppression	IL2RAb/TAC/MS	ATG/CYA/MS	ATG/TAC/MS	ATG/CYA/MS
Cold ischemia (hours)	14.3	31.0	17.4	22.7
DGF	no	yes	yes	no
Antibody-mediated rejection				
Time post-transplant (months)	24	92	10	36
DSA class	II	II	I	I
DSA MFI _{SUM}	44,115	23,794	945	13,356
Immunodominant DSA MFI _{MAX}	22,745	23,794	945	13,356
Current immunosuppression	TAC/MS	CYA/MS	CYA/MS	CYA/MS
SCr, μmol/L	106.1	170.6	167.9	159.1
eGFR (CKD-EPI), mL/min	83.5	30.9	30.8	37.6
UPC, g/g	6.19	11.8	2.3	12.1
Graft morphology				
Light microscopy - Banff score				
i (0 to 3)	0	1	0	1
t (0 to 3)	1	1	0	1
v (0 to 3)	0	0	0	0
g (0 to 3)	0	2	0	2
ptc (0 to 3)	0	2	0	2
MVI g + ptc (0 to 6)	0	4	0	4
C4d (0 to 3)	3	2	1	3
ci (0 to 3)	0	2	1	0
ct (0 to 3)	0	2	2	1
Electron microscopy				
IC deposits	subepithelial	subepithelial	subepithelial	subepithelial
Podocyte effacement	no	diffuse	no	diffuse
GBM duplication	no	yes	no	yes
IgG4 deposition	no	mild	no	no
PLA2R	n/a	yes	yes	yes
Immunofluorescence positivity				
	IgG / C3 κ / λ / C1q	IgG / C3 / λ	IgG / C3 κ / λ	IgG / IgM / IgA C3 / κ / λ

AMR, antibody-mediated rejection; ATG, anti-thymocyte globulin; CKD, chronic kidney disease; CYA, cyclosporine; DGF, delayed graft function; DSA, donor-specific anti-HLA antibody; eGFR, estimated glomerular filtration rate; FSGS, focal segmental glomerulosclerosis; HLA, human leukocyte antigen; HUS, hemolytic uremic syndrome; IL-2R, IL2RAb, interleukin-2 receptor antibody; KDPI, kidney donor profile index; MS, mycophenolate sodium; n/a, not available; PRA, panel reactive antibody; SCr, serum creatinine; TAC, tacrolimus; UPC, urine protein-to-creatinine ratio; i, inflammation; t, tubulitis; v, intimal arteritis; g, glomerulitis; ptc, peritubular capillaritis; MVI, microvascular inflammation; ci, interstitial fibrosis; ct, tubular atrophy; IF, immunofluorescence; IC, immune complex; GBM, glomerular basement membrane, PLA2R-, M-type phospholipase A2 receptor.

[†] Donor with acute kidney injury.

Table 2. Reported cases of post-transplant *de novo* membranous nephropathy associated with antibody-mediated rejection.

	MN cases	HCV	DSA class	Treatment and effectiveness
Sousa et al	4	No	I and II	CNI, MYF, steroids, IVIG, and ACEi- effective CNI, MYF, steroids, IVIG, and ACEi- effective CNI, MYF, steroids, and ACEi [†] CNI, MYF, steroids, IVIG, PP, and ACEi- not effective
Patel K et al. 2013	1	No	I and II	IVIG and rituximab - effective
Honda et al. 2011	5	n/a	I and II	PP, CNI, MP, MMF, and ARB – effective CNI and MP – not effective CNI, MMF, and MP – not effective CNI, MP, and DSG – not effective CNI, MP, DSG, PP, Pulse – not effective
El Kossi et al. 2008	1	No	II	Switch Azathioprine to mycophenolate - effective

MN, membranous nephropathy; HCV, hepatitis C virus; DSA, donor-specific anti-HLA antibodies; IVIG, intravenous immunoglobulin; ACEi, angiotensin-converting-enzyme inhibitor; PP, plasmapheresis; CNI, calcineurin inhibitor; MYF, sodium mycophenolate; MP, methylprednisolone; MMF, mycophenolate mofetil; ARB, angiotensin receptor blockade; DSG, deoxysperguarin; Pulse, intravenous steroid pulse therapy; n/a, not available.

[†] Death with functioning graft due to infectious disease.

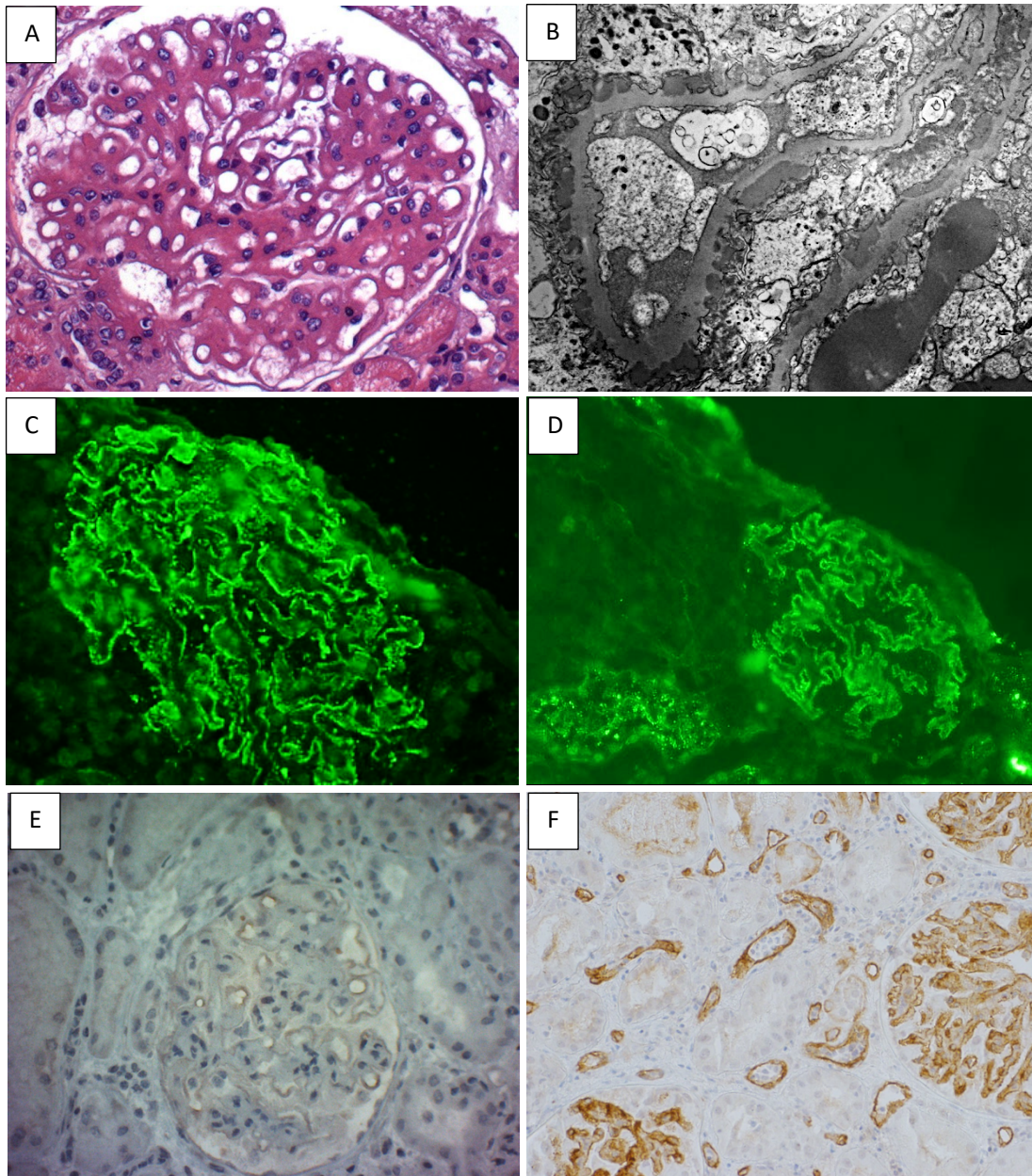


Figure 1. Photomicrograph of renal biopsies of patients with membranous nephropathy associated with antibody mediated rejection. (A) Glomerular basement membrane thickening, (light microscopy: hematoxylin and eosin, x400), (B) Diffuse thickening of the glomerular basement membrane, subepithelial electron-dense deposits, and spike formation (electron microscopy), (C) IgG deposition along the capillary wall (immunofluorescence assay, x400), (D) C3 deposition along the capillary wall (immunofluorescence assay, x400), (E) M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) glomerular staining (immunostaining assay, x400), (F) C4d staining (immunostaining, x400).

9.8: Protocolo de tratamento de rejeição mediada por anticorpos (RMA) aguda (RAMA) e crônica (RCMA) do HC-UNICAMP

TRANPLANTE RENAL HC-UNICAMP - PROTOCOLOS TRATAMENTO DE REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS AGUDA E CRÔNICA

1. População envolvida: médicos assistentes do Programa de Transplante Renal do HC-UNICAMP, médicos residentes em Nefrologia da FCM-UNICAMP, médicos residentes em Nefrologia – ano adicional em Transplante Renal da FCM-UNICAMP, enfermagem, pacientes acompanhados no ambulatório de Transplante Renal do HC-UNICAMP.

2. Definição: padronização do tratamento de rejeição mediada por anticorpos (RMA), formas aguda (RAMA) ou crônica (RCMA), diagnosticada por exames laboratoriais e alterações anatomopatológicas em transplantados renais.

3. População considerada em maior risco de desenvolver RMA:

- a. Receptores previamente sensibilizados para o sistema HLA - anticorpos anti-HLA específicos contra o doador ou inespecíficos;
- b. Desenvolvimento de anticorpos anti-HLA de novo e/ou aumento da intensidade de fluorescência dos anticorpos pré-formados;
- c. Má adesão ao tratamento;
- d. Nível sanguíneo de medicações imunossupressoras persistentemente insatisfatórios, a despeito dos ajustes em doses;
- e. Disfunção renal, crônica ou aguda, sem outra causa identificada;
- f. Desenvolvimento e/ou piora da proteinúria, sem outra causa identificada.

4. Conduta nos casos suspeitos de RMA:

- a. Solicitar pesquisa de anticorpos anti-HLA em sangue periférico para os casos não realizados nos últimos três meses;
- b. Avaliação de proteinúria por meio da relação de proteína e creatinina em amostra isolada de urina;
- c. Realização de citologia urinária para poliomavírus;
- d. Solicitação de hemograma, coagulograma e dosagem de nível sanguíneo de imunossupressor;
- e. Ajuste, se necessário, de anti-hipertensivos;
- f. Em casos de seguimento ambulatorial, o paciente deverá retornar em, no máximo, 3 semanas para reavaliação clínica e dos exames realizados;
- g. Avaliação dos exames - considerar realização de biópsia renal:
 - Checar resultado de pesquisa de anticorpos anti-HLA, citologia urinária, proteinúria, hemoglobina, hematócrito, plaquetas e coagulograma - **considerar os critérios de elegibilidade para realização de biópsia renal ambulatorial, disponíveis no protocolo Biópsia Renal Ambulatorial;**
 - Agendar, para os casos indicados, biópsia renal - fornecer lista de recomendações, preencher ficha de controle e termo de consentimento - **os pacientes agendados para biópsia ambulatorial deverão retornar na semana anterior para consulta médica.**

h. Os retornos pós-biópsia devem ocorrer em, no máximo, uma semana após o procedimento - avaliação clínica e de possíveis complicações.

5. Critérios de eleição e procedimentos para tratamento de RMA ambulatorial:

- i. Preencher critério para RMA;
- ii. Não ter evidência clínica e/ou laboratorial de processo infeccioso - realizar exame físico completo e solicitar: hemograma, radiografia de tórax, urina 1, urocultura e demais exames conforme necessidade;
- iii. Em casos de infecção diagnosticada, a mesma deverá ser tratada antes do tratamento da RMA. Realizar exame de controle após o tratamento da infecção e somente iniciar o tratamento da RMA com comprovação de cura do processo infeccioso;
- iv. Administrar profilaxia com ivermectina antes de iniciar o tratamento - certificar-se da realização completa da profilaxia antes de liberar o tratamento da RMA;
- v. Preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE;
- vi. Condições cognitivas e socioeconômicas para o tratamento ambulatorial;
- vii. CHECAR RESULTADOS DE DSA E CITOLOGIA URINÁRIA PARA POLIOMAVÍRUS ANTES DE INICIAR O TRATAMENTO - ANOTAR RESULTADOS NA FOLHA DE ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAÇÃO E ACOMPANHAMENTO DO TRATAMENTO.
- viii. Solicitar medicação na Farmácia de Alto Custo - preencher Laudo de Solicitação, Avaliação e Autorização de Medicamentos, laudo médico completo (devem constar dados do transplante, diagnóstico de rejeição crônica mediada por anticorpos e CID - T86.1) e receituário com dose total da medicação, via de administração e duração do tratamento. O paciente deve comparecer à Farmácia de Alto Custo munido da documentação citada e recipiente de isopor para acondicionamento e transporte da medicação.
- ix. A medicação deve ser entregue para a enfermagem do Programa de Transplante Renal, juntamente com prescrição médica em formulário de rotina, em duas vias.

6. Critérios de exclusão para tratamento de RMA ambulatorial:

- i. Distúrbio de coagulação;
- ii. Déficit cognitivo ou condições socioeconômicas impeditivas;
- iii. Descontrole pressórico;
- iv. Evidência clínica ou laboratorial de processo infeccioso;
- v. Recusa do paciente e/ou não preenchimento do TCLE.

7. Critérios diagnósticos para RAMA (BANFF 2015) - os 3 critérios devem estar presentes:

- i. Evidência histológica de lesão tecidual aguda (1 ou mais dos seguintes):
 - Inflamação microvascular ($g > 0$, na ausência de glomerulite de novo recorrente e/ou $ptc > 0$);
 - Arterite intimal ou transmural ($v > 0$);
 - Lesão tubular aguda, na ausência de outra causa aparente.
- ii. Evidência de interação ativa ou recente dos anticorpos com o endotélio (ao menos 1 dos seguintes):
 - C4d linear em capilar peritubular (C4d2 ou C4d3 na imunofluorescência ou C4d > 0 na imuno-histoquímica);
 - Inflamação microvascular moderada ou intensa: $g + ptc \geq 2$ (com $g \geq 1$).

- iii. Evidência de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA) no sangue periférico.

8. Critérios diagnósticos para RCMA (BANFF 2015) - os 3 critérios devem estar presentes:

- iv. Evidência histológica de lesão tecidual crônica (1 ou mais dos seguintes):
 - Glomerulopatia do transplante (cg>0) na ME, sem evidência de microangiopatia trombótica crônica;
 - Capilar peritubular com membrana basal multilaminada na ME;
 - Artérias com fibrose intimal sem outra causa.
- v. Evidência de interação ativa ou recente dos anticorpos com o endotélio (ao menos 1 dos seguintes):
 - C4d linear em capilar peritubular (C4d2 ou C4d3 na imunofluorescência ou C4d>0 na imuno-histoquímica);
 - Inflamação microvascular: g+ptc≥2 (com g≥1).
- vi. Evidência de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA) no sangue periférico.

***Realizar biópsia do enxerto com 3 técnicas (microscopia ótica, imunofluorescência e microscopia eletrônica), com pesquisa de C4d (deixar expresso na solicitação para a Anatomia Patológica) e coletar fragmento para posterior análise, que será entregue à técnica do Laboratório de Investigação em Transplante - LINT → entregar o fragmento em frasco de urina não-estéril, identificado com nome completo, data de realização da biópsia, HC e indicação (rejeição crônica mediada por anticorpos).**

9. Medicamentos - conservação, preparo e administração:

9.1. Imunoglobulina humana endovenosa (IVIG):

- A imunoglobulina humana é fornecida na dose de 5g/100 mL, em frasco-ampola com solução injetável.
- A medicação é pasteurizada, fabricada a partir de sangue humano. O medicamento contém maltose, pacientes diabéticos devem ter sua glicemia controlada cuidadosamente.
- Não administrar a medicação em suspeita ou casos confirmados de gestação.
- A medicação deve ser armazenada em geladeira, entre 2°C e 8°C. Não colocar em freezer ou congelador, evitar exposição direta à luz solar.
- Instruções para administração:
 - Deixar o medicamento fora da geladeira por 15 minutos antes de utilizá-lo;
 - Retirar o lacre de plástico do frasco-ampola;
 - Limpar a superfície da tampa com algodão umedecido com álcool;
 - Com o auxílio do equipo para administração, realizar a injeção intravenosa.
- Dose a ser utilizada: 2g por kg de peso (sem edema), fracionada em 4 a 5 dias.
- Velocidade de infusão: 0,01 mL/kg de peso corporal/min, aumentando gradualmente para 0,02 - 0,05 mL/kg de peso corporal/min após 15 a 30 min (para paciente de 70 kg, a velocidade de infusão é equivalente a 2 a 4 mL/min).
- Se ocorrerem reações adversas (dor moderada no peito, quadril ou nas costas, náuseas, vômitos, calafrios, febre, mal-estar, fadiga, sensação de fraqueza ou leve tontura, dor

de cabeça, vermelhidão, pressão no peito, dispneia), a velocidade de infusão deve ser diminuída. Podem-se utilizar antialérgicos.

- Em casos de reação adversa, registrar conduta e medicações administradas. Em caso de persistência dos sintomas, suspender administração da medicação.

9.2. Globulina anti-timocítica (timoglobulina):

- A globulina anti-timócitos deve ser sempre utilizada sob estrita supervisão médica, em ambiente hospitalar, e os pacientes devem ser cuidadosamente monitorados durante sua infusão.
- Algumas reações adversas graves, tais como taquicardia, hipotensão e rash cutâneo, podem estar relacionadas com a velocidade de infusão. No caso de um evento adverso grave, a velocidade de infusão deve ser reduzida, ou a infusão interrompida, até que os sintomas desapareçam. A administração deve ser imediatamente interrompida ou permanentemente descontinuada no caso de ocorrência de reação alérgica generalizada. Monitoramento cuidadoso deve ser realizado pelo médico durante o uso da medicação.
- A administração de vacinas vivas atenuadas não é recomendada durante o uso da medicação.
- Não foram feitos estudos de reprodução animal com imunoglobulina anti-timócitos. Portanto, essa medicação somente pode ser prescrita durante a gravidez em caso de necessidade absoluta. Não se deve amamentar durante o uso da medicação, pois medicamento pode passar para o leite materno.
- Não é provável que a imunoglobulina anti-timócitos cause problemas ou efeitos colaterais em crianças diferentes dos que ocorrem com adultos. A dose de imunoglobulina anti-timócitos (por kg de peso) é idêntica para crianças e adultos.
- A imunoglobulina anti-timócitos deverá ser mantida sob refrigeração (temperatura entre 2°C e 8°C).
- O pó líofilo contido no frasco é de coloração creme e deve ser reconstituído com 5 mL de água estéril para injeção. A solução resultante é transparente ou levemente opalescente.
- Diluir a solução reconstituída a ser administrada nas próximas 24 horas em soro fisiológico 0,9% 500 ml, conforme prescrição médica, utilizando-se técnica asséptica (livre de contaminação microbiana).
- Depois de preparado, **o medicamento deve ser utilizado imediatamente**. No entanto, a solução reconstituída é **estável durante 24 horas a uma temperatura de 25°C**.
- A imunoglobulina anti-timócitos **deverá ser administrada em acesso venoso central**. Em caso da impossibilidade de realização do mesmo, o caso deverá ser discutido com a equipe médica da Nefrologia, com orientação escrita de forma clara em prontuário e em prescrição médica.
- A solução contendo imunoglobulina anti-timócitos reconstituída e diluída em soro fisiológico deverá ser administrada em bomba de infusão contínua, na velocidade de 16 ml/h durante a primeira hora de infusão e, após, 32 ml/h até o término da infusão da medicação.
- Em casos de reações adversas tais como hipotensão, taquicardia ou rash cutâneo, reduzir a velocidade de infusão pela metade. Na persistência dos sintomas, a

administração da medicação deverá ser interrompida. Em caso de melhora dos sintomas, avaliar possibilidade de aumento gradual da velocidade de infusão.

- A dose total de timoglobulina usada para tratamento de RMA será de 6 mg/kg, com administração de 3 mg/kg no primeiro dia de tratamento, e 1,5 mg/kg/dia nos próximos dois dias.

9.3. Metilprednisolona

- A metilprednisolona deve ser mantida em sua embalagem original, protegida da luz e umidade, conservada em temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C).
- Após preparo (solução reconstituída ou solução reconstituída diluída), manter em temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C) por até 48 horas.
- Para reconstituição, usar apenas o diluente que acompanha a embalagem.
- Se desejado, o medicamento pode ser administrado em soluções diluídas pela mistura do produto reconstituído com solução de dextrose a 5% em água, solução de cloreto de sódio 0,9% ou solução de dextrose 5% em cloreto de sódio a 0,45% ou 0,9%.
- A metilprednisolona é um pó líofilo branco a quase branco. O diluente é um líquido incolor com leve odor de álcool benzílico.
- A dose diária deverá ser administrada por infusão endovenosa, como pulsoterapia, por pelo menos 30 minutos.
- A dose total a ser administrada será de 1,5 g, fracionada em 3 dias sequenciais. Em alguns casos, em que sejam verificados atividade inflamatória intensa, sinais de microangiopatia associada, poderão ser consideradas doses adicionais da medicação.

10. Plasmaférese (PF):

- Solicitar interconsulta da Hematologia - HC/UNICAMP, para avaliação e realização das sessões de plasmaférese.
- Serão realizadas 5 sessões de PF, com um intervalo de 48 horas entre as sessões, utilizando o equipamento COM.TEC® (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Alemanha), com separador celular de fluxo contínuo ou descontínuo.
- A cada sessão, será processada a quantidade de volume sanguíneo correspondente a uma volemia sanguínea.
- Cálculo do volume sanguíneo total (VST) - fórmula de Nadler (altura em metros e peso em quilogramas):

$$\text{homens: } (0,3669) \times (\text{altura})^3 + (0,3219 \times \text{peso}) + 0,6041$$

$$\text{mulheres: } (0,3669) \times (\text{altura})^3 + (0,3219 \times \text{peso}) + 0,6041$$

- Cálculo do volume plasmático total (VPT), em litros:

$$VPT = (VST) \times (1 - \text{hematócrito})$$
- Fluido de reposição - solução de cloreto de sódio 0,9% e albumina humana, na proporção de 2:3.
- Anticoagulação com citrato, com reposição de cálcio endovenoso durante o procedimento, em caso de sintomas de hipocalcemia secundários ao citrato.
- No intervalo entre sessões de PF, os pacientes receberão IVIG 100 mg/kg/dia, com administração da dose restante de IVIG após a última sessão de PF, dividida em 3 a 4 dias, até completar a dose total de 2g/kg.

11. Tratamento de RAMA:

- O tratamento será realizado com IVIG 100 mg/kg no dia anterior à realização de cada sessão de PF.
- Serão realizadas 5 sessões de PF, idealmente com intervalo de 48 horas entre elas, ou de acordo com a disponibilidade do serviço.
- Após o término das sessões de PF, administrar dose restante para completar 2g/kg de IVIG, com dose dividida em 3 a 4 dias, iniciando a infusão no dia seguinte à última sessão de PF.
- Realizar, após término do tratamento, biópsia renal de controle - microscopia óptica, imunofluorescência e microscopia eletrônica, com pesquisa de C4d por imuno-histoquímica.
- Para os casos com rejeição mediada por célula associada:
 - tubulite leve (t1) - realizar tratamento com corticoide em pulso com metilprednisolona 1,5 g, com dose dividida em 3 administrações de 500 mg/dia.
 - tubulite moderada (t2) ou intensa (2) - associar tratamento com corticoide e timoglobulina, na dose de 6 mg/kg, com dose total dividida em 3 mg/kg no primeiro dia de tratamento, seguida de 1,5 mg/kg nos dias subsequentes.

12. Tratamento de RCMA:

- O tratamento da RCMA levará em consideração fatores como sinais histológicos de atividade inflamatória e cronicidade, quantidade e intensidade dos anticorpos detectados no sangue periférico, função renal e proteinúria ao diagnóstico.
- Para os casos com sinais de lesão endotelial moderada ou intensa (tubulite, glomerulite e/ou capilarite peritubular), piora de função renal e surgimento ou piora da proteinúria, considerar tratamento com IVIG e PF e avaliar necessidade de tratamento de rejeição celular aguda associada.
- Em casos de achados compatíveis com cronicidade, sem sinais de atividade da rejeição, considerar o tratamento com IVIG isolada, com tratamento adicional com corticoide ou timoglobulina, para casos de rejeição celular associada.
- O tratamento escolhido será realizado de acordo com o descrito para as formas agudas de RMA.

13. Terapia imunossupressora de manutenção:

- Sempre que possível, a terapia imunossupressora de manutenção dos casos de RMA deve ser a associação de uma droga inibidora de calcineurina (preferencialmente tacrolimo) com uma droga antiproliferativa (preferencialmente micofenolato sódico) e corticoide.
- O nível sanguíneo de tacrolimo deve ser monitorizado periodicamente, com ajuste para manutenção de dose para atingir o nível sanguíneo desejado entre 6 e 8 ng/dL.

14. Seguimento ambulatorial pós-tratamento de RMA:

- O retorno após o tratamento deverá ocorrer em um prazo máximo de 7 dias.
- Solicitar, **após 20 dias do término do tratamento**, nova pesquisa de anticorpos anti-HLA. Anotar na folha de solicitação do exame a indicação completa: tratamento de rejeição crônica mediada por anticorpos, dose total de imunoglobulina utilizada e período do tratamento. **Comunicar diretamente o setor de HLA do Hemocentro quando for solicitar o exame nesses casos, informando nome completo do paciente, número do HC e data de término do tratamento.**

Escrito em dezembro de 2017 por Marcos Vinicius de Sousa.
Última revisão em 22/03/2021.

9.9: Fluxograma do tratamento de rejeição mediada por anticorpos (RMA) aguda (RAMA) e crônica (RCMA)

