

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA**

***AVALIAÇÃO DE REJEIÇÃO SUBCLÍNICA EM BIÓPSIAS DE  
VIGILÂNCIA DE PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS COM  
FUNÇÃO ESTÁVEL***

**FRANCISCO JOSÉ VERÍSSIMO VERONESE**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Santos Gonçalves**

**Co-Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss**

**Tese de Doutorado apresentada  
ao Curso de Pós-Graduação em  
Medicina: Clínica Médica, para  
obtenção do título de Doutor em  
Medicina.**

***Tese de Doutorado***

**2001**

**V549a** Veronese, Francisco José Veríssimo

Avaliação de rejeição subclínica em biópsias de vigilância de pacientes transplantados renais com função estável / Francisco José Veríssimo Veronese ; orient. Luiz Felipe Santos Gonçalves ; co-orient. Maria Isabel Albano Edelweiss. – Porto Alegre, 2002.

187 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica e Ciências Médicas.

1. Transplante de rim. 2. Rejeição de enxerto. 3. Biópsia de vigilância. I. Gonçalves, Luiz Felipe Santos. II. Edelweiss, Maria Isabel Albano. II. Título.

NLM: WJ368

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Para Carmen, Bernardo e Isabela,

três grandes paixões.

*Amor é dado de graça,  
é semeado no vento, na cachoeira, no eclipse.  
Amor foge a dicionários e a regulamentos vários.  
O amor é da morte vencedor,  
por mais que o matem a cada instante de amor.*

Carlos Drummond de Andrade

“As sem-razões do amor”

## **AGRADECIMENTOS**

- ao Prof. Luiz Felipe Gonçalves, orientador não só desta tese de doutorado mas de grande parte de minha atividade clínica desde meu ingresso no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Considero-o um médico, professor e pesquisador definitivamente brilhante, privilegiado por sua sabedoria e maturidade profissional, fazendo a integração perfeita entre a inata criatividade e o rigor do método científico. Agradeço o incentivo permanente para o meu crescimento, por todas as oportunidades, por todos os ensinamentos, por estar sempre disponível, e sobretudo, pelo convívio e amizade que espero compartilharmos sempre.

- à Prof<sup>a</sup> Maria Isabel Edelweiss, co-orientadora desta tese, que de forma efetiva contribuiu para a realização deste trabalho, não só no que se refere à interpretação histopatológica, mas desde o seu início como projeto de pesquisa até a sua finalização. A sua sólida experiência profissional, como patologista, docente e pesquisadora, me proporcionaram um aprendizado valioso e estimulante em todo o processo de doutoramento.

- ao Prof. Roberto Manfro, que considero também co-orientador desta tese, pelo suporte e disponibilidade constantes em todas as etapas deste trabalho; por dirimir dúvidas, apontando as soluções corretas com talento e rigor científico; por todas as revisões de textos; e pelo seu exemplo como colega, médico, professor e pesquisador desde a faculdade e ao longo de todos esses anos.

- à Prof<sup>a</sup> Irene de Lourdes Noronha, por ter gentilmente me recebido em seu laboratório na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ensinando-me sobre imunologia de transplantes, técnicas de imunohistoquímica e a sua interpretação; pelo excelente trabalho de imunohistoquímica realizado sob sua cuidadosa orientação; e por todas as críticas e sugestões feitas a esta pesquisa.

- à Ivone Oliveira, Sabrina Oliveira e Teresinha Leitão, meu profundo agradecimento pelo extenso e exaustivo trabalho de preparo das lâminas e de leitura da imunohistoquímica; por terem compartilhado seu conhecimento, seu tempo, sua amizade; e principalmente, por terem me recebido como alguém da casa.

- ao Prof. Vinícius Duval da Silva, por sua valiosa e efetiva participação no processo de quantificação da imunohistoquímica, que em certa etapa da tese envolveu um extenso trabalho de digitalização das biópsias; pela sua constante disponibilidade e orientação; e por ter nos ensinado sobre a análise de morfometria digital, ampliando enormemente as possibilidades futuras desta linha de pesquisa.

- ao Prof. Julio Goldberg, da Unidade de Transplante Renal do Instituto de Nefrologia de Buenos Aires, Argentina, pela sua pronta e importante colaboração na interpretação das biópsias do enxerto renal com base na classificação atual de Banff.

- ao Prof. David Rush e Prof<sup>a</sup> Sylvia Dancea, respectivamente do Departamento de Medicina e do Departamento de Patologia da Universidade de Manitoba, Winnipeg, Canadá, por todo o interesse e atenção dispensados a esta pesquisa e aos seus pesquisadores, disponibilizando todos os diagnósticos e graduações da histopatologia que, junto com a imunohistoquímica, constituíram a base dos dados deste trabalho.

- ao Dr. Marcelo Vieira, que realizou as biópsias do enxerto renal no Serviço de Radiologia do HCPA; e também por ter me “treinado” neste procedimento, simplesmente por ser um colega sempre receptivo e disponível.

ao Prof. Antônio Carlos Pütten, chefe do Serviço de Patologia do HCPA, por disponibilizar espaços e pessoal, que viabilizaram o processamento das biópsias e a preparação das lâminas para realização da imunohistoquímica.

- à Prof<sup>a</sup> Lúcia Silla, chefe do Serviço de Hematologia do HCPA, por gentilmente permitir o uso do freezer para conservação de material, e pelo livre acesso ao serviço mesmo em horários atípicos.

- ao técnico Jorge Alberto Lopes, do Serviço de Patologia do HCPA, pelo extenso e competente trabalho de corte das biópsias no criostato, e pelo trabalho extra de colorações especiais que gentilmente procedeu.

- ao funcionário Adelmo Soliman e às técnicas Rosália Guimarães e Liane Braum, do Serviço de Patologia do HCPA, pela sua receptividade e atenção sempre especiais, desde o recebimento do material das biópsias até o seu processamento e acondicionamento.

- aos colegas e funcionários do Serviço de Nefrologia do HCPA, pelo apoio e estímulo constantes, manifestados de diferentes formas ao longo desses anos de doutorado, e que facilitaram de alguma maneira a realização desta tese.
- à Dra. Cristina Karohl, por todo o incentivo e apoio prático incondicional, assumindo tarefas assistenciais que me permitiram em muitos momentos dar continuidade a essa tese; e pela amizade que cultivamos durante esses anos todos.
- ao acadêmico Luiz Augusto Lopes da Costa, pelo seu extenso e competente trabalho de revisão e formatação do texto e das figuras, facilitando grandemente a finalização da tese.
- ao professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por propiciarem as melhores condições de aperfeiçoamento acadêmico e de pesquisa científica, e pela orientação e suporte ao longo do curso desde o meu ingresso como aluno especial.
- à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do HCPA, pelo suporte financeiro que viabilizou a aquisição de materiais e as viagens a São Paulo.

Agradeço por outros motivos:

- aos meus pais, Arthur e Laura, pelo ambiente de amor, de estímulo e de confiança em que cresci, por tantas oportunidades intelectuais e materiais, pelo desprendimento, pelo exemplo de profissionalismo e de constante busca do conhecimento.
- aos meus irmãos Laura, Adriana, Arthur, Lígia e Marília, que compartilharam comigo “a dor e a delícia” da busca dos caminhos da felicidade.
- à Maria de Lourdes Veronese Rodrigues, pelo incentivo e pelo afeto, e que por exercer com excelência a profissão de médica, docente e pesquisadora, é um exemplo permanente para mim e para uma geração de futuros pesquisadores.
- aos colegas e amigos José Luiz Vieira, Liana de Lima Vieira, Paulo Maróstica e Emílio Moriguchi, a quem dedico um afeto especial desde o primeiro ano da faculdade, por estarem sempre próximos de minha vida pessoal e profissional.

## SUMÁRIO

	página
1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	15
2.1. Componentes da resposta imune ao enxerto renal .....	15
2.2. Mecanismos de ativação na resposta imune ao aloenxerto.....	20
2.3. Manifestações clínicas da rejeição ao aloenxerto renal.....	23
2.4. Classificação histopatológica de Banff no transplante renal .....	29
2.5. Outras classificações de rejeição no transplante renal .....	41
2.6. Identificação de marcadores de imunoativação no rim transplantado.....	42
2.7. Rejeição subclínica no transplante renal .....	50
2.8. Tratamento da rejeição aguda subclínica .....	55
3. OBJETIVOS.....	58
4. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E DA REVISÃO DA LITERATURA .....	59
5. ARTIGOS APRESENTADOS ÀS REVISTAS.....	79
5.1. Artigo 1: Can early clinical, histological, and immunohistochemical evaluations be predictive of the development of chronic allograft nephropathy?.....	80
Versão em português do artigo 1.....	107
5.2. Artigo 2: Interpretation of Surveillance Kidney Allograft Biopsies According to the Banff Criteria.....	136
Versão em português do artigo .....	138
5.3. Artigo 3: Protocol biopsies in renal transplant patients: three years of follow-up.....	147
Versão em português do artigo 3.....	158
6. ANEXOS .....	171

## SUMÁRIO DE TABELAS

página

### REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Classificação e funções das moléculas de adesão na resposta imune .....	20
Tabela 2. Classificação de Banff 1997 para rejeição aguda do rim transplantado .....	31
Tabela 3. Classificação de Banff 1997 para nefropatia crônica do enxerto.....	32
Tabela 4. Graduação de severidade da rejeição aguda na classificação de Banff 1997 .....	33
Tabela 5. Códigos numéricos da classificação de Banff 1997 para rejeição aguda.....	36
Tabela 6. Graduação de severidade da nefropatia crônica do enxerto na classificação de Banff 1997.....	37
Tabela 7. Moléculas envolvidas na rejeição aguda ao aloenxerto renal .....	47

### ARTIGO 1

Table 1. Histological diagnosis according to Banff 1997 criteria .....	102
Table 2. Demographic and clinical data for patients with and without subclinical rejection.....	103
Table 3. Serum creatinine and proteinuria levels in the groups with and without subclinical rejection .....	104
Table 4. Immunohistochemical scores in the analysis of the cellular infiltrate in patients with and without subclinical rejection .....	105
Table 5. Immunohistochemical scores in the analysis of the immune activation markers in patients with and without subclinical rejection .....	106

### ARTIGO 2

Table 1. Demographic and clinical data from transplant cohort .....	136
Table 2. Histologic findings according to the Banff schema.....	137
Table 3. Clinical findings in patients with and without subclinical rejection at 2 months .....	137



ARTIGO 3

Table 1. Demographic and clinical data of patients with and without subclinical rejection.....	155
Table 2. Serum creatinine and proteinuria in patients with and without subclinical rejection.....	156
Table 3. Scores from the immunohistochemical data in patients with and without subclinical rejection .....	157

## SUMÁRIO DE FIGURAS

página

### REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Moléculas envolvidas na interação entre a APC e o linfócito T na resposta imune.....	17
Figura 2. Mecanismos de sinalização intracelular para ativação do linfócito T .....	22
ANEXOS.....	171
ANEXO 6. Imunohistoquímica aplicada nas biópsias de protocolo do rim transplantado.....	184
Foto 1. Expressão de linfócitos T CD3 positivos, de localização intersticial e periglomerular (400x).....	184
Foto 2. Expressão de linfócitos t CD4 positivos, de localização peritubular e intersticial (400x) .....	184
Foto 3. Expressão de linfócitos T CD8 positivos, de localização peritubular e intersticial (400 x) .....	185
Foto 4. Expressão de macrófagos (células CD 68 positivas), em células tubulares e intersticiais (400 x) .....	185
Foto 5. Expressão de perforina em linfócitos citotóxicos, de localização peritubular e intersticial (400 x).....	186
Foto 6. Expressão de granzima B em linfócitos citotóxicos, em células tubulares e intersticiais (400 x) .....	186
Foto 7. Expressão de fator de crescimento transformador beta-1 (TGFβ1) em células tubulares (400 x).....	187

## LISTA DE ABREVIATURAS

HLA: antígeno leucocitário humano (“Human Leuckocyte Antigen”)

CD: “Cluster of Designation”

CPH: complexo principal de histocompatibilidade

RASC: rejeição aguda subclínica

NCE: nefropatia crônica do enxerto

RcT: receptor de célula T

APC: célula apresentadora de antígeno

CDR: região determinante de complementaridade

ICAM: molécula de adesão intercelular (“Intercellular Adhesion Molecule”)

LFA: antígeno associado a função de linfócito (“Lymphocyte Function-Associated Antigen”)

VCAM: molécula de adesão de célula vascular (“Vascular Cell Adhesion Molecule”)

VLA-4: molécula de ativação muito tardia (“Very-Late Activation Molecule”)

MAC-1: antígeno de macrófago 1 (“Macrophage Antigen-1”)

IFN- $\gamma$ : interferon-gama (“Interferon gama”)

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa (“Tumour Necrosis Factor alfa”)

Th: linfócito T auxiliar (“T helper”)

NFAT: fator nuclear de ativação da célula T (“Nuclear Factor of T Cell Activation”)

JAK: cinase da família Janus (“Janus Family Kinases”)

ADCC: citotoxicidade celular dependente de anticorpo

IL: interleucina

NK: célula “natural-killer”

OKT3: anticorpo monoclonal anti-CD3

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

TGF $\beta$ <sub>1</sub>: fator de crescimento transformador beta 1

CADI: Índice de Dano Crônico do Aloenxerto (“Chronic Allograft Damage Index”)

CDGS: Escore de Dano Crônico do Enxerto (“Chronic Damage Graft Score”)

CCTT: Estudos Clínicos Cooperativos em Transplantação (“Cooperative Clinical Trials in Transplantation”)

NIH: Instituto Nacional de Saúde (“National Institutes of Health”)

H&E: hematoxilina e eosina

PAS: ácido periódico de Schiff

PAS-M: prata metenamina

PAP: peroxidase-antiperoxidase (“Peroxidase-AntiPeroxidase”)

APAAP: fosfatase-anti-fosfatase alcalina (“Alkaline Phosphatase-Anti- Alkaline Phosphatase”)

PCR: reação de polimerização em cadeia (“Polymerase Chain Reaction”)

DNA: ácido desoxirribonucléico; DNAc: ácido desoxirribonucléico complementar

RT: transcrição reversa (“Reverse Transcription”)

RANTES: fator regulador de ativação da expressão e secreção da célula T (“Regulator Factor of the Expression and Secretion of the T cell”)

AIF-1: fator inflamatório do enxerto 1 (“Allograft Inflammatory Factor 1”)

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as formas de tratamento da insuficiência renal crônica terminal o transplante renal apresenta o maior índice de reabilitação, com taxas de sobrevida em um ano do paciente e do enxerto superiores a 95% e 90% respectivamente, em vários centros transplantadores (1, 2). Em países com alocação de rins cadavéricos por compatibilidade do sistema denominado *Human Leukocyte Antigen* (HLA), a sobrevida do enxerto em 10 anos é superior a 50%, com uma meia-vida de 12,5 anos (3).

Diversos avanços na compreensão da imunobiologia dos transplantes e a introdução de novas e potentes drogas imunossupressoras têm marcado a transplantação de órgãos nas últimas duas décadas (4, 5, 6, 7, 8). Igualmente, o caráter multidisciplinar da transplantação permitiu a introdução de múltiplos recursos diagnósticos e terapêuticos, no que se refere à prevenção e ao controle da rejeição ao aloenxerto, a profilaxia de infecções e ao manejo das complicações clínicas e cirúrgicas que outrora resultavam em uma elevada morbi-mortalidade para os pacientes transplantados (9-13).

A melhor compreensão dos mecanismos celulares e humorais que desencadeiam a rejeição aguda e levam à destruição de órgãos transplantados têm sido uma preocupação constante desde a década de 70 (14). Os primeiros estudos experimentais em ratos e em rins humanos caracterizaram a identidade, especificidade e função citotóxica das células infiltrantes em aloenxertos com rejeição aguda. Os achados histológicos mostravam um infiltrado denso no enxerto em rejeição, cuja composição era descrita por técnicas de imunofluorescência. Foram identificados linfócitos T, linfócitos B e macrófagos na proporção de 71%, 20% e 9%, respectivamente, com função citotóxica dependente de linfócitos T, mas também mediada por anticorpos secretados pelas células B (15, 16).

No início da década de 80, através de métodos de imunohistoquímica com anticorpos monoclonais, foram estudados rins transplantados com e sem rejeição aguda (17, 18). Nos rins com rejeição aguda, a proporção das subpopulações de células em

relação à área total do infiltrado cortical mostrava um predomínio de células T CD3+ (CD: *Cluster of Designation*), com maior proporção de linfócitos T CD8+, e menos de 10% de linfócitos B.

Nos enxertos sem rejeição clinicamente manifesta (17), observou-se também um infiltrado mononuclear com predomínio de células T, mas em menor número e com uma fração menor de CD8+/CD4+; monócitos e macrófagos também foram identificados em proporção substancial no infiltrado.

Este infiltrado de localização túbulointersticial e mais raramente perivascular tem sido observado quase que invariavelmente em biópsias de vigilância de rins transplantados funcionalmente estáveis, na ausência de manifestações clínicas ou laboratoriais que caracterizam a rejeição aguda ao aloenxerto (17-27). Ainda existe controvérsia se o infiltrado intersticial representa uma forma limítrofe de rejeição celular aguda ou se vai evoluir para esta condição, sendo portanto patogênico e deletério para a sobrevida do enxerto a longo prazo (23, 28-30). Alternativamente, poderia constituir um mecanismo de adaptação do receptor para aquisição de tolerância imunológica, não evoluindo para rejeição clínica e, portanto sendo desnecessária a modificação da imunossupressão diante deste achado (31-33).

Diversos estudos têm mostrado que 30% dos enxertos renais estáveis com infiltrado leucocitário têm critérios histológicos bem definidos para rejeição aguda (21-23, 28, 34), e que os pacientes com rejeição aguda subclínica (RASC) podem apresentar uma evolução clínica desfavorável, em termos de pior função do enxerto, evolução para nefropatia crônica e menor sobrevida tardia do rim transplantado (28, 29, 35). Adicionalmente, foi demonstrado um aumento da expressão de genes que codificam para moléculas citotóxicas em biópsias de rins estáveis com rejeição subclínica (30, 36, 37), evidenciando a presença de imunoativação na RASC. Segundo alguns autores, a identificação e o tratamento precoce da RASC através de biópsias de vigilância poderia modificar o curso clínico e imunológico do rim transplantado (38, 39).

Serão revisadas a seguir as bases imunológicas em nível celular e molecular da rejeição, as manifestações clínicas e o manejo diagnóstico e terapêutico desta complicação do transplante renal. A caracterização da imunoativação intraenxerto sem expressão clínica, denominada rejeição subclínica, e a discussão das repercussões deste processo no rim transplantado a longo prazo serão abordados, por constituírem o objetivo principal deste trabalho.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Componentes da resposta imune ao enxerto renal

Os antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) são determinados geneticamente, constituindo-se de glicoproteínas expressas nas superfícies das células cuja principal função é apresentar peptídeos ou antígenos aos linfócitos T, via receptor de célula T (RcT). Através desse reconhecimento, o sistema imune diferencia o que é próprio do não próprio, fenômeno denominado restrição ao CPH. Os antígenos denominados maiores, codificados por genes situados no braço curto do cromossomo seis, têm relevância para a transplantação de órgãos, em função de sua potência em desencadear rejeição aos aloenxertos (40). Atualmente sabe-se que as porções polimórficas ou antigênicas das moléculas do HLA são restritas, envolvendo a substituição de somente um a quatro aminoácidos nas regiões de hipervariabilidade ou epítomos (41).

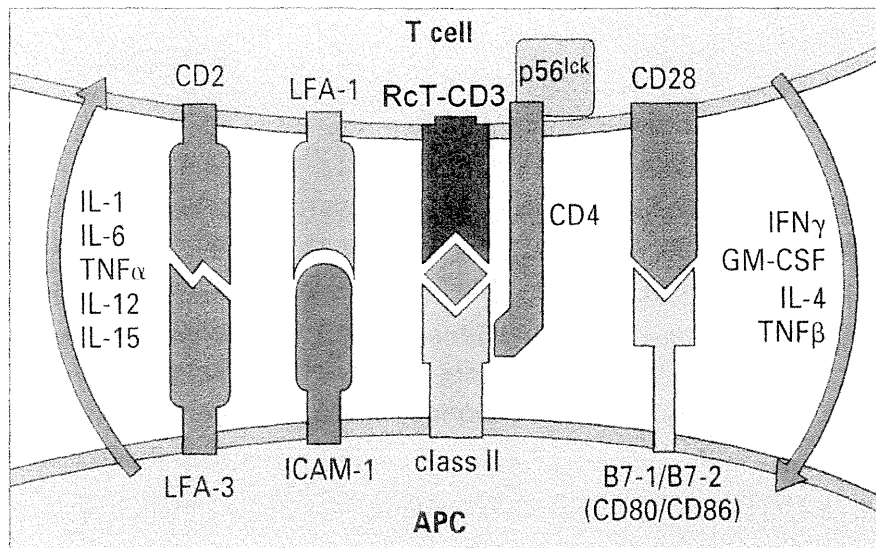
O sistema do CPH, no homem denominado *Human Leukocyte Antigen* (HLA), codifica duas classes distintas de moléculas antigênicas de superfície, denominadas classe I e classe II. Ambas as moléculas de classe I e classe II apresentam antígenos para as células T através do RcT, embora com diferenças fundamentais em sua estrutura e função.

As moléculas do CPH de classe I consistem em duas cadeias polipeptídicas, a cadeia pesada com 3 regiões de domínio extracelular - alfa ( $\alpha$ )1,  $\alpha$ 2 e  $\alpha$ 3, sendo as duas primeiras as porções variáveis que entram em contato com o antígeno e  $\alpha$ 3 a porção constante; e a cadeia leve, beta ( $\beta$ )2-microglobulina, associada às demais por ligação não covalente. Estão representados os *loci* A, B e C nesta região, cada um contendo diversos alelos. As moléculas de classe I são expressas em quase todas as células nucleadas, sendo reconhecidas especificamente pelos linfócitos CD8 positivos ou citotóxicos, com os quais se ligam através da porção não polimórfica  $\alpha$ 3 (42, 43).



As moléculas de classe II constituem-se de dois polipeptídeos inseridos na membrana celular, ligados de forma não covalente, com uma cadeia leve ( $\alpha$ ) e uma cadeia pesada ( $\beta$ ), com 2 regiões de domínio extracelular cada,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  e  $\beta 2$ . Os antígenos de classe II tem expressão mais limitada, sendo identificados em linfócitos B, macrófagos e monócitos, células dendríticas, linfócitos T ativados e eventualmente células endoteliais. Os *loci* desta região são denominados DR, DP e DQ (43). Os linfócitos CD4 positivos ou auxiliares reconhecem particularmente os antígenos de classe II, ligando-se com as porções não polimórficas  $\alpha 2$  e  $\beta 2$  da molécula de classe II nas células apresentadoras de antígenos (APCs) ou diretamente em células que são alvo para destruição imune (44). A compatibilidade entre doador e receptor nos *loci* B e DR definitivamente tem um maior impacto na sobrevida do enxerto renal após o primeiro ano do transplante (45).

Como ilustra a figura 1, múltiplos receptores de superfície e moléculas de co-estimulação estão envolvidos na interação entre o linfócito T e as células apresentadoras de antígenos, os quais serão descritos a seguir.



**Figura 1** - Moléculas envolvidas na interação entre a APC e o linfócito T na resposta imune.

As moléculas CD4 ou CD8 presentes na superfície dos linfócitos T estão próximas às moléculas do complexo denominado RcT-molécula CD3<sup>+</sup>. Estas moléculas acessórias, após interação com as APCs, participam da transdução do sinal para ativação da cadeia bioquímica intracitoplasmática.

O RcT é uma molécula heterodimérica, formada pelas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , que efetuam o reconhecimento do antígeno, mas a expressão do RcT e a ativação das células T dependem de cinco outras proteínas do complexo CD3 para transmissão do sinal de ativação para o citosol. Fazem parte deste complexo as cadeias  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  que são monômeros ligados não covalentemente ao RcT, assim como o homodímero  $\zeta$ - $\zeta$  ou eventualmente o heterodímero  $\zeta$ - $\eta$ . No segmento variável do RcT existem três regiões determinantes de complementaridade (CDR1, CDR2 e CDR3), onde ocorrem as interações entre o RcT e os complexos antígeno-porção variável da molécula do CPH no processo de reconhecimento do antígeno (46, 47).

As moléculas de adesão e outras moléculas co-estimulatórias são elementos essenciais na interação e adesão célula-célula, e também na transmissão de sinais intracelulares para ativação linfocitária (48, 49). As moléculas de adesão participam do processo de localização das células no sistema linfóide e nos sítios de inflamação. Na

tabela 1 encontra-se a classificação destas moléculas, citando-se aqui as mais importantes: 1) Superfamília das Imunoglobulinas, como ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), ICAM-2 e ICAM-3, LFA-2 (*lymphocyte function-associated antigen-2*) e LFA-3, e VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), que interagem com os seus respectivos ligantes LFA-1 (ICAM-1 e ICAM-2), LFA-3 (CD2), VLA-4 (*very-late activation molecule-4*) (VCAM-1); 2) Família das Integrinas, que é constituída pelas moléculas VLA-1 a VLA-6, LFA-1 e MAC-1 (*macrophage antigen-1*), cuja importância reside na regulação dinâmica da adesão e migração das células; 3) Selectinas, que estão envolvidas na interação inicial entre os leucócitos e as células endoteliais. As moléculas de adesão são produzidas por diversas células, como monócitos, linfócitos e macrófagos, e a sua expressão está aumentada na presença de citocinas pró-inflamatórias como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (50, 51).

Dentre as moléculas co-estimulatórias destacam-se CD28, também pertencente à superfamília das Imunoglobulinas, que está constitutivamente expressa na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e em cerca de 50% dos T CD8<sup>+</sup> (52). O seu ligante é a molécula B7 (B7-1 e B7-2), expressa na superfície das APCs. Após a ativação da célula T, outra molécula co-estimulatória denominada CTLA4 liga-se com maior afinidade que o CD28 à molécula B7, promovendo um sinal negativo para o linfócito T para término da resposta imune. Em modelos experimentais, a inibição da co-estimulação com receptores solúveis (CTLA4 Imunoglobulina) ou anticorpos monoclonais anti-B7 prolongou marcadamente a sobrevivência do enxerto, induzindo tolerância imunológica (53, 54). Recentemente, tem havido um grande interesse no papel da molécula CD40 e de seu ligante, CD40L ou CD154, como outra via co-estimulatória na rejeição ao enxerto (55). O CD40 pertence à família do receptor do TNF- $\alpha$ , e expressa-se nos linfócitos B e em outras APCs. A ligação com a molécula CD154 é crítica para a interação das células T e B, resultando na produção de imunoglobulinas pelo linfócito B, na ativação de macrófagos dependente do linfócito T e na ativação das células endoteliais. Dados experimentais têm mostrado que

o bloqueio de CD40L é efetivo para prevenir a rejeição ao aloenxerto, particularmente se associado à interrupção da via CD28/B7 (56).

Os linfócitos CD4<sup>+</sup> exercem um papel central na ativação da cascata imune, sendo divididos em duas subpopulações de células T auxiliares, T “helper” 1 (Th1) e T “helper” 2 (Th2), que produzem padrões distintos de imunomodulação e secreção de citocinas (57, 58). As células Th1 estariam envolvidas na resposta imune celular, com atividade pró-inflamatória produzindo preferencialmente as citocinas interleucina-2 (IL-2), IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , sendo associadas à reações de hipersensibilidade tardia, proliferação dos linfócitos T citotóxicos e ativação de macrófagos (59). Envolvido na resposta humoral como “auxiliar” das células B, o subgrupo Th2 produz citocinas como a IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, estimulando a produção de mastócitos, eosinófilos e imunoglobulinas, e possivelmente inibindo a via de ativação de Th1. Direcionando a resposta das células T para o subgrupo Th2 em modelos experimentais de transplantação, houve redução da ocorrência de rejeição aguda (60). Embora alguns experimentos dêem suporte ao paradigma Th1-Th2 conforme apresentado, este modelo parece ser mais complexo, não sendo universalmente aceito.

**Tabela 1** - Classificação e funções das moléculas de adesão na resposta imune.

Família	Ligantes	Função
1. Superfamília das Imunoglobulinas		
CD4, CD8	HLA Classe II, I	Ativação célula T Cooperação cél. T- cél. B Citotoxicidade
LFA-2 (CD2)	LFA-3	Ativação célula T
LFA-3 (CD58)	LFA-2	Idem, proliferação timócitos
ICAM-1 (CD54) a ICAM-3	LFA-1	Ativação céls. T, B, NK e adesão leucócito-endotélio
VCAM-1	VLA-4	Atração monócitos/linfócitos
CD28	B7-1, 2, CTLA-4	Ativação cél. T e cél. B
2. Integrinas		
Grupo $\beta_1$ : VLA1 a VLA 6	Laminina, colágeno, fibronectina	Ligação dos leucócitos à matriz extracelular
Grupo $\beta_2$ : LFA-1; MAC-1	ICAM-1, 2; C3 <sub>bi</sub> , ICAM-1	Adesão leucócitos ao endotélio
Grupo $\beta_3$ : IIB/III $\alpha$	Fibronectina, fibrinogênio	Interações plaquetas / neutrófilos no sítio de inflamação
3. Selectinas		
P-selectina	L-selectina	Retardamento, ativação e
E-selectina	L-selectina	fixação dos leucócitos à
L-selectina	E-selectina	célula endotelial

Abreviaturas: CD: *cluster of differentiation*; LFA: *lymphocyte function-associated antigen*; ICAM: *intercellular adhesion molecule*; VCAM: *vascular cell adhesion molecule*; VLA: *very-late activation molecule*; MAC: *macrophage antigen*. Adaptado de Heemann UW et al, ref. 48.

Na rejeição primária, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são essenciais para desencadear a rejeição aguda, mas se existe exposição antigênica prévia os linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos são produzidos rapidamente pela memória imunológica, sem o auxílio das células CD4<sup>+</sup> (61).

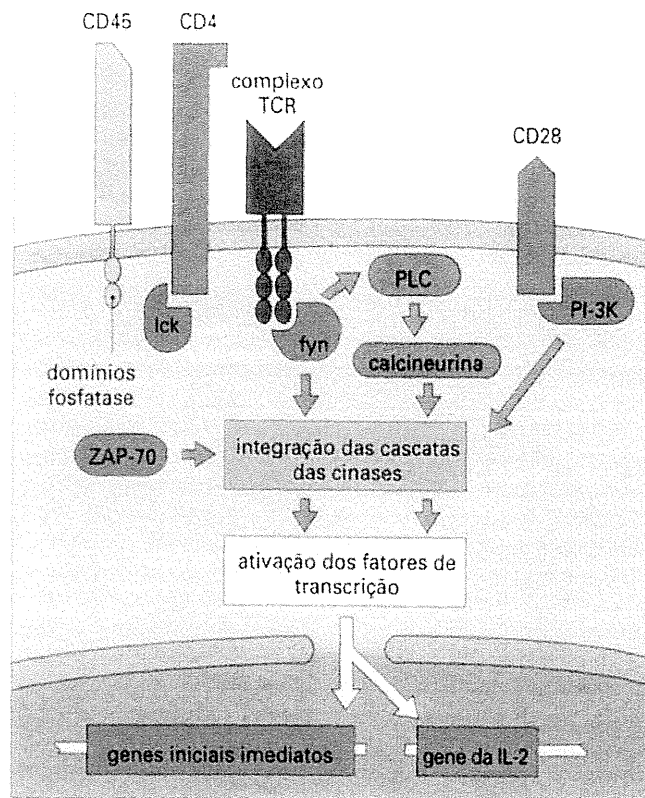
## 2.2. Mecanismos de ativação na resposta imune ao aloenxerto

A primeira etapa da resposta imune é a apresentação e o reconhecimento do antígeno, denominado de primeiro sinal. Dois mecanismos estão envolvidos neste processo, o direto e o indireto. A apresentação do antígeno pelo mecanismo indireto ocorre em cinco etapas distintas: 1) captura do antígeno estranho pelas células apresentadoras dos antígenos (APCs) do receptor, como macrófagos, linfócitos B e células dendríticas; 2)

digestão do antígeno nos proteolissossomos intracelulares em fragmentos peptídicos; 3) colocação desses peptídeos na fenda das moléculas de HLA classe II; 4) transporte do complexo molécula do CPH-peptídeo à superfície da célula; 5) apresentação às células T auxiliares CD4<sup>+</sup>. Na via direta de apresentação antigênica, os linfócitos T do receptor respondem diretamente ao complexo peptídeo aloantigênico-molécula do CPH expresso na superfície da célula do doador (62-64).

Após a interação do RcT com o antígeno e na presença de sinais co-estimulatórios descritos a seguir, ocorre a sinalização intracelular para ativação do linfócito T (figura 2). Resumidamente, enzimas como a fosfolipase C estimulam a produção de fosfatidil-inositol-bifosfato e diacilglicerol, processo dependente da desfosforilação de tirosinoquinasas como a proteína-quinase C e outras quinases dependentes de cálcio e de calmodulina. Ocorre a ativação e transcrição de genes intranucleares como NFAT (fator nuclear de ativação da célula T) e *c-fos*, e mais recentemente, JAK (*Janus family kinases*) quinases e fatores de transcrição denominados STAT. As proteínas derivadas da expressão desses genes, em associação com moléculas reguladoras da transcrição, levam a ativação de genes como o da interleucina 2, que promove a expansão do clone de linfócitos T (65, 66).

O reconhecimento do antígeno não é suficiente para a ativação do linfócito T sem a participação do segundo sinal, denominada co-estimulação. A coordenação dos vários sinais co-estimulatórios é ainda pouco conhecida, mas é claramente crítica para a montagem da resposta de ativação celular (67). A interleucina 1 (IL-1) e a interleucina 6 (IL-6) produzidas pelas APCs adicionalmente estimulam os linfócitos T auxiliares, que por sua vez produzem interleucina 2 (IL-2), um potente fator de crescimento dos linfócitos T, e expressam o receptor de IL-2 em sua superfície. A interação da IL-2 com o seu receptor, por efeitos autócrinos e parácrinos, estimula a divisão celular e a expansão clonal das células auxiliares e citotóxicas antígeno-estimuladas (67, 68).



**Figura 2** – Mecanismos de sinalização intracelular para ativação do linfócito T.

A produção de interleucina 3 (IL-3) estimula a proliferação de células precursoras, que se diferenciam em granulócitos e macrófagos. O IFN- $\gamma$ , cuja síntese é estimulada pela IL-2, aumenta a expressão de antígenos de classe I, de classe II e de ICAM-1 nas células induzíveis, aumentando a imunogenicidade dos antígenos do enxerto e ativando a função citodestrutiva dos macrófagos. Fatores de crescimento e diferenciação dos linfócitos T como IL-4, IL-5 e IL-6 são também secretados, induzindo à expansão clonal das células B e consequentemente à produção de anticorpos citotóxicos solúveis. A lesão do enxerto mediada por anticorpos envolve a ligação destes com o complemento, com agressão ao endotélio e outras células; ou pode ocorrer também diretamente, através do mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (67).

Os linfócitos citotóxicos diferenciados reconhecem os antígenos HLA classe I nas células do enxerto, processo que é facilitado pelas moléculas CD8, LFA-1 e CD2. A etapa seguinte é a ativação dos linfócitos citotóxicos, quando a IL-2 interage com a interleucina

12, sinergizando a indução da célula T citotóxica (69). São descritos dois mecanismos de destruição das células alvo pelos linfócitos T CD8+ citotóxicos. A via da exocitose é mediada por grânulos de fatores solúveis, a granzima (uma serina esterease) e a perforina (molécula tipo complemento). Estas proteínas induzem morte celular por degradação do DNA e lise osmótica secundária à formação de poros na membrana da célula alvo (70). A outra via de citólise envolve o mecanismo de apoptose, mediada pela interação entre Fas (CD95), molécula da família do TNF, e seu ligante Fas-L. A expressão de Fas e Fas-L ocorre durante a ativação das células T, e a apoptose parece estar associada a proteases de cisteína intracelulares, denominadas de CASPASE (71). Outro mecanismo de citotoxicidade na rejeição aguda é mediado pelas células NK ou *natural-killer*, que parecem não interagir previamente com o antígeno para lise das células alvo. Os macrófagos também participam do processo de rejeição, mas ainda não está estabelecido se são células efetoras ativas ou se têm um papel apenas acessório na destruição do aloenxerto.

Se não houver interrupção de toda a cascata de ativação imune descrita acima por imunossupressão farmacológica ou por outros mecanismos supressores que diminuam ou impeçam a atividade citotóxica, ocorre a destruição irreversível das células do enxerto.

### **2.3. Manifestações clínicas da rejeição ao aloenxerto renal**

A rejeição ao aloenxerto renal tem sido tradicionalmente dividida em 4 tipos, com base no mecanismo imunológico e no tempo da rejeição: hiperaguda, acelerada, aguda e crônica.

2.3.1. Rejeição hiperaguda: ocorre nas primeiras horas após o transplante, sendo decorrência da ligação de anticorpos anti-HLA previamente formados no receptor a antígenos do endotélio dos vasos do doador. Esses anticorpos em geral são detectados na prova cruzada pré-transplante. Ocorre ativação de complemento e de plaquetas, sendo desencadeados mecanismos pró-coagulantes que culminam em deposição de



fibrina e trombose intracapilar, infarto e hemorragia difusos, progredindo para necrose cortical com rápida destruição do enxerto. O tratamento é a remoção do rim em face de severa toxicidade sistêmica originada pelo tecido necrótico e pelo risco de coagulopatia de consumo (72).

2.3.2. Rejeição acelerada: tem como base mecanismos humorais, com anticorpos contra antígenos HLA do doador previamente formados, constituindo a resposta imune secundária ou de memória imunológica. Também apresenta um componente celular, mediado pelas células T. Desenvolve-se nos primeiros dois a quatro dias após o transplante, e a histologia do enxerto revela vasculite necrotizante e infiltrado celular. É uma condição na maioria das vezes irreversível, mas a terapia anti-linfocitária pode reverter a rejeição em raros casos (72).

2.3.3. Rejeição aguda: a rejeição aguda clássica desenvolve-se mais freqüentemente após a primeira semana até os três primeiros meses pós-transplante, mas pode ser mais tardia. Tem início agudo e manifesta-se por febre, mal estar, hipertensão arterial, oligúria e aumento da creatinina sérica. O enxerto pode estar aumentado de volume e ser doloroso à palpação. Na vigência de imunossupressores potentes como a ciclosporina ou o tacrolimus, o quadro clínico é discreto, podendo ser manifestado apenas por estabilização da creatinina ou ganho de peso, por exemplo (73).

O diagnóstico da rejeição aguda baseia-se no quadro clínico, exames de imagem, punção aspirativa renal e biópsia renal, e principalmente na resposta ao aumento da imunossupressão com redução da creatinina sérica pós-tratamento.

A clínica e os exames de imagem são considerados pouco sensíveis e pouco específicos para o diagnóstico diferencial da disfunção aguda do enxerto, principalmente entre rejeição e necrose tubular aguda. Na ecografia com Doppler renal observa-se uma redução do fluxo diastólico na artéria renal e nas artérias segmentares intra-renais, com aumento da resistência vascular intra-renal (74). Na cintilografia renal, detecta-se uma

menor perfusão do rim (delta P acima de 4 segundos) e uma redução na captação e na excreção do radioisótopo tecnécio-DTPA ou MAG-3 ( $t_{1/2}$  acima de 20 segundos), com curva em platô ou ascendente na rejeição severa (75).

Outro método diagnóstico alternativo é a punção aspirativa seriada do rim transplantado, que quantifica o infiltrado inflamatório intra-enxerto através do “incremento corrigido total”. Este índice é o somatório dos incrementos de células imunoativadas como plasmócitos, linfoblastos, monoblastos ou linfócitos ativados, e para cada tipo de célula é aplicado um fator de correção de acordo com a sua relevância na rejeição aguda (76, 77).

O diagnóstico definitivo da rejeição aguda é obtido pelos achados histológicos da biópsia renal percutânea. Recentemente foi proposta uma classificação denominada Banff (78), com o objetivo de padronizar as diversas lesões estruturais do rim transplantado e estabelecer de modo uniforme e reprodutível para clínicos e patologistas os diferentes graus de severidade da rejeição (79, 80). A invasão do epitélio tubular por células mononucleares (tubulite) e da parede dos vasos (arterite intimal ou transmural) são consideradas as principais alterações indicativas de rejeição aguda. Também são achados associados edema intersticial e endoteliolite, ou edema das células endoteliais dos capilares glomerulares. Em rejeições severas ocorre necrose fibrinóide das pequenas artérias e arteríolas, agregados plaquetários, trombos de fibrina e hemorragia intersticial, todos sinais de mau prognóstico usualmente presentes em rejeições irreversíveis (81).

A imunossupressão profilática da rejeição do enxerto renal mais comumente empregada em nosso meio é o esquema tríplice com corticosteróides, azatioprina e ciclosporina. Estas drogas têm amplo uso clínico, e atuam bloqueando a ativação e proliferação das células T por mecanismos diferentes (82).

Desde a década de 80, anticorpos policlonais antilinfócitos T ou antitimócitos e posteriormente anticorpos monoclonais dirigidos à molécula CD3 das células T têm sido empregados de forma eficaz como terapia de indução em esquemas quádruplos

seqüenciais com as drogas anteriormente citadas (83, 84). Na busca de uma imunossupressão mais específica, foram introduzidas na década de 90 novas e potentes drogas imunossupressoras, como micofenolato mofetil (4, 85), tacrolimus (5, 86) e sirolimus (87, 88). Após 1995, anticorpos anti-receptor de IL-2 (anti-CD25), como basiliximab (6) e daclizumab (7) têm mostrado resultados promissores como terapia de indução para prevenir ou reduzir a incidência de rejeição na fase aguda do transplante.

O tratamento da rejeição aguda estabelecida consiste inicialmente na pulsoterapia com corticosteróides, usualmente metilprednisolona endovenosa, esperando-se uma resposta clínica em 2 a 4 dias. Em rejeições córtico-resistentes, a terapia de resgate com anticorpos antilinfocitários como o anticorpo monoclonal anti-CD3, OKT3 (89), globulina policlonal antilinfocítica (90) ou antitimocítica (91) efetivamente reverte a rejeição em cerca de 80% a 90% dos casos.

A modificação do esquema imunossupressor incluindo drogas mais potentes como micofenolato mofetil em substituição à azatioprina (92), ou tacrolimus em substituição à ciclosporina (93), ou ambos (94), pode em alguns casos reverter rejeições celulares de grau severo e córtico-resistentes, quando o tratamento inicial da crise de rejeição acima descrito não foi eficaz para controlá-la.

2.3.4. Rejeição crônica: é a principal causa de perda tardia do rim transplantado, tendo atualmente um conceito mais abrangente sob o termo nefropatia crônica do enxerto. Ocorre geralmente após o 6º mês a 1 ano pós-transplante, caracterizando-se do ponto de vista clínico por uma deterioração funcional do enxerto lenta e progressiva, acompanhada de proteinúria não nefrótica e hipertensão arterial (73).

A etiopatogenia da rejeição crônica envolve mecanismos imunológicos ou antígeno-dependentes e mecanismos não imunológicos ou não dependentes de antígeno (95, 96). Os fatores clínicos com base imunológica associada ao desenvolvimento de rejeição crônica são a rejeição aguda na fase inicial e a rejeição aguda tardia (97-100), a pior compatibilidade HLA e a sensibilização prévia aos antígenos do doador (101), e a

imunossupressão insuficiente (35). Estudos em modelos animais de rejeição crônica mostram a participação de células e citocinas específicas como IFN- $\gamma$  e macrófagos (102). Modelos experimentais em ratos, empregando o bloqueio de linfócitos T com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 em transplante cardíaco (103), ou o uso de micofenolato mofetil (104) e CTLA4-Ig (105) em transplante renal, demonstram que a inibição de mecanismos celulares e humorais pode proteger funcionalmente o enxerto e também prevenir a obliteração vascular que caracteriza a rejeição crônica. Sugere-se que o dano endotelial repetido e sustentado pela agressão humoral e celular estimula a produção de citocinas inflamatórias, fatores pró-coagulantes e fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador beta (TGF $\beta$ ) (106, 107), culminando na proliferação das células musculares lisas, obliteração vascular progressiva e isquemia secundária do parênquima, manifestada por fibrose intersticial, atrofia tubular e glomeruloesclerose.

Diversos fatores não imunológicos parecem estar envolvidos no desenvolvimento da rejeição crônica, motivo pelo qual se emprega atualmente o termo mais abrangente nefropatia crônica do enxerto, com base em sua etiologia multifatorial. Na fase inicial, qualidade do tecido renal do doador (idade, injúria isquêmica pelas complicações do estado de morte encefálica), remoção e implante do rim e injúria da isquemia-reperfusão; mais tardiamente, o efeito da incompatibilidade de tamanho renal entre doador e o receptor (“dose de néfrons”), hipertensão arterial, nefrotoxicidade por drogas principalmente ciclosporina, hiperlipidemia, doença recorrente, refluxo vesicoureteral e infecção por citomegalovírus, por exemplo, são condições associadas à disfunção crônica e fibrose progressiva do enxerto renal (108). A redução da massa de néfrons, presente quando existe desproporção entre sexo e/ou tamanho do doador e do receptor, induziria seqüencialmente hiperfiltração, hipertensão e esclerose intraglomerular, alterações que foram demonstradas experimentalmente em ratos (109). Entretanto, existem poucas evidências de que a esclerose focal é o principal mecanismo de

progressão na nefropatia crônica do enxerto em humanos, assim como ainda é controversa a relação causal dos demais fatores acima citados com rejeição crônica (108).

Os achados histológicos específicos na nefropatia crônica do enxerto são o espessamento fibroso da íntima das arteríolas, alterações degenerativas da camada média com ruptura e duplicação da lâmina elástica interna, ocasionando estreitamento e oclusão dos capilares peritubulares. A membrana capilar glomerular está espessada e eventualmente tem duplo contorno, e a lesão progride para esclerose segmentar ou global devido à isquemia progressiva. Infiltrado linfomonocitário de distribuição focal freqüentemente está presente no interstício. Entretanto, a graduação da severidade da rejeição crônica baseia-se na extensão da fibrose intersticial e da atrofia tubular invariavelmente presente (81).

Recentemente foi proposto o conceito de senescência acelerada como mecanismo etiopatogênico de rejeição crônica, em que a carga acumulada de injúria ao enxerto esgota a possibilidade de reparação do tecido, havendo um declínio da função das células endoteliais e atrofia epitelial progressiva. A agressão persistente ao enxerto leva à formação de fibrose através de mediadores inflamatórios como TGF $\beta$  e outras citocinas (108).

O tratamento imunossupressor da rejeição crônica ainda é ineficaz, havendo uma progressão inexorável para perda do enxerto. Recentemente, alguns autores em estudos experimentais e clínicos especulam sobre o efeito protetor do micofenolato mofetil (110) e do sirolimus (111, 112) na redução da progressão ou mesmo na prevenção da rejeição crônica. No presente momento, recomenda-se a utilização de medidas não imunológicas como controle rigoroso da hipertensão arterial (113) e da hiperlipidemia (114) e o uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (115), mas ainda são necessários ensaios clínicos que demonstrem a eficácia destas medidas na prevenção da nefropatia crônica do enxerto.

## 2.4. Classificação histopatológica de Banff no transplante renal

A biópsia percutânea do rim transplantado continua sendo o método padrão-ouro para o diagnóstico diferencial da disfunção aguda do enxerto. Estudos comparando a sensibilidade e especificidade da biópsia renal com outros métodos diagnósticos - punção aspirativa, ecografia com Doppler e cintilografia - evidenciaram a superioridade da biópsia no diagnóstico de rejeição aguda (116, 117).

A biópsia percutânea é um procedimento seguro que pode ser realizado em nível ambulatorial e freqüentemente sem orientação ecográfica, e apresenta um baixo índice de complicações com os dispositivos automatizados que atualmente são empregados para a retirada de tecido (118, 119).

A informação proveniente da biópsia pode modificar a impressão clínica e o tratamento da disfunção aguda do enxerto em cerca de 40% dos pacientes, evitando os riscos de imunossupressão desnecessária (120-123). No nosso meio, Manfro e cols. (124), avaliando 95 biópsias em 67 pacientes transplantados renais, verificaram que 29,5% das impressões diagnósticas pré-biópsia foram modificadas pela histologia, e que 37,9% das biópsias geraram uma mudança de conduta, mais freqüentemente a suspensão da pulsoterapia com corticosteróides.

Até recentemente não existia uma padronização na interpretação da histopatologia do enxerto renal, principalmente em relação à graduação de severidade das alterações associadas à rejeição. Em 1991, um grupo de patologistas, nefrologistas e cirurgiões de vários centros transplantadores reuniram-se em Banff, Canada, para elaborar uma nova classificação da patologia do transplante renal, publicada em 1993 (78). Esta classificação preliminar foi revisada em 1995 (125) e posteriormente em 1997 (126), sendo essa formulação mais recente, apresentada na tabela 2 (rejeição aguda) e na tabela 3 (rejeição crônica), a atualmente empregada em diversos centros transplantadores em todo o mundo.

A necessidade de critérios quantitativos das alterações do enxerto renal para uma avaliação mais acurada de novas drogas imunossupressoras e esquemas terapêuticos alternativos foi um dos objetivos da classificação de Banff, então adotada em vários estudos multicêntricos internacionais (4-7, 86-88, 127).

**Tabela 2** - Classificação de Banff 1997 para rejeição aguda do rim transplantado.

---

1. Rejeição mediada por anticorpos

Imediata; Retardada

2. Suspeita de rejeição (alterações limítrofes)

Infiltrado mononuclear focal

Tubulite leve: t1 (1-4 células mononucleares/secção tubular)

3. Rejeição aguda

Tipo I – “túbulointersticial” (t, i)

A. Leve: infiltrado intersticial em < 25% da área cortical; tubulite moderada

B. Moderada a severa: infiltrado em > 25%; tubulite moderada a severa

Tipo II – “vascular” com arterite da íntima (v)

A. Leve a moderada (v1): arterite leve/moderada em pelo menos 1 vaso

B. Severa (v2): arterite severa em pelo menos 1 vaso (obstrução de 25% da luz)

Tipo III – “transmural” - arterite severa: > 1 vaso afetado ou alterações fibrinóides e/ou arterite transmural; necrose das células musculares lisas da média (v3)

---

2.4.1. Adequação do fragmento e processamento

Na conferência de Banff de 1997 foram definidos critérios mínimos de representatividade da amostra de tecido renal assim como as colorações que devem ser utilizadas no processamento do material (126). O fragmento é considerado adequado se tiver pelo menos 10 glomérulos e uma artéria, mas pode-se estabelecer o diagnóstico de rejeição em amostras que contenham só medula renal, embora a sua graduação fique prejudicada.

Para uma avaliação adequada do material o corte deve ser fino, de 3 a 4 micrômetros de espessura. Cada fragmento deve ser processado em no mínimo sete lâminas, sendo 3 com a coloração de hematoxilina e eosina (H&E), 3 com ácido periódico



de Schiff (PAS) e/ou prata (PASM), e 1 tricrômico. O PAS define com precisão a membrana basal tubular permitindo avaliar acuradamente a invasão da célula tubular por mononucleares (tubulite), a atrofia tubular, a hialinose arteriolar e a presença de mononucleares na luz capilar glomerular (glomerulite). O tricrômico define as alterações crônicas de fibrose no interstício e na parede vascular (81).

**Tabela 3** - Classificação de Banff 1997 para nefropatia crônica do enxerto.

---

A. Critérios essenciais para diagnóstico:

1. Espessamento fibroso da íntima das artérias com ruptura da lâmina elástica interna (cv)
2. Fibrose intersticial (ci)
3. Atrofia tubular (ct)
4. Glomerulopatia crônica do transplante (cg) – alteração 2ª à isquemia crônica (opcional)

B. Tipos

Grau I: leve - ct1 e ci1 em < 25% da área cortical; cg1; cv1

Grau II: moderada - ct2 e ci2 - 25% a 50%; cg2; cv2

Grau III: severa - ct3 e ci3 - > 50%; cg3; cv3

---

2.4.2. Avaliação semiquantitativa das alterações do enxerto renal no esquema Banff

As alterações dos componentes maiores do parênquima renal – glomérulo (g), interstício (i), túbulos (t) e vasos (v) - e também a hialinose arteriolar (ah) são graduadas em uma escala semiquantitativa. A codificação g, i, t e v é acompanhada de um escore numérico que varia de 0 a 3, dependendo da severidade e/ou extensão da alteração histológica. As alterações crônicas recebem a letra “c” antes de cada categoria (cg, ci, ct e cv). Por exemplo, uma biópsia totalmente normal é graduada como g0, i0, t0 e v0 e cg0, ci0, ct0 e v0 para alterações agudas e crônicas, respectivamente (81). Os critérios para graduação histológica de rejeição aguda do rim transplantado pelo Banff 1997 são apresentados na tabela 4.

As alterações glomerulares agudas consistem de glomerulite endocapilar, definida por um aumento do número de células mononucleares na luz do capilar glomerular, e edema de células endoteliais. A glomerulite é um achado descrito em cerca de 13% das biópsias nos primeiros três meses pós-transplante, mas não constitui um critério diagnóstico de rejeição celular aguda. Está associada com rejeição mediada por anticorpos, e ainda é discutível a sua influência na sobrevida tardia do enxerto (128, 129).

**Tabela 4 - Graduação de severidade da rejeição aguda na classificação de Banff 1997.**

---

1. Tubulite (t):

t0: sem células mononucleares nos túbulos

t1: focos de 1 a 4 células por secção tubular ou 10 células tubulares

t2: focos com 5 a 10 células (idem)

t3: focos com > 10 células (idem) ou 2 áreas de destruição da membrana basal tubular (c/ t2 e i2 ou i3)

2. Inflamação intersticial (i):

i0: < 10% do parênquima ou área cortical com infiltrado intersticial

i1: 11% a 25%; i2: 26% a 50% da área cortical com infiltrado intersticial

i3: > 50% da área cortical com infiltrado intersticial

i\*: número significativo de eosinófilos, polimorfonucleares ou plasmócitos (especificar)

3. Vasos (v):

v0: sem arterite; v1: arterite da íntima leve a moderada em pelo menos 1 vaso

v2: arterite da íntima moderada a severa em pelo menos 1 vaso (25% da luz ocluída)

v3: arterite da íntima severa > 1 vaso e/ou arterite "transmural", alterações fibrinóides e necrose das céls. musc. lisas da média, infarto e hemorragia intersticial (v\*)

---

A inflamação intersticial é graduada pela extensão de parênquima renal (córTEX e medula) sem esclerose que está infiltrado por células mononucleares. O infiltrado difuso na cortical é altamente sugestivo de rejeição aguda (81). Entretanto, a presença de agregados focais de linfócitos e monócitos no interstício é um achado freqüente em enxertos funcionalmente estáveis, sendo considerado um achado não específico para rejeição (19-

23). Igualmente, edema intersticial, infiltrado mononuclear perivenular ou em zona subcapsular não são considerados elementos para quantificação de rejeição no esquema Banff, pois constituem alterações inespecíficas, às vezes decorrentes da manipulação do fragmento.

Na revisão da classificação de Banff em 1995 (125) foi incluído o uso de um asterisco (\*) para discriminar a presença de polimorfonucleares, eosinófilos e plasmócitos. A presença dessas células no glomérulo ou em capilares peritubulares é sugestiva de rejeição humoral ou rejeição celular severa com arterite e infarto, sendo associada a uma resposta pobre ao tratamento imunossupressor (130). Na caracterização do infiltrado, a imunofenotipagem das células é um procedimento útil para o diagnóstico diferencial de rejeição, infecção e doenças linfoproliferativas, em que predominam células CD4+ e CD8+, linfócitos B e agregados de plasmócitos atípicos, respectivamente. Entretanto, em função do custo e do tempo de execução, não é uma técnica realizada rotineiramente e ainda não foi formalmente incorporada na classificação de Banff para o diagnóstico histopatológico do enxerto renal (81).

O critério diagnóstico de rejeição aguda e a graduação de sua severidade no esquema Banff é baseado no infiltrado inflamatório que invade os túbulos (tubulite) e artérias (arterite). A tubulite é a invasão do epitélio tubular não atrófico por linfócitos ou macrófagos, ultrapassando a membrana basal intacta e localizando-se dentro da célula, entre as células tubulares ou na luz tubular, e são tipicamente rodeados por um halo claro. No grau mais severo de tubulite (t3) pode ocorrer ruptura e desintegração da membrana basal. A tubulite apresenta uma melhor correlação com a severidade da rejeição aguda do que o infiltrado de células mononucleares no interstício, e parece ser um achado específico de rejeição (131).

A arterite da íntima caracteriza-se pelo espessamento da íntima dos vasos resultante de edema e da permeação subendotelial de linfócitos, macrófagos e plasmócitos. A graduação de sua severidade é baseada na extensão das alterações inflamatórias no

vaso mais afetado e/ou pelo número total de vasos comprometidos, variando de raras células (v1) até a invasão transmural do vaso com necrose do endotélio, trombose e hemorragia intersticial (v3) (131). Desde a década de 70, a arterite da camada íntima é descrita como a lesão patognomônica de rejeição aguda (132). As alterações inflamatórias mais raramente são observadas em arteríolas – arteriolite – em associação com rejeição aguda (133), mas esse achado tem significado ainda indefinido e não foi incluído na classificação de Banff. O espessamento hialino arteriolar é positivo ao PAS, e se tiver um padrão nodular na periferia das arteríolas é uma lesão altamente sugestiva de toxicidade por ciclosporina. É considerado um achado inespecífico, pois também ocorre em rins nativos ou transplantados com lesões associadas à hipertensão e a diabetes (81).

A última revisão da classificação de Banff foi em 1997, quando foram feitas alterações substanciais em relação ao esquema de 1993-1995 (126). A rejeição hiperaguda foi então denominada “Rejeição Mediada por Anticorpos”, implicando na presença de anticorpos anti-HLA pré-formados. Em substituição à categoria “Alterações Borderline” foi introduzido o termo “Suspeita de Rejeição”. O significado clínico e imunológico desta condição ainda permanece controverso, e depende da indicação da biópsia, como por exemplo, disfunção aguda do enxerto ou biópsia de protocolo em enxerto funcionalmente estável (134). O achado histológico de tubulite limítrofe e um infiltrado intersticial discreto no contexto de disfunção do enxerto tendo-se excluído outras causas, pode representar rejeição aguda justificando-se então o tratamento com corticosteróides (135), embora outros autores discordem desta conduta (32).

A classificação de rejeição aguda no esquema Banff 1997 baseia-se nos mecanismos imunopatológicos, sem necessariamente refletir o grau de severidade no momento da biópsia. O Tipo I inclui as rejeições túbulo-intersticiais, o Tipo II descreve o componente de arterite intimal (rejeição vascular) e o Tipo III caracteriza os casos severos em que há arterite transmural e/ou alterações fibrinóides da camada média (126).

O grau de severidade da rejeição é identificado pelas subdivisões de código numérico: IA = t2; IB=t3; IIA=v1; IIB=v2 e III=v3, sendo A um caso mais leve do que B, e a

gravidade definida para cada componente do parênquima em uma escala crescente de 1 a 3 da análise semiquantitativa (tabela 5). Em casos de biópsias que evidenciem rejeição com componente vascular e túbulo-intersticial, o diagnóstico de rejeição vascular é o principal; a ausência de tubulite e de infiltrado intersticial na presença de arterite deve sempre levantar a suspeita de que a rejeição possa ser mediada por anticorpos (131).

**Tabela 5** - Códigos numéricos da classificação de Banff 1997 para rejeição aguda

CÓDIGO	CATEGORIA
i(0-3) t(1) ou i(1) t(2)	Suspeita de rejeição
i(2-3) t(2) v(0)	Rejeição tipo I A
i(2-3) t(3) v(0)	Rejeição tipo I B
V (1)	Rejeição tipo II A
V (2)	Rejeição tipo II B
V (3) / v *	Rejeição tipo III

As alterações crônicas do enxerto renal são classificadas no esquema Banff sob o termo genérico nefropatia crônica do enxerto (tabela 3), que inclui rejeição crônica, nefrotoxicidade crônica por ciclosporina, doença vascular hipertensiva e infecção urinária crônica/nefropatia de refluxo, freqüentemente indistinguíveis do ponto de vista histológico. São classicamente descritos o espessamento fibroso da íntima das artérias, com ruptura e reduplicação da lâmina elástica interna, alargamento do espaço subendotelial, expansão mesangial, edema das células endoteliais, interposição periférica do mesângio e ocasionalmente crescentes celulares e adesões do tufo glomerular à cápsula de Bowman (126).

A severidade da nefropatia crônica do enxerto é definida pelo grau de fibrose e atrofia tubular associados: leve (I), moderado (II) e severo (III), como mostra a tabela 6. As alterações túbulo-intersticiais são menos sujeitas a erro de amostragem e parecem predizer com maior acurácia a evolução tardia do enxerto (136-138). As alterações glomerulares são secundárias, caracterizadas por alargamento do espaço subendotelial, expansão da matriz mesangial e interposição periférica do mesângio.

**Tabela 6** - Graduação de severidade da nefropatia crônica do enxerto na classificação de Banff 1997.

- 
1. Glomerulopatia crônica (cg): espessamento da membrana basal e duplo contorno em < 10% das alças capilares periféricas  
 cg 0: sem cg; cg 1: leve (em < 25% dos glomérulos não esclerosados)  
 cg2: moderada (em 26%-50%); cg 3: cg severa (em > 50%)
  
  2. Túbulo-interstício (ct, ci): atrofia e/ou perda tubular, fibrose intersticial, células inflamatórias ocasionais  
 ct 0: sem atrofia ou perda tubular; ct 1: leve (< 25% dos túbulos corticais)  
 ct 2: moderada (> 25% e < 50%); ct 3: severa (> 50%)  
 ci 0: sem fibrose intersticial; ci 1: leve (> 6% e < 25% do interstício)  
 ci 2: moderada (> 25% e < 50%); ci 3: severa (> 50%)
  
  3. Vasos (cv): cv 0: sem alterações vasculares  
 cv 1: espessamento fibroso da íntima leve (até 25%), fragmentação da lâmina elástica interna dos vasos; cv 2: moderado (26% a 50%); cv 3: severo (> 50%)
  
  4. Matriz mesangial (mm): espaço mesangial > espaço de 2 células mesangiais em 2 lóbulos glomerulares = expansão mesangial moderada  
 mm 0: ausência de aumento da mm; mm 1: < 25% dos glomérulos não esclerosados  
 mm 2: de 26% a 50%; mm 3: > 50%
- 

Nem o tipo de lesão nem o tempo de evolução do transplante renal são parâmetros suficientemente acurados para diferenciar alterações de fase precoce (agudas) daquelas de fase tardia (crônicas), pois a rejeição aguda pode ocorrer vários meses a anos após o transplante e a nefropatia crônica do enxerto dentro dos primeiros 3 meses (29).

#### 2.4.3. Validação clínica e reprodutibilidade da classificação de Banff

Além de uniformizar uma nomenclatura para a patologia do transplante renal, foi também objetivo da classificação de Banff melhorar a reprodutibilidade e a acurácia do diagnóstico histopatológico, especialmente em relação ao diagnóstico de rejeição aguda. O

estudo ideal para avaliar a reprodutibilidade do esquema Banff deveria envolver um grande número de casos representativos de todo o espectro de alterações da rotina dos serviços de Patologia nessa área, avaliados por um grande número de patologistas renais, e tendo como padrão-ouro os diagnósticos corretos validados retrospectivamente pela clínica (139). Apesar da complexidade dos escores e graduações do esquema Banff, diversos estudos confirmaram a acurácia, reprodutibilidade e a sua utilidade clínica como fator preditivo da evolução do enxerto renal (80 140-142). Do ponto de vista metodológico, a crítica a estes trabalhos refere-se à utilização de um grupo seletivo de patologistas renais para a análise histológica, previamente treinados para estabelecer escores de Banff e com motivação para a pesquisa científica, o que não reproduz a prática usual dos centros de Patologia vinculados a unidades de Transplante Renal.

Solez e cols. (80), através da análise de 77 biópsias realizadas nos primeiros 3 meses pós-transplante, avaliaram a reprodutibilidade da classificação de Banff e a correlação da graduação de severidade histológica com a sobrevida do enxerto em 1 ano. Estes autores relataram um grau de concordância de 82% para a presença ou ausência de rejeição aguda ( $k = 0,62$ ), com uma sobrevida do enxerto em 1 ano de 90% e 64% para rejeição grau 1 a 2A (só tubulite) e 2B a 3 (arterite intimal), respectivamente. O valor preditivo positivo do método considerando o desfecho enxerto funcional ao final do primeiro ano de transplante foi 90% (rejeição grau 1) e 65% (rejeição grau 2 ou 3). Em outro estudo (79), os mesmos autores mensuraram a reprodutibilidade de Banff para os escores de alterações agudas nas mesmas biópsias utilizando o teste kappa. O valor de kappa foi aceitável para a presença de vasculite ( $k = 0,47$ ), mas pobre para inflamação intersticial ( $k = 0,33$ ) e tubulite ( $k = 0,35$ ) e muito pobre para glomerulite ( $k = 0,26$ ) e hialinose arteriolar ( $k = 0,18$ ). Para graduação de severidade da rejeição o kappa foi aceitável (0,40), e o grau de concordância foi excelente para presença ou ausência de rejeição aguda e para presença ou ausência de vasculite, com valores de kappa de  $k = 0,56$  e  $k = 0,66$  respectivamente. Dooper e cols. (140) obtiveram uma concordância de 77% entre o diagnóstico histológico pelo Banff e o diagnóstico clínico da disfunção do enxerto, mas a acurácia do Banff foi

menor para discriminar infiltrado limítrofe de rejeição celular aguda: 37% dos pacientes com alterações *borderline* na biópsia tiveram rejeição clínica, e 47% daqueles com rejeição aguda histológica não apresentaram clínica ou resposta terapêutica compatível com esta condição, evidenciando uma menor especificidade do Banff para o diagnóstico de rejeição aguda.

Em contraste, Dean e cols.(143) descreveram uma concordância de 41% entre a terminologia descritiva convencional e a classificação de Banff. Mais de metade das biópsias apresentou uma graduação de Banff menor do que a graduação convencional, sendo maior a discrepância entre as categorias alterações limítrofes e rejeição aguda leve. Na rejeição severa a concordância foi 67% e 65% para os graus 2 A (moderada) e 2 B (moderada a severa), respectivamente, em acordo com os dados de Dooper e cols. A validade externa destes resultados ainda é questionada, sendo necessários estudos multicêntricos locais que testem a acurácia e a reprodutibilidade da classificação de Banff no nosso meio. Adicionalmente, deve-se ressaltar que esses estudos foram realizados com biópsias do enxerto renal indicadas por alterações clínicas, não havendo estudos que avaliem a reprodutibilidade da classificação de Banff em biópsias de protocolo.

A validação clínica do esquema Banff também foi testada em outros estudos, a partir da análise de correlação entre índices derivados da soma dos escores semiquantitativos de Banff com a reversão dos episódios de rejeição aguda, com o nível de função e com a sobrevida tardia do rim transplantado (28, 35, 141, 144, 145). Gaber e cols. (141, 144) obtiveram escores numéricos em 56 biópsias de receptores de rim cadavérico e doador vivo com diagnóstico de rejeição aguda. Os escores médios foram 1,6, 3,3, 4,2 e 8,5 para alterações *borderline*, rejeição grau I, II e III, respectivamente; estes índices foram discriminantes para alterações limítrofes e rejeição grau III, mas não o foram para os graus I e II. Pacientes com escores inferiores a 4 tiveram uma boa resposta ao tratamento com corticosteróides; escores superiores a 4 ou presença de arterite intimal na biópsia foram fatores preditivos de cortico-resistência, e escores maiores do que 8 foram preditivos de rejeição irreversível.



As alterações crônicas do enxerto renal descritas no esquema Banff ainda não foram testadas quanto a sua validação clínica e reprodutibilidade. A graduação semiquantitativa da nefropatia crônica do enxerto do esquema Banff possivelmente tenha importância prognóstica, mas faltam estudos que comprovem esta hipótese. Isoniemi e cols. (146) desenvolveram um índice alternativo, o “Índice de Dano Crônico do Aloenxerto” (CADI), a partir da soma de escores semi-quantitativos de fibrose e inflamação intersticial, aumento da matriz mesangial, esclerose glomerular, proliferação da íntima dos vasos e atrofia tubular. Estes autores demonstraram em rins funcionalmente estáveis uma correlação estatisticamente significativa entre o CADI mensurado em biópsias de protocolo aos 2 anos pós-transplante e a função do enxerto aos 6 anos (147). Um escore semelhante foi desenvolvido por um grupo sueco (138), o “Escore de Dano Crônico do Enxerto” (CDGS), aplicado em biópsias de protocolo mais precoces, aos 6 meses pós-transplante. Foi demonstrada uma forte associação entre o CDGS e o risco de perda do enxerto aos 2 e 3 anos pós-transplante; neste período, pacientes com escores maiores apresentaram creatinina e proteinúria significativamente mais elevadas. Aos 3 anos pós-transplante, 29% dos pacientes com CDGS maior ou igual a 6 perderam o enxerto, o que ocorreu em apenas 4% daqueles com escores menores do que 6 ( $p < 0,05$ ).

Se os valores preditivos destes índices ou dos escores de cronicidade derivados da classificação de Banff forem corroborados em estudos multicêntricos, estabelecendo-se um ponto de corte para maior risco de perda do enxerto, é possível que pacientes com escores elevados em biópsias durante o primeiro ano de transplante necessitem de medidas clínicas e farmacológicas mais agressivas, visando a prevenção de rejeição crônica e perda tardia do enxerto.

Durante a “Fifth Banff Conference on Allograft Pathology”, realizada em Banff em maio de 1999, novos temas foram discutidos, entre os quais a descrição de novas lesões como o desdobramento e a laminação da membrana basal de capilares peritubulares, a associação dessas lesões com dano imunológico ao endotélio e com a glomerulopatia do transplante, o uso rotineiro de marcação de colágeno nas áreas de fibrose com coloração

de picrosírius, o significado da glomerulite aguda na rejeição humoral e a marcação na imunofluorescência para a fração do complemento C4d no diagnóstico das rejeições mediadas por anticorpos. A classificação de Banff da patologia de transplantes continua aberta a modificações, a partir da experiência e da discussão entre profissionais envolvidos com transplantação de órgãos.

## **2.5. Outras classificações de rejeição no transplante renal**

Em função de dificuldades para a rotinização da classificação de Banff devido a sua complexidade e limitações discutidas acima, outro grupo de patologistas, participantes do estudo multicêntrico denominado “Cooperative Clinical Trials in Transplantation” (CCTT) patrocinado pelo National Institutes of Health (NIH) americano, desenvolveram um sistema alternativo para o diagnóstico histológico da rejeição aguda do enxerto renal (148). Três categorias de rejeição aguda foram estabelecidas: 1) Tipo I: infiltrado mononuclear em  $\geq 5\%$  de área cortical, um total de pelo menos três túbulos com tubulite em dez campos consecutivos nas áreas mais severamente afetadas, e pelo menos duas das seguintes alterações – edema, linfócitos ativados ou dano tubular; 2) Tipo II: endoteliolite arterial ou arteriolar, com ou sem os achados precedentes; 3) Tipo III: necrose fibrinóide arterial ou inflamação transmural com ou sem trombose, necrose de parênquima ou hemorragia. Com base nestes critérios, os autores propuseram ser a CCTT uma classificação simples, reproduzível e com validade clínica estabelecida.

Neste estudo multicêntrico (148), a análise pelos critérios da CCTT de centros de patologia foi comparada com um “painel diagnóstico” composto por três patologistas, cegos aos dados clínicos, ao centro de origem e ao diagnóstico dos centros. Considerando a análise de 286 biópsias, o grau de concordância obtido foi 90% para presença ou ausência de rejeição (Kappa=0,80), 80% e 83% para rejeição tipo I e tipo II respectivamente e 91% para presença ou ausência de endoteliolite (Kappa=0,65). A sensibilidade e a especificidade

da CCTT foi 86% e 72% respectivamente para o diagnóstico de rejeição em relação à evolução clínica como padrão-ouro. A correlação entre severidade da rejeição clínica e graduação histológica foi excelente, sendo a razão de chances (RC) para grau de severidade clínica no tipo I de 6,2 e no tipo II de 37,9; os achados de endoteliolite (RC = 13,2), hemorragia intersticial (RC = 13,2) e glomerulite (RC = 3,7) correlacionaram-se significativamente com a severidade clínica da rejeição, o que não ocorreu com a extensão da tubulite e do infiltrado intersticial.

A modificação do esquema Banff para rejeição aguda em 1997 aproximou substancialmente as duas classificações, correspondendo a rejeição aguda túbulo-intersticial de Banff ao Tipo I da CCTT, a rejeição vascular ao tipo II e a rejeição vascular transmural (com ou sem infarto e hemorragia) ao tipo III (Banff e CCTT, respectivamente). Em estudo retrospectivo, Bates e cols. (149) comparando o valor prognóstico das duas classificações, verificaram que os resultados foram superponíveis, sendo a sobrevida do enxerto em 5 anos de 78% para o tipo I ou túbulointersticial (categoria 1 e 2A de Banff), 61% para o tipo II ou vascular (categoria 2B de Banff) e 6% para o tipo III ou vascular transmural (categoria 3 de Banff). Correlação semelhante entre tipo histológico e prognóstico foram descritos em outro estudo (150), em que a sobrevida do enxerto renal em 5 anos foi superior para o tipo I, intermediária para o tipo II e pobre no tipo III.

## **2.6. Identificação de marcadores de imunoativação no rim transplantado**

### **2.6.1. Métodos de identificação antigênica**

Os métodos imunoenzimáticos são amplamente utilizados para localização de constituintes antigênicos em cortes de tecido congelado a  $-70^{\circ}$  C, de bloco de parafina e em aspirados de células. Uma enzima atua sobre um substrato produzindo um composto insolúvel e visível no local da reação antígeno-anticorpo, cuja cor depende do cromogênio empregado (151). Atualmente, as técnicas de imunohistoquímica para

tecidos humanos utilizam anticorpos monoclonais primários desenvolvidos em camundongo, anticorpos secundários (“ponte”) desenvolvidos em coelho e mais comumente a enzima peroxidase (152), a fosfatase alcalina (153) ou o sistema estreptavidina-biotina (154).

O método peroxidase-antiperoxidase (PAP) utiliza quatro reagentes: anticorpo monoclonal primário e secundário, anticorpo “ponte” e o complexo PAP (enzima peroxidase e um anticorpo anti-peroxidase). O anticorpo primário (anti-humano, desenvolvido em camundongo) é específico para o antígeno; o anticorpo secundário (anti-camundongo, desenvolvido em coelho) é adicionado, ao qual se liga o anticorpo “ponte” (anti-coelho, desenvolvido em porco), onde se ligará o complexo PAP. A enzima peroxidase é visualizada através da reação entre substrato e cromogênio, que pode ser a 3-3'-diaminobenzidina ou o 3-amino-9-etilcarbazol, revelando o complexo antígeno de interesse-anticorpo primário no sítio antigênico; a última etapa é a contracoloração do tecido com hematoxilina de Harris ou de Mayer (152).

Na técnica da fosfatase-anti-fosfatase alcalina (APAAP), o princípio é semelhante, porém antes da incubação é utilizado soro não imune para impedir a ligação inespecífica de anticorpos ao tecido em análise (“background”). O anticorpo “ponte” é o anticorpo secundário que se liga diretamente ao complexo APAAP. O substrato utilizado é o naftol e o cromogênio é o “fast red”, para revelação do sítio antigênico em cor vermelho brilhante.

Na técnica PAP há necessidade de bloqueio prévio da peroxidase endógena com metanol e água oxigenada para não obscurecer a reação enzimática, evitando assim a marcação inespecífica. Diferente do tecido em parafina, no tecido congelado este bloqueio pode desnaturar muitos antígenos, ou mesmo ser ineficiente. O método APAAP apresenta a vantagem de não ter esta interferência, sendo uma técnica adequada para antígenos de superfície de membrana em rim, fígado, osso e especialmente aspirado de células. O bloqueio da fosfatase alcalina endógena é facilmente efetuado com

levamisole, e a técnica pode ser utilizada para dupla marcação antigênica simultânea (153, 155).

O método da estreptavidina-biotina utiliza a alta afinidade da estreptavidina pela biotina, em que esta se fixa nos sítios de ligação da estreptavidina. Tanto o complexo ABC pré-formado (estreptavidina-biotina-peroxidase) quanto o LAB (estreptavidina marcada por peroxidase ou fosfatase alcalina) necessitam de um anticorpo secundário “ponte” ligado covalentemente à biotina, ou biotinilado, para revelação antigênica. A seqüência da reação é aplicação do anticorpo primário, anticorpo secundário biotinilado, complexo ABC ou LAB, e a solução do substrato. Tecidos como rim e fígado contêm biotina endógena que deve ser bloqueada previamente com avidina. A técnica LAB é considerada mais sensível do que a PAP e a ABC para detecção antigênica (152, 156).

Através da utilização de anticorpos monoclonais contra epítopos específicos, pode-se diferenciar subpopulações de células, como linfócitos T, linfócitos B, macrófagos e monócitos. Adicionalmente, as técnicas imunohistoquímicas permitem a detecção de marcadores de ativação celular presentes no parênquima renal, como por exemplo, citocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento. As limitações da técnica envolvem o seu limite de sensibilidade para identificação de, por exemplo, citocinas com baixo nível de expressão ou quando estas não se encontram ligadas à membrana celular, dificultando a fixação do complexo enzima-anticorpo. Além disso, se a imunohistoquímica é utilizada isoladamente, não permite distinguir que células estão efetivamente produzindo citocinas e em quais as citocinas estão meramente ligadas ou foram absorvidas, isto é, estão presentes mas não ativas (157). Neste contexto, o método da reação de polimerização em cadeia (PCR) quantitativo é superior pois permite a detecção e quantificação da expressão de genes a partir da extração do RNA mensageiro (RNAm) do tecido renal e sua transcrição reversa (RT) em DNA. O DNA de interesse é co-amplificado com uma quantidade conhecida e constante de um controle interno, um fragmento de DNAC competidor gen-específico. O produto é identificado em gel de agarose, corado com brometo de etídio e sua leitura é processada em um

“scanner” a laser, cuja magnitude de expressão é calculada pela comparação da densidade de banda da razão competidor/DNAc-RT com uma curva padrão gerada para cada gene de interesse. O método fornece uma medida acurada da translação protéica da molécula de interesse e caracteriza não só a presença mas a ativação desta molécula (158).

#### 2.6.2 Expressão de linfócitos T citotóxicos, perforina, granzima e fas ligante na rejeição aguda

Nos rins com rejeição aguda (RA), os linfócitos T e os macrófagos compõem a maior parte do infiltrado leucocitário, sendo minoria os linfócitos B e células “natural killer”. Apesar dos achados diferirem na literatura, alguns estudos mostram a predominância de linfócitos T CD8+ na rejeição severa ou irreversível, e de CD4+ quando o infiltrado é focal e a rejeição de grau mais leve (18, 26, 27).

A identificação dos linfócitos T com propriedades citotóxicas foi demonstrada por Strom e cols. (15), através da fenotipagem do infiltrado mononuclear em rins com rejeição irreversível. Posteriormente, utilizando a técnica do PCR competitivo em rins com rejeição aguda (RA), os mesmos autores quantificaram o aumento da expressão dos genes de perforina e granzima B, que atuam na fase citodestrutiva da resposta imune (158). Strehlau e cols. (159) detectaram em rins com critérios histológicos de RA um aumento estatisticamente significativo da expressão dos genes de IL-7, IL-10, IL-15, Fas ligante, perforina e granzima B, mas não de IL-2 e de INF- $\gamma$ ; o fator regulador de ativação da expressão e secreção da célula T (RANTES) e a IL-8 foram parâmetros sensíveis mas não específicos como marcadores de RA. A análise simultânea de perforina, granzima B e Fas ligante identificou RA mesmo em infiltrados leves, com uma sensibilidade e especificidade de 100%, estabelecendo um método acurado e potencialmente útil nos laboratórios onde esta tecnologia é disponível na prática clínica. Estes achados também foram descritos por Sharma e cols. (160), que demonstraram a

co-expressão intraenxerto de duas vias citolíticas distintas, Fas e Fas ligante e granzima B e perforina, correlacionado positivamente o nível de RNAm dos genes que codificam para estas moléculas com a severidade histológica da RA. Mais recentemente, estes autores (161) mensuraram por PCR quantitativo o RNAm das proteínas citotóxicas perforina e granzima B em células de urina, com o objetivo de testar um método adicional não invasivo para o diagnóstico de RA. A transcrição do RNAm de ambas as moléculas estava significativamente aumentada na RA em comparação com rins sem rejeição ou com nefropatia crônica do enxerto na biópsia, e também com rins funcionalmente estáveis. A sensibilidade e a especificidade do método foram 83% e 83% para perforina e 79% e 77% para a granzima B, respectivamente, em relação à biópsia do enxerto e aos critérios de Banff 1997 como padrão-ouro.

Outros autores também identificaram, utilizando imunohistoquímica com as técnicas ABC e APAAP (162) e o complexo estreptavidina-biotina (163), a marcação positiva para granzima A, granzima B e perforina em células CD3+, linfócitos CD8+ e células “natural killer” (CD56), restritas a enxertos com rejeição clinicamente manifesta.

Fas e seu ligante Fas-L (CD95 ou APO-1) são proteínas de membrana pertencentes à família do fator de necrose tumoral (TNF). A molécula de Fas-L se expressa predominantemente na superfície dos linfócitos Th-1 ativados, interagindo na regulação da resposta imune. A ligação do Fas ao seu ligante Fas-L induz morte celular por apoptose, através de mecanismos ainda desconhecidos (164, 165). Estudos clínicos com PCR-RT têm demonstrado a expressão do RNA mensageiro de Fas-L e de perforina em rins com rejeição irreversível (166).

A descrição das moléculas envolvidas na rejeição aguda ao aloenxerto renal é apresentada na tabela 7.

**Tabela 7 - Moléculas envolvidas na rejeição aguda ao aloenxerto renal.**

<b>Célula ou molécula</b>	<b>Função ou mecanismo de ação</b>	<b>Referência</b>
Linfócito T citotóxico (CD8 <sup>+</sup> )	Destruição das células do enxerto	16
Granzima B	Formação de poros na membrana célula alvo, do DNA e lise osmótica da célula	70
Perforina	Idem à granzima B	70
Fas ligante	Morte celular por apoptose	71
IL-1 e IL-6	Estimulação dos linfócitos T auxiliares	67
IL-2	Divisão celular e expansão clonal dos linfócitos T	68
TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$	Aumento da expressão de antígenos HLA classe I e classe II e de moléculas de adesão	68
IL-4, IL-5, IL-6	Diferenciação linf. T e expansão clonal de céls. B	67
IL-10	Citocina imunomoduladora e/ou imunoestimulatória	173
IL-15	Proliferação e expansão clonal de células T	174
ICAM-1	Ativação céls. T, B, NK e adesão leucócito-endotélio	177
VCAM-1	Atração de monócitos e linfócitos	177

Abreviaturas: CD: *cluster of differentiation*; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral; IFN: interferon; ICAM: *intercellular adhesion molecule*; VCAM: *vascular cell adhesion molecule*.

### 2.6.3. Expressão de citocinas e fatores de crescimento

Diversos estudos têm demonstrado a expressão *in situ* de citocinas e moléculas de adesão em rins com rejeição aguda. Através de imunohistoquímica (APAAP) e análise semiquantitativa da marcação positiva, Noronha e cols. (167) detectaram maior expressão de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2R em rins com RA, em relação à biópsias sem rejeição ou com rejeição crônica. Em estudo posterior (106) também em biópsias com rejeição celular aguda, rejeição crônica e ausência de rejeição, descreveram a predominância de



IL-1, IL-2, IL-2R, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  na RA. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) marcaram intensamente em biópsias com rejeição crônica, localizando-se em fibroblastos, no endotélio de arteríolas e na camada íntima e muscular média de artérias. Mais recentemente, outros autores (107), empregando PCR-RT em biópsias de enxertos renais com disfunção crônica, demonstraram uma associação estatisticamente significativa entre fibrose intersticial e nefropatia crônica do enxerto com o aumento da expressão do RNAm de TGF- $\beta_1$ .

A IL-2 isoladamente parece não ser um bom marcador de RA na fase em que esta se manifesta clinicamente. Em estudo preliminar com biópsia aspirativa por agulha fina e PCR-RT, Dallman e colaboradores (168) observaram um aumento precoce mas fugaz da expressão dos genes de IL-2 e IFN- $\gamma$ , precedendo o aparecimento da rejeição clínica. Este achado também foi demonstrado no modelo experimental de ilhotas pancreáticas em camundongos (169), em relação ao aumento transitório e precoce de IL-2, IFN- $\gamma$  e granzima B, com pico e declínio antes da rejeição clínica. Igualmente, Krams e cols. (170) analisando rins com RA relatam aumento de IL-6 e TNF- $\alpha$ , e não de IL-2 e IFN- $\gamma$ . Outros autores (171), utilizando a técnica de hibridização in situ não radioativa em rins com rejeição, também descrevem uma baixa freqüência de células positivas para IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ , sugerindo que o estímulo para a transcrição destas citocinas seja menor ou, mais provavelmente, que a sua secreção não seja sustentada na cascata da rejeição aguda em curso.

Estudos recentes empregando a técnica PCR-RT têm demonstrado a expressão intraenxerto de outros potenciais marcadores de RA, como a IL-10 e a IL-15. Xu e cols. (172) encontraram co-expressão do RNAm de IL-10 e IFN- $\gamma$  em forte associação com rejeição aguda, observando que a IL-10 não bloqueou a expressão in vivo de IL-2, IL-7, IFN- $\gamma$  e TGF $\beta_1$ . Dados clínicos e experimentais suportam a noção de que a IL-10 possa,

em diferentes circunstâncias, apresentar propriedades imunomoduladoras ou imunoestimulatórias (172, 173).

Como a transcrição de IL-2 está freqüentemente ausente na rejeição clínica, é possível que a IL-15, citocina recentemente descrita, também participe da resposta imune estimulando a proliferação e expansão clonal das células T. Pavlakis e cols. (174) encontraram um aumento significativo da transcrição do RNAm de IL-15 em rins com RA, quando comparados a enxertos com outras causas de disfunção. Os autores postulam que durante a RA a IL-15 pode manter a expansão clonal dos linfócitos T, não sendo inibida por imunossuppressores como a ciclosporina. Manfro e cols. (175), utilizando o modelo experimental de transplante de ilhotas pancreáticas em camundongos nos quais o gen da IL-2 foi inativado por recombinação homóloga (“knock-out” genético), também observaram um aumento da expressão do RNAm da IL-15 durante a RA, tanto nos receptores IL-2 deficientes quanto nos portadores de IL-2.

#### 2.6.4. Expressão de moléculas de adesão

A expressão constitutiva e induzível das moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e de células endoteliais (VCAM-1) e seus ligantes foi também demonstrada na RA do enxerto renal (176, 177). Empregando imunoperoxidase indireta em células de punção aspirativa de rins com RA, Manfro e cols. (176) detectaram um aumento significativo da expressão de ICAM-1 e de HLA-DR em células do parênquima, em comparação a enxertos com necrose tubular aguda. Brockmeyer e cols. (177), em biópsias do rim transplantado, verificaram um aumento da expressão de ICAM-1 e de VCAM-1 no interstício, túbulos e no endotélio de capilares peritubulares, em associação com RA. Alguns autores sugerem que a expressão aumentada das moléculas de adesão seria um marcador precoce de rejeição aguda (178), mas a baixa sensibilidade e especificidade deste achado tornam a sua aplicabilidade clínica questionável (179).

## 2.7. Rejeição subclínica no transplante renal

O diagnóstico de rejeição subclínica depende da realização de biópsias de protocolo seqüenciais para monitorização imunológica do enxerto renal. Este procedimento, também denominado de biópsia de vigilância, não é consenso na literatura (180). Na conferência sobre Patologia do Aloenxerto realizada em Banff, 1999, foi sugerido que as biópsias de tempo zero (pós-revascularização do enxerto) deveriam ser procedimento de rotina, estabelecendo alterações crônicas do doador e injúrias agudas relacionadas ao processo de manutenção do doador, remoção, preservação, implante e reperfusão do enxerto (108). Biópsias de rins estáveis aos 3, 6 meses ou 12 meses pós-transplante poderiam revelar rejeição aguda subclínica ( 22, 23, 28-30) e conseqüente modificações no esquema imunossupressor (38), e também gerar índices de cronicidade preditivos da evolução tardia do enxerto renal, a exemplo do CADI (146) e do CGDS (138). Entretanto, a biópsia seriada ainda não constitui um procedimento de rotina nas unidades de transplante, e faltam grandes estudos multicêntricos que comprovem a sua utilidade clínica. Adicionalmente, a análise histológica ainda apresenta um elevado grau de discordância intra e interobservador, reduzindo a acurácia do diagnóstico e da graduação de lesões, principalmente no que se refere à rejeição aguda do enxerto renal (12, 139).

### 2.7.1. Biópsias de protocolo no rim transplantado funcionalmente estável

A investigação das alterações morfológicas e imunológicas do rim transplantado com função estável através de biópsias seqüenciais de vigilância iniciou na década de 80 (19-23, 181, 182). A biópsia seqüencial do enxerto revela um infiltrado leucocitário intersticial, cuja magnitude depende do tempo da biópsia, presença ou não de sinais clínicos de rejeição e do esquema imunossupressor utilizado (21). Diversos autores (18,

20, 21, 182), comparando rins transplantados estáveis e rins com rejeição aguda, verificaram que o infiltrado celular é significativamente maior nas biópsias com rejeição, mas a proporção de subpopulações de células é semelhante (24, 25). No estudo de McWhinnie e cols. em 1985 (20) avaliando rins estáveis, a fenotipagem das células mostrou que um terço do infiltrado era constituído por linfócitos T, e o percentual de área infiltrada reduzia do primeiro até o terceiro mês, de  $12\% \pm 8,2\%$  para  $7,9\% \pm 6,2\%$ . Analisando a associação entre proporção de área infiltrada com as drogas imunossupressoras em uso, estes autores verificaram que na vigência de prednisona, azatioprina e ciclosporina a porcentagem de infiltração era  $8,1 \pm 5,6\%$ , significativamente menor do que com prednisona e azatioprina apenas,  $15,9 \pm 8,7\%$  (20). Em outro trabalho publicado em 1986 (21), os mesmos autores fenotiparam o infiltrado por imunohistoquímica em biópsias obtidas no primeiro mês pós-transplante, descrevendo 65% de monócitos/macrófagos, 35% de linfócitos T, sendo a relação CD4+/CD8+ próxima da unidade, e menos de 5% de células "natural killer". A distribuição do infiltrado foi predominantemente focal, de localização perivascular e periglomerular.

Burdick e cols. em 1984 (19) realizaram biópsias de vigilância na primeira e quarta semanas pós-transplante em receptores de transplantes cadavéricos tratados com prednisona e azatioprina. Em 96% dos casos havia um infiltrado intersticial, composto por linfócitos T auxiliares (CD4+) e citotóxicos (CD8+). A relação linfócito CD4+/CD8+ foi  $1,40 \pm 0,69$  nos rins com rejeição aguda, e  $1,05 \pm 0,58$  nos rins normais ou com necrose tubular aguda (NTA). A vasculite foi o único achado histológico que discriminou rejeição aguda e ausência de rejeição. Com base em estudos experimentais, foi sugerido que o infiltrado celular constituiria um mecanismo de adaptação imunológica, envolvendo a indução de células supressoras (183) ou também a indução do efeito supressivo mediado por anticorpos antiidiotípicos (184).

Em 1995, Limchiu et al (185) estudando pacientes estáveis com biópsias 1 e 8 semanas pós-transplante, detectaram um infiltrado celular inespecífico em 30% dos

casos nos dois períodos. Aos 2 meses, 28% dos casos tinham critério para rejeição aguda subclínica (RASC). Estes pacientes apresentaram maior porcentagem de área positiva para fibrose em biópsia aos 2 anos pós-transplante, mas o número total de rejeições e a função renal tardia não diferiram dos pacientes sem RASC.

Serón e cols. (23) em 1991 demonstraram em rins estáveis 6 semanas pós-transplante que a densidade do infiltrando leucocitário, particularmente das células "naive" (CD45RA), se correlacionou significativamente com a função do enxerto e com o nível de proteinúria no momento da biópsia e aos 3 e 6 meses pós-transplante. Em outro estudo publicado em 1997 (29), estes autores avaliaram se a biópsia de protocolo aos 3 meses em 98 rins estáveis poderia prever perda tardia do enxerto por nefropatia crônica (NCE). RASC ou alterações limítrofes ocorreram em 16 (16%) pacientes, e em 41 (42%) a biópsia mostrou NCE pelos critérios de Banff. Comparando pacientes com e sem NCE, os parâmetros clínicos que alcançaram diferença estatisticamente significativa foram creatinina sérica aos 3, 12 e 24 meses pós-transplante, rejeição aguda clínica e níveis séricos mais elevados de ciclosporina pré-biópsia. As variáveis independentes preditoras de NCE foram rejeição aguda clínica (RC = 17,4,  $p = 0,015$ ) e menor ciclosporinemia (RC = 1,01,  $p=0,03$ ); a sobrevida do enxerto em 5 anos foi significativamente menor no grupo com NCE, independente do nível de função inicial.

Rush e cols. têm publicado diversos estudos sobre a utilidade das biópsias de vigilância e a influência da rejeição aguda subclínica detectada precocemente sobre a evolução morfológica e funcional do rim transplantado a longo prazo. Em estudo de 1994 (22), utilizando os critérios de Banff publicados no ano anterior para diagnóstico histológico de rejeição (78), detectaram RASC em 9 (31%) pacientes com função do enxerto estável, tratados com prednisona e azatioprina. A rejeição foi tratada com corticosteróides e na segunda biópsia após 1 mês havia RASC persistente em 3 casos, um deles com alterações crônicas. Comparando os pacientes que tiveram uma evolução funcional estável *versus* não estável, os níveis séricos de creatinina e do receptor de interleucina-2 foram significativamente maiores no grupo com pior evolução clínica.

Em estudo prospectivo publicado também em 1994 (186) com biópsia aos 6 meses, encontraram 35% dos rins com histologia normal, 15% com alterações limítrofes para rejeição, 33% com RASC e 17% com NCE. Os pacientes com RASC apresentaram maior prevalência de NTA, e houve uma associação estatisticamente significativa entre NCE e idade avançada do doador. Fatores como ciclosporinemia, incompatibilidade HLA, tempo de isquemia fria e de anastomose vascular não se correlacionaram com as categorias histológicas. Neste estudo, foi estabelecido um escore de alterações inflamatórias agudas (até o 6º mês) e de alterações agudas e crônicas (aos 12 meses) pelos critérios de Banff. Os pacientes com alterações limítrofes e aqueles com RASC apresentaram escores inflamatórios e creatinina sérica significativamente mais elevados em todos os períodos, em relação ao grupo com histologia normal. Os autores sugeriram que a persistência do infiltrado inflamatório túbulo-intersticial, mesmo na ausência de manifestações clínicas, poderia estar associado à disfunção tardia do enxerto renal.

Procurando identificar variáveis clínicas e histológicas independentemente associadas com pior função do enxerto aos 2 anos pós-transplante (35), estes autores publicaram em 1998 um estudo demonstrando que o escore de alterações crônicas de Banff maior do que 2 na biópsia de vigilância aos 6 meses (RC = 6,6), cada episódio de rejeição aguda tardia (RC = 5,9), idade avançada do doador (RC = 1,07) e presença de NTA inicial foram fatores preditivos de pior função tardia do enxerto. Na opinião destes pesquisadores, a biópsia de vigilância aos 6 meses poderia ter valor prognóstico, podendo ser utilizada em estudos clínicos de intervenções para prevenção de NCE.

Em nosso meio, Veronese e cols. (187) em 1999 estudaram 32 pacientes submetidos à biópsia de vigilância aos 2 e 12 meses pós-transplante, detectando 31% de RASC na biópsia inicial e 22% de NCE aos 12 meses; não houve diferença estatística na prevalência de NTA, creatinina sérica e proteinúria nos dois períodos entre pacientes com e sem RASC. O grau de concordância do patologista renal (variação intraobservador) com pelo menos 6 meses de intervalo entre as duas interpretações foi adequado, com kappa = 0,60 ( $p = 0,03$ ) para presença ou ausência de rejeição aguda

aos 2 meses, mas foi pior para presença ou ausência de NCE aos 12 meses ( $\kappa = 0,50$ ;  $p = 0,12$ ).

### 2.7.2. Evidências de imunoativação intraenxerto na rejeição subclínica

A identificação de células inflamatórias com potencial citotóxico na presença de tubulite e/ou vasculite subclínicas suscita a hipótese de que a RASC possa ser patogênica, resultando em dano crônico ao rim transplantado que se manifesta por fibrose intersticial, deterioração funcional e perda tardia do enxerto (30, 36, 188). Como anteriormente citado, na última década diversos estudos em rins com rejeição aguda clinicamente manifesta têm sistematicamente demonstrado, através da reação de polimerização em cadeia, aumento da transcrição dos genes de muitas moléculas de ativação e diferenciação da célula T, principalmente de sua fase citotóxica (158-161, 168, 170, 172, 174). Estudos mais recentes, avaliando especificamente marcadores de imunoativação em rejeição aguda subclínica, também demonstraram um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e linfócitos citotóxicos, embora em menor grau do que em pacientes com disfunção aguda do enxerto. Em 1998, Lipman e cols. (36) através do PCR competitivo quantitativo detectaram um aumento estatisticamente significativo da transcrição dos genes do receptor de célula T (cadeia beta), IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-15 e perforina nas biópsias de enxertos estáveis com RASC, comparativamente a rins histologicamente normais. A expressão aumentada de IL-15 discriminou melhor os rins normais daqueles com infiltrado limítrofe ou RASC. Analisando a função destes enxertos em 5 anos, estes autores observaram que a expressão precoce de R $\alpha$ T- $\beta$ , IL-15, perforina e Fas-ligante em biópsia aos 3 meses pós-transplante se correlacionou positivamente com o nível de creatinina sérica.

Grimm e cols. (37) em 1999 estabeleceram diferentes níveis de expressão de marcadores de células T ativadas, produtos de macrófagos ativados (Fator Inflamatório

do Enxerto 1, AIF-1) e citocinas, sendo esta expressão máxima na RA, intermediária na RASC e mínima ou ausente nos rins normais. O único fator discriminante entre RA e RASC foi o número de células positivas para AIF-1, significativamente maior na RA. Estes autores especulam que a disfunção do enxerto na rejeição aguda clínica poderia ser atribuída ao efeito vasoconstrictor do tromboxane  $A_2$  produzido por macrófagos ativados, resultando na queda da filtração glomerular e aumento da creatinina sérica.

A associação entre imunoativação, lesão histológica e disfunção crônica do enxerto também foi demonstrada em biópsias tardias. Em 1999 Kirk e cols. (30) detectaram aos 2 anos pós- transplante aumento da transcrição do RNAm das moléculas de CD3-cadeia  $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-8. A magnitude do infiltrado linfocitário e a expressão de IL-6 e IL-8 se correlacionaram significativamente com o grau de proteinúria e a área de fibrose nesta biópsia. Houve também uma associação estatisticamente significativa entre atrofia tubular, fibrose intersticial e transcrição da molécula de CD3- $\gamma$  com a piora progressiva da função do enxerto até o 4º ano de transplante. Esses dados sugerem que uma agressão imunológica subclínica persistente pode estar associada com o desenvolvimento tardio de rejeição crônica.

Como a biópsia de vigilância não é um procedimento rotineiro na prática clínica, e também pela não disponibilidade de outros métodos acurados de diagnóstico, é provável que a rejeição aguda subclínica seja uma condição subdiagnosticada. Alternativamente à biópsia percutânea do enxerto renal, não isenta de riscos, métodos não invasivos como a ressonância nuclear magnética ou a espectroscopia com raios infravermelhos (189, 190) poderiam auxiliar na identificação de células citotóxicas ou de seus metabólitos na urina ou no sangue.

## **2.8. Tratamento da rejeição aguda subclínica**

A redução da incidência de rejeição aguda com a introdução de drogas imunossupressoras mais potentes tem resultado em melhores sobrevidas do rim



transplantado (4-8, 86-88). A rejeição crônica, entretanto, permanece sendo a causa prevalente de perda tardia do enxerto, excluindo-se óbito com rim funcionante. Este dado é paradoxal, uma vez que a rejeição aguda é definitivamente um importante fator de risco para o desenvolvimento de rejeição crônica (98-100, 108, 191, 192). Considerando que 30% das biópsias de vigilância em rins transplantados estáveis têm critérios histológicos de RA, discute-se a necessidade de tratar o infiltrado inflamatório potencialmente citotóxico, com o objetivo de prevenir o desenvolvimento da nefropatia crônica do enxerto. Rush e cols. (38) publicaram em 1998 um estudo prospectivo randomizado comparando pacientes com RASC em biópsias aos 1, 2 e 3 meses pós-transplante tratados com pulso de corticosteróide com controles não submetidos às biópsias de vigilância e, portanto, não tratados. Os pacientes tratados apresentaram menos episódios de rejeição aguda clínica no primeiro ano de transplante, e também menor creatinina sérica, menor escore crônico de Banff e maior sobrevida do enxerto aos 2 anos pós-transplante. Entretanto, a prevalência de infecção, principalmente pneumonia, foi maior no grupo tratado com corticosteróides. Em 1999, os mesmos autores (193) avaliaram o efeito de um esquema imunossupressor mais potente (micofenolato mofetil associado a ciclosporina neoral e prednisona) sobre a prevalência de RASC e a incidência de rejeição aguda clínica precoce e tardia em pacientes transplantados renais, comparando a controles históricos que utilizaram azatioprina e ciclosporina em microemulsão. O grupo com imunossupressão mais vigorosa mostrou uma incidência significativamente menor de rejeição aguda clínica nos três primeiros meses, e uma dose cumulativa total menor de corticosteróides. No entanto, o aumento da imunossupressão de base não teve um impacto sobre a prevalência de RASC precoce. O risco de rejeição aguda tardia foi reduzido nos pacientes submetidos as biópsias de protocolo, o que foi atribuído ao tratamento da RASC, caso estivesse presente na biópsia.

As limitações destes dois estudos, relacionadas principalmente a metodologia inadequada e poder estatístico insuficiente, e considerando a inexistência de outros ensaios clínicos controlados de tratamento da RASC, impedem conclusões definitivas

sobre a necessidade de aumentar a imunossupressão na rejeição subclínica não acompanhada de disfunção do enxerto.

O tratamento do infiltrado inflamatório limítrofe para rejeição também é tema controverso. Saad e cols. (134) e Schweitzer e cols. (135) demonstraram resposta total ou parcial em 50% a 75% dos casos tratados com corticosteróides por disfunção do enxerto atribuída à rejeição limítrofe, mas o impacto desta medida a longo prazo não foi descrito. Em contrário, Meehan e cols. (32) acompanharam 50 pacientes com infiltrado limítrofe não tratado, e em 72% dos casos não houve progressão para rejeição aguda clínica. Nos pacientes que evoluíram para rejeição aguda, houve elevação transitória ou permanente da creatinina após a biópsia, o que foi associado aos achados de glomerulite e escore agudo de Banff superior a 2. Estes autores sugerem que a curto prazo o infiltrado limítrofe não evolui para RA não devendo ser tratado. Até o momento ainda são desconhecidos os efeitos tardios do infiltrado inflamatório limítrofe sobre a função e histologia do enxerto renal.

O diagnóstico da rejeição aguda nem sempre é possível ou acurado em bases histológicas (12), sendo necessários outros métodos como imunohistologia e moleculares (159, 194), com o óbice de seu alto custo e difícil rotinização na maioria dos centros transplantadores, principalmente em nosso meio. Empregando estas técnicas em biópsias seriadas do enxerto renal estável seria possível identificar, antes mesmo da ocorrência de disfunção, marcadores de imunoativação preditivos do desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto. A presença de RASC poderia ser então uma justificativa para aumentar a imunossupressão e potencialmente diminuir a intensidade ou bloquear um episódio de rejeição aguda. O impacto desta conduta a longo prazo ainda é incerto, mas especula-se que poderia prolongar a sobrevida do rim transplantado (36, 38, 39, 193).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a rejeição subclínica e a expressão de marcadores de imunoativação em transplantados renais com função estável submetidos à biópsias de vigilância aos 2 e 12 meses pós- transplante.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Avaliar a incidência de rejeição aguda subclínica aos 2 meses e de nefropatia crônica do enxerto aos 12 meses através de biópsias de vigilância em enxertos renais estáveis.
- 3.2.2 Fenotipar as células do infiltrado mononuclear e avaliar a expressão de marcadores de imunoativação intraenxerto através de imunohistoquímica.
- 3.2.3 Identificar variáveis clínicas, histopatológicas e imunohistoquímicas precoces que sejam preditivas do desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto ao final do primeiro ano de transplante.
- 3.2.4 Correlacionar o nível de função do enxerto e da excreção de proteínas até o 3º ano de transplante com variáveis clínicas, histopatológicas e imunohistoquímicas presentes nos primeiros 12 meses do transplante.

#### 4. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Cecka JM. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *Clin Transplant* 1999; 1-21.
2. Morris PJ. Results of Renal Transplantation. In: Morris PJM, editor. *Kidney Transplantation. Principles and Practice*. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p. 167-78.
3. Takemoto SK, Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM. Twelve years' experience with national sharing of HLA-matched cadaveric kidneys for transplantation. *N Engl J Med* 2000; 343(15):1078-84.
4. The European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group. Mycophenolate mofetil in renal transplantation: 3-year results from the placebo-controlled trial. *Transplantation* 1999; 68(3):391-96.
5. Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vicenti F, Filo RS. The FK506 Kidney Transplant Study Group. A comparison of Tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1997; 63(7):977-83.
6. Kahan BD, Rajagopalan PR, Hall M. Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody. The United States Simulect Renal Study Group. *Transplantation* 1999; 67(2):276-84.
7. Vincenti F, Kirkman R, Light S, Bumgardner G, Pescovitz M, Halloran P, et al. Interleukin-2 receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *New Eng J Med* 1998; 338(3):161-64.

8. Ekberg H, Backman L, Tufveson G. Daclizumab prevents acute rejection and improves patient survival post-transplantation: 1-year pooled analysis. *Transplant Int* 2000; 13(2):151-59.
9. Scornick JC, Brunson ME, Schaub B, Howard RJ, Pfaff WW. The crossmatch in renal transplantation. Evaluation of flow cytometry as a replacement for standard cytotoxicity. *Transplantation* 1994; 57(4):621-25.
10. Patel R, Snyderman DR, Rubin RH, Ho M, Pescovitz M, Martin M, et al. Cytomegalovirus prophylaxis in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 1996; 61(9):1279-89.
11. Häyry P; Von Willebrand E. Practical guidelines for fine needle aspiration biopsy of human renal allografts. *Ann Clin Res* 1981;13(4-5):288-306.
12. Colvin RB. The renal allograft biopsy. *Kidney Int* 1996;50(3):1069-82.
13. Suthanthiran M. Acute rejection of renal allografts: Mechanistic insights and therapeutic options. *Kidney Int* 1997;51(4):1289-1304.
14. Tilney NL, Strom TB, McPherson SG, Carpenter CB. Surface properties and functional characteristics of infiltrating cells harvested from acutely rejecting cardiac allografts in inbred rats. *Transplantation* 1975; 20(4): 323-30.
15. Strom TB, Tilney NL, Carpenter CB, Busch GJ. Identity and cytotoxic capacity of cells infiltrating renal allografts. *N Eng J Med* 1975;292(24):1257-63.
16. Strom TB, Tilney NL, Paradysz JM, Bancewicz J, Carpenter CB. Cellular components of allograft rejection: identity, specificity, and cytotoxic function of cells infiltrating acutely rejecting allografts. *J Immunol* 1977;118(6):2020-26.
17. Platt JL, LeBien TW, Michael AF. Interstitial mononuclear cell populations in renal graft rejection. Identification by monoclonal antibodies in tissue sections. *J Exp Med* 1982;155(1):17-30.
18. Kolbec PC, Tatum AH, Sanfilippo F. Phenotypic evaluation of mononuclear cell infiltrates in renal allograft biopsies. *Transplant Proc* 1985;17(1):893-95.

19. Burdick JF, Beschoner WE, Smith WR, McGraw D, Bender WL, Melville G, et al. Characteristics of early routine renal allograft biopsies. *Transplantation* 1984; 38(6):679-84.
20. McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM, Chapman JR, Bolton EM, Wood RFM, et al. Leucocyte infiltration patterns in renal allografts assessed by immunoperoxidase staining of 245 sequential biopsies. *Transplant Proc* 1985; 17(1):560-1.
21. McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM, Chapman JR, Bolton EM, Carper NP, et al. Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation* 1986; 42(4):352-8.
22. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 1994;57(2):208-11.
23. Séron D, Díaz-Gallo C, Griño JM, Castelao AM, Carrera M, Bover J, et al. Characterization of interstitial infiltrate in early renal allograft biopsies in patients with stable renal function. *Transplant Proc* 1991; 23(1):1267-69.
24. Hancock W, Thomson N, Atkins R. Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts. *Transplantation* 1983; 35(5):458-63.
25. Andersen CB, Ladefoged SD, Larsen S. Acute kidney graft rejection. A morphological and immunohistological study on "zero-hour" and follow-up biopsies with special emphasis on cellular infiltrates and adhesion molecules. *APMIS* 1994; 102(1):23-37.
26. Sako H, Nakane Y, Okino K, Nishihara K, Kodama M, Paku K, et al. Immunohistochemical study of the cells infiltrating human renal allografts by the ABC and IGSS method using monoclonal antibodies. *Transplantation* 1987; 44(1):43-50.
27. van Es A, Meyer CJ, Olijans PJ, Tanke HJ, van Es LA. Mononuclear cells in renal allografts. Correlation with peripheral blood T lymphocyte subpopulations and prognosis. *Transplantation* 1984; 37(2):134-39.

28. Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients: repeated inflammation is associated with impaired graft function at 1 year. *Transplant Proc* 1995;27(1):1017-18.
29. Serón D, Moresco F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Cañas C, et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997; 51(1):310-16.
30. Kirk AD, Jacobson LM, Heisey DM, Radke NF, Pirsch JD, Sollinger HW. Clinically stable human renal allografts contain histological and RNA-based findings that correlate with deteriorating graft function. *Transplantation* 1999;68(10):1578-82.
31. Kawai T, Cosimi AB, Colvin RB, Powelson J, Eason J, Kozlowski T, et al. Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 1995;59(2):256-62.
32. Meehan SM, Siegel CT, Aronson AJ, Bartosh SM, Thistlethwaite JR, Woodle ES, et al. The relationship of untreated borderline infiltrates by Banff criteria to acute rejection in renal allograft biopsies. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(8):1806-14.
33. Goldberg, J, Guardia, O, Rial, MC, Balbarrei C, Argento J, Greco G, et al. Borderline lesion in sequential biopsies of kidney allograft recipients. Clinical and histopathological evolution. 5th Banff Conference on Allograft Pathology; 1999 May 5-9; Banff, Canada.
34. Rush DN, Nickerson P, Jeffery JR, McKeena RM, Grimm PC, Gough J. Protocol biopsies in renal transplantation: research tool or clinically useful? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998;7(6):691-4.
35. Nickerson P, Jeffery JR, Gough, J, McKeena RM, Grimm PC, Cheang M, et al. The identification of clinical and histopathological risk factors of diminished renal function 2 years posttransplant. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(3):482-87.
36. Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR, Gough J, McKenna M, Grimm PC, et al. Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation* 1998;66(12):1673-81.

37. Grimm PC, McKenna R, Nickerson P, Russell ME, Gough J, Gospodarek E, et al. Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(7):1582-89.
38. Rush DN, Nickerson P, Gough J, et al. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(11):2129-34.
39. Rush DN, Karpinski ME, Nickerson P, Dancea S, Birk P, Jeffery JR. Does subclinical rejection contribute to chronic rejection in renal transplant patients? *Clin Transplantation* 1999;13(6):441-46.
40. Powis SH, Trowsdale J. Major and minor histocompatibility antigens. In: Thomson, AW, Catto, GRD, editors. *Immunology of Renal Transplantation*. 1st ed. London: Edward Arnold; 1993. p. 3-26.
41. Sayegh MH, Perkins DL, Carpenter CB. Transplantation Immunobiology. In: Brenner, B, Rector, editors. *The Kidney*. 6th ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000. p. 2518-41.
42. Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:253-88.
43. Carpenter CB. Histocompatibility systems in man. In: Ginns LC, Cosimi AB, Morris PJ, editors. *Transplantation*. 2nd ed. Boston: Blackwell Science; 1999. p. 61-72.
44. Kappes D, Strominger JL. Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu Rev Biochem* 1988;57:991-1028.
45. Opelz G, Mytilineos J, Wujciak T, Schwarz V, Back D. Current status of HLA matching in renal transplantation. *The Collaborative Transplant Study. Clin Investig* 1993;70(9):767-72.
46. Wegener AMK, Letourneur F, Hoeveler A, Brocker T, Luton F, Malissen B. The T-cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. *Cell* 1992;68(1):83-95.
47. Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T-cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 1988;6:629-62.



48. Heemann UW, Tullius SG, Azuma MD, Kupiec-Weglinsky J, Tilney NL. Adhesion molecules and transplantation. *Ann Surg* 1994;219(1):4-12.
49. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation in transplantation. *N Eng J Med* 1998;338(25):1813-21.
50. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346(6283):425-34.
51. Seventer GA, Shimizu Y, Shaw S. Role of multiple accessory molecules in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 1991;3(3):294-303.
52. Linsley OS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1992;176(6):1595-604.
53. Tan P, Anasetti C, Hansen JA, Melrose J, Brunwand M, Bredshaw J, et al. Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med* 1993;177(1):165-73.
54. Lenschow DJ, Zeng Y, Hathcock KS. Inhibition of transplant rejection following treatment with anti-B7-2 and anti-B7-1 antibodies. *Transplantation* 1995;60(10):1171-78.
55. Denton MD, Reul RM, Dharnidharka VR, Fan JC, Ganz P, Briscoe DM. Central role for CD40/CD40 ligand (CD154) interactions in transplant rejection. *Pediatr Transplantation* 1998;2(1):6-15.
56. Kirk A, Harlan D, Armstrong N, Davis TA, Dong Y, Gray GS, et al. CTLA-4 Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(16):8789-94.
57. Mossman TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clones: I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-57.

58. Strom TB, Roy-Chaudhury P, Manfro RC, Zheng XX, Nickerson PW, Wood K, et al. The Th1/Th2 paradigm and the allograft response. *Curr Opin Immunol* 1996;8(5):688-93.
59. D'Ellos MM, Josien R, Manghetti T, Amedei A, de Carli M, Cuturi MC, et al. Predominant Th1 cell infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts. *Kidney Int* 1997;51(6):1876-84.
60. Sayegh MH, Alkalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS, et al. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med* 1995;181(5):1869-74.
61. Krieger NR, Yin DP, Fathman CG. CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> cells are essential for allorecognition. *J Exp Med* 1996;184(5):2013-8
62. Chitilian HV, Aunchincloss H. The indirect pathway in graft rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 1977;2(1):3-12.
63. Clement JD, Chan SY, Bishop DK. Allogeneic class I MHC requirement for alloantigen-reactive helper T-lymphocyte responses in vivo. Evidence for indirect presentation of alloantigen. *Transplantation* 1996;62(3):388-396.
64. Cuturi MC, Blancho G, Josien R, Souillou JP. The biology of allograft rejection. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994; 3(6):578-84.
65. Darnell JE Jr. The JAK-STAT pathway: summary of initial studies and recent advances. *Recent Progr Horm Res* 1996;51:391-403.
66. Taniguchi T. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 1995; 268(5208):251-5.
67. Manfro RC, Gonçalves LF, Saitovich. Imunologia e farmacologia das drogas imunossupressoras. In: Barros E, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LF, editores. *Nefrologia. Rotinas, Diagnóstico e Tratamento*. 2nd ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1998. P. 463-74.
68. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Eng J Med* 1994; 331(6):365-76.

69. Gately MK, Desai BB, Wolitzky AG, Quinn PM, Dwyer CM, Podlaski FG, et al. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J Immunol* 1991;147(3):874-82.
70. Tschopp J, Nabholz M. Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes. *Ann Ver Immunol* 1990;8:279-302.
71. Los M, Van de Craen M, Penning LC, Schenk H, Westendorp M, Breurle PA, et al. Requirement of an ICE/Ced-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature* 1995;375:81-83.
72. Baldwin III WM, Halloran PF. Clinical syndromes associated with antibody in allografts. In: Racusen LC, Solez K, Burdick JF, editors. *Kidney Transplant Rejection*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1998. p.127-47.
73. Manfro RC, Gonçalves LF, Saitovich.. Aspectos clínicos, rotinas e complicações do transplante renal. In: Barros E, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LF, editores. *Nefrologia. Rotinas, Diagnóstico e Tratamento*. 2nd ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1998. p. 475-500.
74. Evans C, Cochlin DL, Ferguson C, Griffin PJ, Salaman JR. Duplex Doppler studies in acute renal transplant rejection. *Transplant Proc* 1989;21(1 Pt 2):1897-8.
75. Bellomo R, Farmer M, Wong C, Boyce N. A prospective study of technetium-99m-diethylenetriamine pentacetic acid renal allograft scintigraphy in the diagnostic evaluation of graft dysfunction. *Transplantation* 1993;56(6):1585-8.
76. Häyry P, Von Willebrand E, Lautenschlager I, Taskinen E, Krogerus L. Diagnosis of rejection: role of fine-needle aspiration biopsy. *Transplant Proc* 1990; 22(6):2597-600.
77. Gonçalves LF, Manfro RC, Rauber L, Wdeleweiss M, Prompt, C. Evaluation of fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis of acute renal transplant dysfunction. *Transplant Proc* 1992;24(6):3081-2.
78. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft

- rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993;44(2):411-422.
79. Marcussen N, Olsen TS, Benediktsson H, Racusen L, Solez K. Reproducibility of the Banff classification of renal allograft pathology. Inter and intraobserver variation. *Transplantation* 1995;60(10):1083-9.
  80. Solez K, Hansen HE, Kornerup HJ, Madsen S, Sorensen AW, Pedersen EB, et al. Clinical validation and reproducibility of the Banff schema for renal allograft pathology. *Transplant Proc* 1995;27(1):1009-11.
  81. Racusen LC, Solez K, Olsen S. The pathology of kidney transplantation. In: Racusen LC, Solez K, Burdick JF, editors. *Kidney Transplant Rejection*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1998. p. 383-418.
  82. Dupont E, Schandene L, Denys C, Wybran J. Differential in vitro actions of cyclosporin, methylprednisolone and 6-mercaptopurine: implications for drug's influence on lymphocyte activation mechanisms. *Clin Immunol Immunopathol* 1986;40(3):422-8.
  83. Deierhoi MH, Sollinger HW, Kalayoglu M, Belzer FO. Quadruple therapy for cadaver renal transplantation. *Transplant Proc*. 1987;19(1 Pt 3):1917-9.
  84. Norman DJ, Kahana L, Stuart Jr FP, Thistlethwaite JR Jr, Shield CF 3<sup>rd</sup>, Monaco A, et al. A randomized clinical trial of induction therapy with OKT3 in kidney transplantation. *Transplantation* 1993;55(1):44-50.
  85. The US Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. Mycophenolate Mofetil in cadaveric renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 1999;34(2):296-303.
  86. Pirsch JD. The FK506 Kidney Transplant Study Group. Tacrolimus versus cyclosporine in kidney transplantation: five-year survival results of the U.S. multicenter, randomized, comparative study [abstract]. *Transplantation* 2000;69(8):113.
  87. Kahan, BD. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* 2000;356(9225):194-202.

88. Mathew TH. The Rapamune Global Study Group. The safety and efficacy of sirolimus/cyclosporine for the prevention of acute rejection in primary renal allograft recipients [abstract]. *Transplantation* 2000;69(8):360.
89. D'Alessandro AM, Pirsch JD, Stratta RJ, Sollinger HW, Kalayoglu M, Maki DG, et al. OKT3 salvage therapy in a quadruple immunosuppressive protocol in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1989;47(2):297-300.
90. Matas AJ, Tellis VA, Quinn T, Glichlick D, Soberman R, Weiss R, et al. ALG treatment of steroid-resistant rejection in patients receiving cyclosporine. *Transplantation* 1986;41(5):579-83.
91. Richardson AJ, Higgins RM, Liddington M, Murie J, Ting A, Morris PJ. Antithymocyte globulin for steroid resistant rejection in renal transplant recipients immunosuppressed with triple therapy. *Transplant Int* 1989; 2(1):27-32.
92. The Mycophenolate Mofetil Renal Refractory Rejection Study Group. Rescue therapy with mycophenolate mofetil. *Clin Transplant* 1996;10(1 Pt 2):131-5.
93. Jordan ML, Naraghi R, Shapiro R, Smith D, Vivas CA, Scantlebury VP, et al. Tacrolimus for rescue of refractory renal allograft rejection. *Transplant Proc* 1998;30(4):1257-60.
94. Pascual M, Saidman S, Tolkoff-Rubin N, Williams WW, Maniyyedi S, Duan JM, et al. Plasma exchange and tacrolimus-mycophenolate rescue for acute humoral rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 1998;66(11):1460-4.
95. Tilney NL, Whitley WD, Diamond J, Kupiec-Weglinski JW, Adams DH. Chronic rejection – an undefined conundrum. *Transplantation* 1991;52(3):389-98.
96. Tullius SG, Tilney NL. Both alloantigen-dependent and independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation* 1995;59(3):313-8.
97. Cecka JM. Early rejection: determining the fate of renal transplants. *Transplant Proc* 1991; 23(1 Pt 2):1263-4.

98. Gulanikar AC, MacDonald AS, Sungurtein U, Belitsky P. The incidence and impact of early rejection episodes on graft outcome in recipients of first cadaver kidney transplants. *Transplantation* 1992; 53(2):323-8.
99. Basadonna GP, Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DE, et al. Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation* 1993; 55(5):993-5.
100. Cosio FG, Pelletier RP, Falkenhain ME, Henry MC, Elkhammas EA, Davies EA, et al. Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63(11):1611-5.
101. Hunsicker LG, Held PJ. The role of HLA matching for cadaveric renal transplants in the cyclosporine era. *Semin Nephrol* 1992;12(4):293-303.
102. Azuma H, Nadeau KC, Ishibashi M, Tilney NL. Prevention of functional, structural and molecular changes of chronic rejection of rat renal allografts by a specific macrophage inhibitor. *Transplantation* 1995;60(12):1577-82.
103. Raisanen-Sokolowski A, Glysing-Jensen T, Mottram PL, Russell ME. Sustained anti-CD4/CD8 treatment blocks inflammatory activation and intimal thickening in mouse heart allografts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(10):2115-22.
104. Azuma H, Binder J, Heemann U, Schmid C, Tullius SG, Tilney NL. Effects of RS61443 on functional and morphological changes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transplantation* 1995;59(4):460-6.
105. Akalin E, Chandraker A, Russell ME, Tinke LA, Hancock WW, Sayegh MH. CD28-B7 T cell costimulatory blockade by CTLA4Ig in the rat renal allograft model: inhibition of cell-mediated and humoral immune responses in vivo. *Transplantation* 1996;62(12):1942-5.
106. Noronha I, Weis H, Hartley B, Wallach D, Cameron JS, Waldherr R. Expression of cytokines, growth factors, and their receptors in renal allograft biopsies. *Transplant Proc* 1993; 25(1):917-8.

107. Sharma V, Bologna R, Xu GP, Li B, Mouradian J, Wang J, et al. Intragraft TGF- $\beta$  mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 1996;49(5):1297-303.
108. Halloran PF, Melk A, Barth C. Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(1):167-81.
109. Azuma H, Nadeau K, Mackenzie HS, Brenner BM, Tilney NL. Nephron mass modulates the hemodynamic, cellular, and molecular response of the rat renal allograft. *Transplantation* 1997;63(4):519-28.
110. Ojo AO, Meier-Kriesche HU, Hanson JA, Leichtman AB, Cibrik P, Mafee JC, et al. Mycophenolate Mofetil reduces late renal allograft loss independent of acute rejection. *Transplantation* 2000;69(11):2405-9.
111. Viklicky O, Zou H, Muller V, Lacha J, Szabo A, Heemann U. SDZ-RAD prevents manifestation of chronic rejection in rat renal allografts. *Transplantation* 2000;69(4):497-502.
112. Kahan, BD. The role of rapamycin in chronic rejection prophylaxis: a theoretical consideration. *Graft* 1998;1(2):93-6.
113. Raine AEG. Does antihypertensive therapy modify chronic allograft failure? *Kidney Int* 1995;48 Suppl 1:107-11.
114. Motomura N, Saito S, Foegh ML. HMG-CoA reductase inhibitors in organ transplantation. *J Nephrol* 1997;10(2):68-76.
115. Traindl O, Falger S, Reading S, Banyai M, Liebisch B, Gisinger J, et al. The effects of lisinopril on renal function in proteinuric transplant recipients. *Transplantation* 1993;55(6):1309-13.
116. Delaney V, Ling BN, Campbell WG, Bourke JE, Felete PS, O'Brien DP 3<sup>rd</sup>, et al. Comparison of fine-needle aspiration biopsy, Doppler ultrasound, and radionuclide scintigraphy in the diagnosis of acute allograft dysfunction in renal transplant recipients: sensitivity, specificity, and cost analysis. *Nephron* 1993; 63(3):263-72.

117. Gray D, Richardson A, Hughes D, Fuggle S, Dunnill M, Higgins R, et al. A prospective, randomized, blind comparison of three biopsy techniques in the management of patients after renal transplantation. *Transplantation* 1992; 53(6):1226-32.
118. Nahas WC, Mazzuchi E, Henrique A, Ianhez LE, Saldanha LB, Sabbaga E, et al. Percutaneous needle biopsy of the renal allograft using the automated needle system: evaluation of 87 procedures. *J Urol* 1993; 150(2 Pt 1):313-5.
119. Wilczek HE. Percutaneous needle biopsy of the renal allograft. A clinical safety evaluation of 1129 biopsies. *Transplantation* 1990; 50(5):1790-7.
120. Kolb LG, Velosa JA, Bergstralh EJ, Offord KP. Percutaneous renal allograft biopsy. A comparison of the two needle types and analysis of risk factors. *Transplantation* 1994; 57(12):1742-6.
121. Wenneberg L, Miyahara S, Wilczek HE. Percutaneous core-needle biopsies of renal transplant performed safely without radiographic aid: a prospective study. *Transplant Proc* 1994;26(3):1769-70.
122. Kiss D, Landman J, Mihtasch M, Huser B, Brunner FP, Thiel G. Risks and benefits of graft biopsy in renal transplantation under cyclosporin-A. *Clin Nephrol* 1992; 38(3):132-4.
123. Al-Awwa IA, Hariharan S, First MR. Importance of allograft biopsy in renal transplant recipients: correlation between clinical and histological diagnosis. *Am J Kidney Dis* 1998;31(6 Suppl 1):15-8.
124. Manfro RC, Lee JY, Lewgoy J, Edelweiss MI, Gonçalves LF, Prompt CA. O papel da biópsia renal percutânea no transplante renal. *Rev Ass Med Brasil* 1994; 40(2):108-12.
125. Solez K, Benediktsson H, Cavallo T, Crocker B, Demetris AJ, Drachenberg C, et al. Report of the Third Banff Conference on Allograft Pathology on classification and lesion scoring in renal allograft pathology. *Transplant Proc* 1996;28(1):441-4.
126. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bousib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999;55(2):713-23.



127. Solez K, Vicenti F, Filo RS. Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus versus cyclosporine. A report of the FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 1998;66(12):1736-40.
128. Olsen S, Spencer E, Cockburn S, Marcussen N, Solez K. Endocapillary glomerulitis in the renal allograft. *Transplantation* 1995;59(10):1421-5.
129. Trpkov K, Campbell P, Pazderka V, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody; analysis using the Banff grading schema. *Transplantation* 1996;61(11):1586-1592.
130. Weir MR, Hall-Craggs M, Shen SY, Posner JN, Alongi SV, Dagher FJ, et al. The prognostic value of the eosinophil in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 1986;41(6):709-712.
131. Noronha IL, Moura LA, Saldanha LB, Cavallo T. Classificação de Banff para patologia do transplante renal. In: Cruz J, Barros RT, editores. *Atualidades em Nefrologia 5*. 5th ed. São Paulo: Sarvier; 1998. p. 303-12.
132. Busch GJ, Reynolds FS, Galvanek EG, Braun WE, Dammin GJ. Human renal allografts. The role of vascular injury in early graft failure. *Medicine* 1971;50(1):29-83.
133. Bellamy CO, Randhawa PS. The clinical significance of arteriolitis in renal allograft biopsies. 5th Banff Conference on Allograft Pathology; 1999 May 5-9; Banff, Canada.
134. Saad R, Gritsch HA, Shapiro R, Jordan M, Vivas C, Scantlebury V, et al. Clinical significance of renal allograft biopsies with "borderline changes", as defined in the Banff schema. *Transplantation* 1997;64(7):992-5.
135. Schweitzer EJ, Drachenberg, CB, Anderson, LA, Papadimitriou JC, Kuo PC, Johnson LB, et al. Significance of the Banff borderline biopsy. *Am J Kidney Dis* 1996;28(4):585-8.
136. Yilmaz S, Taskinen E, Paavonen T, Häyry P. Protocol core biopsy (CADI): a surrogate marker for chronic rejection. Mycophenolate Mofetil ICM 1866 and IICR 023 Study Groups. *Transplant Proc* 2000;32(1A Suppl):12S.

137. Oh C, Jeong H, Kim Y, Kim MS, Choi KH, Lee HY, et al. Clinical validity of Banff grading of chronic rejection in renal transplantation. *Transplant Proc* 1996;28(3):1441-2.
138. Dimény E, Wahlberg J, Larsson E, Fellström B. Can histopathological findings in early renal allograft biopsies identify patients at risk for chronic vascular rejection? *Clin Transplant* 1995;9(2):79-84.
139. Furness PN, Kirkpatrick U, Taub N, Davies DR, Solez K. A UK-wide trial of the Banff classification of renal transplant pathology in routine diagnostic practice. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12(5):995-1000.
140. Dooper MM, Hoitsma AJ, Koene RA, Bogman MJ. Evaluation of the Banff criteria for the histological diagnosis of rejection in renal allograft biopsies. *Transplant Proc* 1995;27(1):1005-6.
141. Gaber LW, Schroeder TJ, Moore LW, Shakouh-Amiri MH, Gaber AO. The correlation of Banff scoring with reversibility of first and recurrent rejection episodes. *Transplantation* 1996;61(12):1711-5.
142. Gaber LW, Moore LW, Gaber AO, First MR, Guttmann RD, Pouletty P, et al. Utility of standardized histological classification in the management of acute rejection. 1995 Efficacy Endpoints Conference. *Transplantation* 1998;65(3):376-80.
143. Dean DE, Kamath S, Peddi VR, Schroeder TJ, First MR, Cavallo T. A blinded retrospective analysis of renal allograft pathology using the Banff schema. *Transplantation* 1999;68(5):642-5.
144. Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, Flax SD, Shokouh-Amiri MH, Schroeder T, et al. Correlation between Banff classification, acute renal rejection scores and reversal of rejection. *Kidney Int* 1996;49(2):481-7.
145. Kuypers DR, Chapman JR, O'Connell PJ, Allen RD, Nankivell BJ. Predictors of renal transplant histology at three months. *Transplantation* 1999;67(9):1222-30.

146. Isoniemi H, Krogerus L, von Willebrand E, Taskinen E, Ahonen J, Häyry P. Histopathological findings in well-functioning, long term renal allografts. *Kidney Int* 1992; 41(1):155-60.
147. Isoniemi H, Taskinen E, Häyry P. Histological chronic allograft damage index accurately predicts chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1994;58(11):1195-8.
148. Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Burke B, et al. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: Reproducibility, sensitivity and clinical correlation. *J Am Soc Nephrol* 1997;8(12):1930-41.
149. Bates WD, Davies DR, Welsh K, Gray DWR, Fuggle SV, Morris PJ. An evaluation of the Banff classification of early renal allograft biopsies and correlation with outcome. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14(10):2364-9.
150. van Sasse JL, van der Woude F, Thorogood J, Hollander AA, van Es LA, Weening JJ, et al. The relation between acute vascular and interstitial renal allograft rejection and subsequent chronic rejection. *Transplantation* 1995;59(9):1280-5.
151. Bhan AK. Immunoperoxidase. In: Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT, editors. *Diagnostic Immunopathology*. 2nd ed. New York: Raven Press Ltd., 1995. p. 711-23.
152. Sternberger LA, Hardy PH, Jr, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in the identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 1970;18(5):315-33.
153. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghossein AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984;32(2):219-29.
154. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979;27(8):1131-9.
155. Boenisch T. Basic enzymology. In: Naish SJ. *Immunochemical staining methods*. 1st

- ed. California: DAKO Corporation 1989; p. 9-12.
156. Boenisch T. Staining methods. In: Naish SJ. *Immunochemical staining methods*. 1st ed. California: DAKO Corporation 1989; p. 13-18.
157. Dallman MJ. Cytokine regulation of the immune response to organ transplants. In: Thomson A, Catto G, editors. *Immunology of Renal Transplantation*. 1st ed. London: Edward Arnold, 1993. p. 97-111.
158. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 1994;152(10):5120-7.
159. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, et al. Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94(2):695-700.
160. Sharma VK, Bologa RM, Li B, Xu GP, Lagman M, Hiscock W, et al. Molecular executors of cell death - differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* 1996;62(12):1860-6.
161. Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Eng J Med* 2001;344(13):947-54.
162. Kummer JA, Wever PC, Kamp AM, ten Berge IJM, Hack CE, Weening JJ. Expression of granzyme A and B proteins by cytotoxic lymphocytes involved in acute renal allograft rejection. *Kidney Int* 1995; 47(1):70-7.
163. Matsuno T, Sakagami K, Saito S, Naomoto Y, Okumura K, Orita K. Does perforin mediate the direct injury of renal allograft in acute rejection? *Transplant Proc* 1993; 25(1):879-80.
164. Larsen CP, Alexander DZ, Hendrix R, Ritchie SC, Pearson TC. Fas-mediated cytotoxicity. An immunoeffector or immunoregulatory pathway in T cell-mediated immune response? *Transplantation* 1995;60(3):221-4.

165. Dhein J, Walczak H, Bäuml C, Debatin KM, Kramer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995; 373(6513):438-441.
166. Marques VP, Balda CA, Moura LAR, Pestana JOM, Azjen H, Pacheco-Silva A. Expressão intra-enxerto renal humano de RNAm de perforina, FasL e iNOS durante rejeição aguda irreversível [abstract]. *J Bras Nefrol* 1996;18(3):165.
167. Noronha IL, Eberlein-Gonska M, Hartley B, Stephens S, Cameron JS, Waldherr R. In situ expression of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and interleukin-2 receptors in renal allograft biopsies. *Transplantation* 1992; 54(6):1017-24.
168. Dallman MJ, Larsen CP, Morris PG. Cytokine gene transcription in vascularised organs grafts: analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1991;174(2):493-6.
169. O'Connell P, Pacheco-Silva A, Nickerson P, Muggia RA, Bastos M, Kelley VR. Unmodified pancreatic islet allograft rejection results in the preferential expression of certain T cell activation transcripts. *J Immunol* 1993; 150(3):1093-104.
170. Krams SM, Falco DA, Villanueva JC, Rabkin J, Tomlanovich SJ, Vicenti F, et al. Cytokine and T cell receptor gene expression at the site of allograft rejection. *Transplantation* 1992;53(1):151-6.
171. Grimm PC, McKenna RM, Gospoderek EM, Jeffery JR, Rush DN. Low frequency of infiltrating cells intensely expressing T cell cytokine mRNA in human renal allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59(4):579-84.
172. Xu GP, Vijay KS, Li B, Bologna R, Li Y, Mouradian J, et al. Intragraft expression of IL-10 messenger RNA: a novel correlate of renal allograft rejection. *Kidney Int* 1995; 48(5):1504-7.
173. Fiorentino DF, Zlotni K, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991;146(10):3444-51.

174. Pavlakis M, Strehlau J, Lipman M, Shapiro M, Maslinski W, Strom TB. Intragraft IL-15 transcripts are increased in human renal allograft rejection. *Transplantation* 1996; 62(4):543-5.
175. Manfro RC, Roy-Chaudhury P, Zheng XX, Steiger J, Nickerson PW, Li Y, et al. Interleukin-15 gene transcripts are present in rejecting islet allografts. *Transplant Proc* 1997; 29(1-2):1077-8.
176. Manfro RC, Gonçalves LF, Rauber M, Moura LAR. Analysis of ICAM-1 and HLA-DR expression on renal allograft aspirates. *Clin Transplant* 1996; 10(4):379-83.
177. Brockmeyer C, Ulbrecht M, Schendel DJ, Weiss EH, Hillebrand G, Burkhardt K, et al. Distribution of cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1) in renal tissue during allograft rejection. *Transplantation* 1993; 55(3):610-5.
178. von Willebrand E, Krogerus L, Salmela K, Isoniemi H, Häyry P, Laakkonen M, et al. Expression of adhesion molecules and their ligands in acute rejection of human kidney allografts. *Transplant Proc* 1995; 27(1):917-8.
179. Thervet E, Patey N, Legendre C, Noel LH, Kreis H. Prospective serial evaluation of cell adhesion molecule expression in transplanted kidneys. *Transplant Proc* 1995; 27(1):1007-8.
180. Veronese FV, Centeno AD, Almeida AG, Fritsch A, Mello AG, Webber A, et al. Biópsia percutânea do enxerto renal: para onde vamos? *Rev Ass Med Br* 1999;45(2):169-74.
181. d'Ardenne AJ, Dunnill MS, Thompson JF, McWhinnie D, Wood RF, Morris P. Cyclosporin and renal graft histology. *J Clin Pathol* 1986;39(2):145-51.
182. Raftery MJ, Serón D, Koffman G, Hartley B, Janossy G, Cameron JS. The relevance of induced class II HLA antigens and macrophage infiltration in early renal allograft biopsies. *Transplantation* 1989;48(2):238-43.
183. Thomas JM, Carver FM, Heisch CE, Fahrenbruch G, Deepe RM, Thomas FT. Suppressor cells in rhesus monkeys treated with antithymocyte globulin. *Transplantation* 1982;34(2):83-9.
184. Suciú-Foca N, Rohowsky C, Kung P, King DW. Idiotype-like determinants on human T

- lymphocytes alloactivated in mixed lymphocyte culture. *J Exp Med* 1982;156(1):283-8.
185. Limchiu L, Houghton D, Norman DJ, Bennett WM, DeMattos AM, Meyer MM. Evaluation of routine renal allograft biopsies [abstract]. 14th Annual Meeting of the American Society of Transplant Physicians, 1995; May 14-17, Chicago, USA.
186. Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Protocol biopsies in stable renal transplant patients under triple immunosuppression: results at 6 months. *Transplant Proc* 1994;26(5):2576.
187. Veronese FV, Gonçalves LF, Edelweiss MI, Manfro RC. Interpretation of surveillance kidney allograft biopsies according to the Banff criteria. *Transplant Proc* 1999;31(7):3019-20.
188. Legendre C, Thervet E, Skhiri H, Mamzer-Bruneel MF, Cantarovich F, Noel LH, et al. Histologic features of chronic allograft nephropathy revealed by protocol biopsies in kidney transplant recipients. *Transplantation* 1998;65(11):1506-9.
189. Nickerson P, Somorjai R, Deslauriers R, Shaw A, Jeffery J, Rush DN. Urine MR spectra can accurately distinguish normal allografts from those with biopsy proven rejection. *Transplantation* 1999;67(3):11-6.
190. Rush DN, Somorjai R, Deslauriers R, Shaw A, Jeffery J, Nickerson P. Subclinical rejection- a potential surrogate marker for chronic rejection- may be diagnosed by protocol biopsy or urine spectroscopy. *Ann Transplant.* 2000;5(2):44-9.
191. Matas AJ, Gillingham K, Payne WD, Najarian JS. The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2). *Transplantation* 1994;57(6):857-9.
192. Cole E, Naimark D, Aprile M, Wade J, Cattran P, Pei Y, et al. An analysis of predictors of long-term cadaveric renal allograft survival. *Clin Transplant* 1995;9(4):282-8.
193. Nickerson P, Jeffery J, Gough J, Grimm P, McKenna R, Birk P, et al. Effect of increasing baseline immunosuppression on the prevalence of clinical and subclinical rejection: a pilot study. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(8):1801-5.
194. Pavlakis M, Lipman M, Strom TB. Intragraft expression of T-cell activation genes in human renal allograft rejection. *Kidney Int* 1996;53 Suppl 1:7-12.

## 5. ARTIGOS APRESENTADOS ÀS REVISTAS



## 5.1. ARTIGO 1

### **Can early clinical, histological, and immunohistochemical evaluations predict the development of chronic allograft nephropathy?**

Francisco V Veronese<sup>1,2</sup>; Irene L Noronha<sup>3</sup>; Roberto C Manfro<sup>2</sup>; David N Rush<sup>4</sup>; Sylvia Dancea<sup>5</sup>; Maria I Edelweiss<sup>6</sup>; Julio Goldberg<sup>7</sup>; Luiz F Gonçalves<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate Course in Clinical Medicine and <sup>2</sup>Renal Division, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup>Renal Division, Department of Clinical Medicine, Universidade de São Paulo, Brazil; <sup>4</sup>Department of Medicine and <sup>5</sup>Department of Pathology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada; <sup>6</sup>Pathology Division, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>7</sup>Transplant Division, Instituto de Nefrología, Buenos Aires, Argentina.

#### **Correspondence:**

Francisco V. Veronese, M.D.

Renal Division - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-003

Porto Alegre, RS - Brazil

Phone: +55.51.3328.4584

Fax: +55.51.3233.2710

E-mail: franvero@via-rs.net

## **Subclinical rejection in renal transplantation**

**Key words:** rejection, biopsies, kidney transplantation

## **Can early clinical, histological, and immunohistochemical evaluations predict the development of chronic allograft nephropathy?**

**Background:** Acute subclinical rejection (ASCR) in stable renal transplant patients may be a risk factor for chronic allograft nephropathy (CAN). In the present study, the incidence of ASCR and the expression of immune activation markers in surveillance biopsies of renal grafts was assessed and correlated with the development of CAN.

**Methods:** Protocol biopsies were obtained at 2 and 12 months post-transplant in patients with stable renal function. The Banff criteria were used for histological diagnosis. Graft function and proteinuria were assessed along the 36 months of follow-up. Immunohistochemical evaluation of cell subpopulations and immunoactivation markers was performed on protocol biopsies. The association of independent variables with CAN was analyzed by stepwise logistic regression.

**Results:** The incidence of ASCR at 2 months and of CAN at 12 months was 28.1 and 46.2%, respectively. Graft function was significantly worsened in patients with ASCR who developed CAN in the first year post-transplant. Positive CD3+ and CD4+T lymphocyte and macrophage markers, and IL-2R and granzyme B expression were increased in ASCR patients. However, when the logistic regression analysis was used, only granzyme B expression showed correlation with ASCR. Age of the receptor and serum creatinine levels at 2 months were predictive of CAN at 12 months.

**Conclusion:** ASCR at 2 months was associated with worsened graft function in the third year in patients progressing to CAN. Even though an association of ASCR with chronic rejection was not observed, our results suggest that ASCR is an immunologically active process potentially damaging to kidney grafts. These findings underscore the importance of protocol biopsies in the immunological surveillance of transplanted kidneys.

## Introduction

Several studies have shown that about 30% of transplanted kidneys with stable function present tubulointerstitial mononuclear cellular infiltration on surveillance biopsies and meet histological criteria for acute rejection [1-7]. Immunohistochemical phenotypic characterization of cellular infiltration has shown that these cells are predominantly CD4+ and CD8+ T lymphocytes and, at a lower rate, monocytes and macrophages [1, 2, 8-10]. More recently, the detection of in situ expression of class II HLA antigens, cytokines, adhesion molecules, and growth factors in biopsies of grafts without evident clinical rejection has suggested the presence of an active immunological process not yet identified [11-16].

Polymerase chain reaction (PCR) has been used to detect and quantify gene transcription for several cytokines and cytotoxic molecules in stable grafts, some of which presenting acute histological rejection, defined according to the Banff criteria [17]. This has demonstrated the unequivocal presence of immune activation, although to a lesser degree than what is observed in cases of rejection with graft dysfunction [18-21]. In spite of this evidence, it is still controversial whether patients with acute subclinical rejection (ASCR) will have an unfavorable long-term clinical outcome represented by worsened graft function, progression to chronic nephropathy and shorter survival of the transplanted kidney [6, 22, 23-26]. It is also unclear whether the identification of ASCR through protocol biopsies and treatment with more aggressive immunosuppression may change the immunological and clinical course of the transplanted kidney [27-29].

In this study, stable renal transplant patients underwent protocol biopsies in the first year post-transplant. The incidence of subclinical rejection, phenotype of mononuclear cell infiltrates, and expression of immune activation molecules in the allograft were assessed. Clinical and immunohistochemical parameters at 2 months were correlated with the development of chronic allograft nephropathy (CAN) at 12 months to identify the predictive variables for chronic rejection.

## Methods

This study included 32 renal transplant patients followed at the Renal Transplant Unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) from March 1996 to October 1997. Inclusion criteria were variation of serum creatinine below 20% and unchanged immunosuppression for at least 15 days prior to the protocol biopsies. Patients with acute graft dysfunction or active infection of any etiology were excluded. The Research and Ethics Committee at HCPA approved this protocol.

We evaluated the following variables at the time of transplantation: age and sex of the receptor, type and age of the donor, HLA compatibility for living transplants, previous transplants, pregnancies, total number of transfusions, value of last panel antibody reactivity before transplant, and duration of cold ischemia and vascular anastomosis. After transplantation, we assessed the incidence of acute tubular necrosis (ATN), defined by the need for dialysis in the first week post-transplant, and the presence and total number of acute clinical rejections. Classical clinical signs defined acute clinical rejection whenever they were observed, by the clinical response to treatment, and by graft biopsy in cases of corticoreistant rejection.

Allograft function was determined by the daily serum creatinine dosage until hospital discharge, twice a week in the first and second months post-transplant, weekly in the third month, every 15 days in the fourth month, monthly up to the 12th month, and every 2 months up to the 36th month. Twenty-four hour proteinuria was measured at 2, 12, 24 and 36 months as screening for CAN.

Baseline immunosuppression consisted of prednisone, azathioprine and Neoral cyclosporine in 29 patients (90.6%); three patients received mycophenolate mofetil instead of azathioprine. Four patients underwent induction therapy with OKT3, and OKT3 was also used for rescue of steroid-resistant rejection in three cases.

Protocol biopsies were performed 2 months post-transplant (B-2mo) in all 32 patients included in the study, and 12 months post-transplant (B-12mo) in 26 (81%) patients. Six

patients were not rebiopsied due to refusal (2), pregnancy (1), death with functioning kidney (1), loss of graft in the end of the third month (1), and change in patient's immunosuppression in the 12th month (1).

Procedures were performed with a spring-loaded 16-gauge Biopsy-gun (C. R. Bard Inc., Covington, GA, USA) after ultrasound localization. Two core biopsies were taken, one for light microscopy (LM) with conventional stainings, and another for immunohistochemical analysis. Histopathologic findings were interpreted according to the Banff 1997 classification [30] by a renal pathologist (SD) blinded to clinical data.

Core biopsy samples for immunohistochemical analysis were embedded in OCT (Tissue-Tek®), snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until examination. Anti-granzyme B and anti-transforming growth factor  $\beta_1$  ( $\text{TGF}\beta_1$ ) antibodies were applied to sections cut from the paraffin block, and the remaining antibodies were applied to frozen tissue sections cut on a cryostat. For the phenotypic characterization of infiltrate cells we used anti-human murine monoclonal antibodies against CD3 and CD4 T lymphocytes and macrophages (CD68) (Dakopatts, Copenhagen, Denmark), and CD8 lymphocyte (Chemicon International, Inc., Temecula, CA). The techniques used were alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase (APAAP) [12] for anti-CD3 and anti-CD68 antibodies, and streptavidin-biotin-alkaline phosphatase for anti-CD4 and anti-CD8 antibodies [31]. For the immune activation markers, monoclonal antibodies against interleukin 2 receptor (IL-2R) (Clonab – Biotest AG, Dreieich, West Germany), granzyme B (Chemicon International, Inc., Temecula, CA), and perforin (Pharmacell, Paris, France) were used; the streptavidin-biotin-alkaline phosphatase technique was employed [31]. For fibrosis evaluation, a monoclonal antibody against  $\text{TGF}\beta_1$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) was employed with the avidin-biotin peroxidase technique [31].

Intensity of antigen expression was evaluated semiquantitatively, and the following scores were standardized: 0 – no expression; 1 – weak expression; 2 – moderate expression; 3 – intense expression. Two observers, who were blinded to clinical data and

histology, scored all core biopsies independently. The final score consisted of the average of the two readings.

For the statistical analysis, unpaired *t* test, Mann-Whitney's test, chi-square test or Fisher's test were employed whenever appropriate. Stepwise logistic regression analysis was performed to identify clinical and immunohistochemical variables predictive of CAN. *P* values below 0.05 were considered statistically significant.

## Results

Three biopsies at 2 months and two biopsies at 12 months were not representative and were excluded. Therefore, 29 and 24 biopsies in each period, respectively, were included in the analysis. Patients were divided into four groups according to the period and histopathologic diagnosis (Table 1). At B-2mo we found: 1) presence or suspicion of ASCR, *n* = 16 (55%), and 2) absence of ASCR (NoASCR), *n* = 13 (45%). At B-12mo we found: 3) presence of CAN, *n* = 12 (50%), and 4) absence of CAN (NoCAN), *n* = 12 (50%).

Demographic and clinical data are presented in Table 2. Both age of the receptor and duration of cold ischemia showed a trend to be higher in patients with CAN than in patients of the NoCAN group. The total number of acute rejections in the first 2 months also showed a trend to be higher in patients of the ASCR group than in those of the NoASCR group. There was no statistically significant difference in the type and age of the donor, HLA matching, number of previous transplants, pregnancies, transfusions, panel antibody reactivity, vascular anastomosis time, or prevalence of ATN for patients with or without ASCR, neither for patients with or without CAN.

There was no statistically significant difference in graft function, as measured by serum creatinine, and in daily urinary protein excretion between patients with and without ASCR or between the groups with and without CAN in all periods of follow-up, as shown in Table 3. Although the averages for serum creatinine and proteinuria were higher at the end

of the third year in the groups with ASCR and CAN, these values did not reach statistical significance.

We separately compared the subgroup with ASCR at 2 months that progressed to CAN at 12 months ( $n = 7$ ; 29,1%) with the group of patients with CAN not preceded by ASCR in the first biopsy ( $n = 5$ ; 20,8%). Serum creatinine at the end of follow-up was significantly higher in the group with ASCR ( $2.70\text{mg/dL} \pm 2.50\text{mg/dL}$  vs.  $1.24\text{mg/dL} \pm 0.13\text{mg/dL}$ , respectively;  $P = 0.048$ ). Final proteinuria was also higher for patients with early ASCR ( $848\text{mg/24h} \pm 1294\text{mg/24h}$  vs.  $414\text{mg/24h} \pm 433\text{mg/24h}$ ;  $P = .662$ ), but no statistically significant difference was found in relation to the other group.

Phenotypic characterization of cellular infiltrates (Table 4) showed that the number of CD3+ cells in patients with ASCR at 2 months was significantly higher than in patients from the NoASCR group, and this increased expression was also observed in the biopsies performed at 12 months. The number of CD4+ T lymphocytes at B-2mo was also significantly higher in the ASCR group, as well as the score for macrophages, which was significantly higher at the initial biopsy in this group.

In 2-month biopsies, the score for cytotoxic T lymphocyte (CD8+) positivity was not different in the ASCR and NoASCR groups, as shown in Table 4. However, the positive marker for CD8 cells in biopsy at 12 months was more intense in patients who had ASCR at 2 months ( $1.83 \pm 0.95$  vs. NoASCR  $1.08 \pm 0.60$ ,  $P = 0.035$ ), which shows the persistence of a potentially cytotoxic inflammatory infiltrate in the latter biopsy.

IL-2R and granzyme B expression in biopsies at 2 months were significantly increased in the ASCR patients, which revealed the presence of intragraft immune active cells. There was also more intense expression of perforin in the ASCR group, as shown in Table 5.

In 12-month biopsies, the number of infiltrating cells and the expression of immune activation molecules in patients with CAN were similar to the results observed in the NoCAN group. In the subgroup of patients with ASCR at 2 months who progressed to CAN at 12 months, only the difference in the expression of granzyme B at B-12mo showed statistical



significance in comparison with the patients with CAN without previous ASCR ( $1.43 \pm 0.81$  vs.  $0.48 \pm 0.42$ , respectively;  $P = 0.038$ ). The number of CD8+ lymphocytes at B-12mo ( $2.21 \pm 0.93$  vs.  $1.35 \pm 0.95$ ;  $P = .164$ ) and the expression of perforin at B-2mo ( $1.86 \pm 1.14$  vs.  $1.05 \pm 0.48$ ;  $P = .131$ ), though of larger magnitude in the ASCR group that progressed to CAN, were not statistically different from the other group.

In the comparison of histological categories ASCR vs. NoASCR and CAN vs. NoCAN, analysis of the intensity of TGF $\beta_1$  expression, both in the initial biopsies and in biopsies performed at 12 months, did not show a statistically significant difference (Table 5).

The following variables were included in the logistic regression model: age and sex of receptor, number of transfusions, type and age of the donor, duration of cold ischemia and vascular anastomosis, presence of ATN, number of clinical rejections, creatinine at 2 and 6 months post-transplant, presence of ASCR in biopsy at 2 months, and the score derived from the expression of CD3, CD4, CD8 T lymphocytes, macrophage, IL-2R, perforin, granzyme B, and TGF $\beta_1$  in the biopsy at 2 months.

In an additional analysis with the same parameters in the model, but considering ASCR at 2 months as a dependent variable, the expression of granzyme B at B-2mo was the only variable independently associated with ASCR (odds ratio = 58.4; 95% confidence interval, 1.55-2194.67;  $P = 0.027$ ).

In the analysis of predictive variables for CAN, there was a statistically significant association between age of the receptor and development of CAN (odds ratio = 1.12; 95%CI, 1.004-1.25;  $P = 0.042$ ). Serum creatinine value at 2 months showed a trend towards the association with CAN (odds ratio = 58.5; 95%CI, 0.72-4710.76;  $P = 0.069$ ). When the level of creatinine was adjusted to age of the receptor in the model, graft function at 2 months became predictive of CAN (odds ratio = 358.56; 95%CI, 1.52-84476.73;  $P = 0.034$ ).

The presence of ASCR at 2 months and serum creatinine at 6 months was not predictive of chronic rejection. However, vascular anastomosis time tended to be associated with CAN (odds ratio = 1.09; 95%CI, 0.98-1.19;  $P = 0.083$ ). As we analyzed the 12 patients

with CAN at B-12mo, we observed that no clinical or immunohistochemical variable from the initial post-transplant phase correlated with chronic rejection at 12 months.

When we analyzed the co-expression of cytotoxic lymphocyte CD8+, macrophage, and granzyme B at B-2mo, or the co-expression of IL-2R, perforin, and granzyme B at B-2mo, as independent variables, no statistically significant association was found between the conjunct expression of these immunoactivation markers and CAN at 12 months.

## **Discussion**

The usefulness of surveillance biopsies in the immunological monitoring of stable transplanted kidneys is still under discussion, although several studies have demonstrated that about 30% of these grafts meet unequivocal criteria for acute rejection in the first 3 months post-transplant [3, 5-7, 26], and that 20 to 50% of transplanted kidneys show histological chronic rejection 1 year after transplantation [7, 24, 26, 32]. In the present study, the incidence of ASCR and CAN was similar (28.1% and 46.2%, respectively). On the other hand, Serón et al. [24] detected ASCR in protocol biopsies at 8 weeks post-transplant in only 4.1% of the patients. This finding may be explained, among other factors, by the immunosuppressive regimen that included antilymphocyte antibodies as induction therapy and by the precocity of the surveillance biopsy. This fact suggests that immunosuppression may influence the prevalence and magnitude of the mononuclear interstitial infiltrate, as has been previously observed for regimens including cyclosporine [2].

In this study, patients with B-2mo showing "suspicious for acute rejection" were included in the group with acute subclinical rejection for statistical analysis, based on the data provided by Rush et al. [33], who found a significant correlation between subclinical borderline changes and clinical rejection episodes in subsequent months. In another study, Saad et al. [34] also observed that the treatment of borderline rejection with graft dysfunction resulted in improvement of graft function in a significant number of patients; those authors suggested that this histological category represented a minor tubulointerstitial rejection.

Analysis of the demographic and clinical data did not reveal any association with early ASCR. Other authors did not find any correlation either for type and age of donor, duration of cold ischemia or presence of ATN [3,24,35]. Rush et al. [35], using multivariate analysis, observed that the level of HLA-DR incompatibility between donor and receptor was associated with subclinical rejection. In our study, this factor was not evaluated, since the selection of recipients for cadaveric grafts by HLA compatibility has only recently been introduced in our center.

Duration of cold ischemia was longer in patients with CAN at B-12mo. The influence of cold ischemia time on graft function and histology was experimentally demonstrated in rats [36]. Halloran et al. [37] emphasized that, in clinical transplantation, increased duration of preservation and anastomosis represents a risk factor for dysfunction and shorter survival of the transplanted kidney.

Receptor's age and serum creatinine at 2 months were predictive of CAN. However, in spite of the statistical significance observed, it is important to mention that the large variation in odds ratio and confidence interval found in logistic regression analysis makes the interpretation of these results difficult because of the small number of cases with a positive outcome.

Acute rejection has been considered an important risk factor for chronic rejection and decreased long-term kidney graft survival, but the causal relation between acute and chronic rejection remains obscure [37-42]. Nickerson et al. [25] found that each late acute rejection episode meant a 5.9 fold increase in the risk for reduction of renal graft function at 2 years post-transplant. Serón et al. [24] evaluated the predictive value of protocol biopsy at 3 months for late graft loss and observed that the incidence of acute rejection before protocol biopsy was higher in patients with CAN. In the logistic regression analysis performed in that study, only acute clinical rejection and higher serum cyclosporine levels in early post-transplant period were predictive of CAN. In our study, however, the number of acute rejection episodes was not different in the groups with and without CAN.

Patients with ASCR at 2 months had a higher number of acute clinical rejections in

the first post-transplant month. Fourteen (43.8%) patients had acute rejection treated  $11.4 \pm 5.1$  days post-transplant on average, and in eight (57.1%) of these cases there was histological rejection in the protocol biopsy at 60 days. It is possible that ASCR in these patients represents the continuity of an uncontrolled initial acute cellular rejection, as suggested by Mazzucchi et al. [43], who demonstrated the persistence of acute rejection in subsequent biopsies in 25% to 30% of the cases treated with methylprednisolone, in spite of apparent response to therapy with steroid pulses. In a prospective study, Limchui et al. demonstrated that ASCR at 2 months was associated with a higher number of recurrent rejections up to the third year post-transplant. In the subgroup of patients treated for ASCR, serum creatinine levels dropped by more than 20% in relation to baseline values (Limchui L et al., 14th Annual Meeting of the American Society of Transplant Physicians, 1995).

One of the purposes of our study was to evaluate whether ASCR is a risk factor for CAN. It has been speculated that the cellular infiltrate frequently found in serial biopsies might be immunologically active, constituting a persistent low-grade inflammation that damages the allograft [6, 29, 33]. According to this hypothesis, Rush et al. [7,32] demonstrated that patients with borderline rejection and ASCR in serial biopsies, with higher Banff scores for acute inflammation, presented a higher number of chronic lesions and a worsened graft function at the end of the first year post-transplant. These authors suggest that persistent inflammation, even if subclinical, may lead to graft dysfunction if immunosuppression is not efficient in controlling ASCR. Legendre et al. [36] also observed that ASCR in protocol biopsy at 3 months in patients who had never presented clinical rejection constitutes a risk factor for chronic rejection at 2 years post-transplant. Nickerson et al. [25] reported that ASCR in protocol biopsy at 6 months correlated independently with serum creatinine at 2 years post-transplant. In our study, patients with chronic nephropathy preceded by ASCR had worsened graft function in the third year post-transplant; proteinuria was also higher, although not statistically different from that of patients without previous ASCR. However, in the logistic regression analysis, ASCR at 2 months was not predictive of

CAN at 12 months, although the absence of statistical significance may be related to the small number of patients with this outcome.

Immunohistochemical examination revealed a significantly higher number of CD3+, CD4+ T lymphocytes and macrophages in the biopsies of patients with ASCR at 2 months post-transplant. In the biopsy at 12 months, the group with ASCR presented more intense expression of CD8+ cytotoxic lymphocytes, which suggests the persistence of an active inflammatory infiltrate in a late post-transplant period. Several studies employing immunohistochemistry or molecular methods have shown the presence of immune activated cells in acute rejection in association with graft dysfunction [18, 44-46] and also in grafts with stable function [19-21].

Scores for macrophage positive cells were particularly high in biopsies with ASCR in this study. Similar data was also reported by other authors in studies in which the macrophage population was almost 50% of the total infiltrating cells in kidneys with acute rejection [20], and this phenotypic profile is predictive of more severe degrees of cellular rejection [47]. Specific subpopulations of infiltrating cells, however, did not correlate significantly with chronic graft nephropathy in our study.

In the series studied, the expression of immune activation markers, such as IL-2R and granzyme B, was significantly higher in the biopsies of patients with ASCR, and there was also a more intense expression of perforin in these biopsies. In acute rejection, either associated with graft dysfunction or subclinical, the IL-2 messenger RNA (mRNA) expression is usually minimal or absent [18, 19, 48] and probably not sustained, as it precedes graft dysfunction [49]. When studying IL-2 receptor in graft rejection, Kooijimas-Coutinho et al. [50] used immunohistology and PCR to document the early expression of IL-2R in protocol biopsies seven days post-transplant in association with subsequent episodes of acute rejection. Other authors reported intense expression of IL-2R receptor on the surface of active infiltrating cells during ongoing clinical rejection, which has also been found, although less intensely, in grafts without histological rejection [12-14, 51].

Intragraft mRNA co-expression of genes coding for perforin, granzyme B, and Fas

ligand showed 100% sensitivity and specificity for the diagnosis of acute rejection [18], with a direct correlation between this co-expression and the degree of severity of histological rejection defined by the Banff criteria [45]. Lipman et al. [19] used quantitative PCR to demonstrate the gene transcription of perforin, granzyme B, and Fas ligand in stable graft biopsies with ASCR. When compared with normal biopsies and borderline rejection infiltrates, the expression of perforin was significantly higher in ASCR patients, the same as the expression of T cell receptor beta chain, gamma interferon, IL-4 and IL-15. In the study of Suthanthiran [52], which employed the same methodology, but in kidneys with clinical rejection, mRNA expression of granzyme B and Fas ligand showed an excellent correlation with acute rejection to confirm the involvement of both cytolytic pathways in the immune response to the allograft. According to these data, our findings showed that the expression of granzyme B detected on B-2mo was predictive of ASCR at 2 months, and that this expression remained significantly increased in patients with ASCR who progressed to CAN. Although not statistically different, the expression of perforin and of cytotoxic CD8+ lymphocytes was also stronger. These data reinforce the hypothesis that this cytolytic pathway may be present as one of the effector mechanisms of graft lesion in ASCR.

More recently, non-invasive diagnosis of acute rejection in renal transplant patients has been demonstrated by the identification of effector molecules in peripheral blood leukocytes [53] and in urine cells [54] through molecular methods; these findings have been correlated with simultaneous gene transcription of the same molecules in renal graft biopsies with acute rejection. In the study carried out by Li et al. [54], the sensitivity and specificity of perforin and granzyme B mRNA expression in urine cells for the diagnosis of acute rejection were 83%, 83%, 79% and 77%, respectively.

TGF $\beta_1$  mRNA expression has been associated with the production of extracellular matrix and collagen, interstitial fibrosis, and CAN [55]. In acute rejection, the quantitative analysis of the expression of the TGF $\beta_1$  gene by PCR presented a sensitivity and specificity of only 45% and 55%, respectively, and did not distinguish rejection from non-rejection [18].

In ASCR, the transcription of the  $TGF\beta_1$  gene is not detectable, as in the biopsies with borderline rejection [19]. In our study, there was no difference in the expression of  $TGF\beta_1$  in the biopsies with and without ASCR, as expected, but in cases of CAN, the expression of  $TGF\beta_1$  was unexpectedly similar to that of the other histological groups. In the logistic regression analysis, this marker of fibrosis was not predictive of CAN at 12 months either. It is possible that  $TGF\beta_1$  quantification through a more sensitive method such as PCR may better discriminate between histological categories in our study.

It is important to emphasize that immunohistochemical methods for the diagnosis of immune activation are limited. Alone, they do not show whether cells such as lymphocytes and macrophages are effectively producing cytokines and other molecules, or whether they are inactive [56]. More sensitive and specific methods, such as PCR or in situ hybridization, may identify immune active cells and thus indicate the presence of a pathogenic process that deserves treatment [27] or at least some more efficient prophylactic immunosuppression [28] to protect the renal allograft.

In conclusion, the prevalence of ASCR and CAN in this study was not different from other series, and the presence of ASCR in the early post-transplant period was associated with worsened graft function in patients who progressed to CAN. The number of T lymphocytes and macrophages and the expression of IL-2R and granzyme B were significantly higher in biopsies with ASCR, which demonstrated the presence of intragraft immune activation. However, no cell or specific marker alone or in co-expression with another one was predictive of the development of CAN. These results reinforce the need for more studies with protocol biopsies for immunological monitoring of renal transplant patients.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Ms. Sabrina G Oliveira, Ms. Ivone B Oliveira and Mrs. Teresinha G Leitão for the expert technical assistance, regarding the extensive work of

immunohistochemistry preparation and quantification. We are also thankful to Dr. Vinícius Duval da Silva for his invaluable counseling and support during this research in relation to quantification of antigenic expression.

**Reprint request address:**

Francisco V. Veronese, M.D.

Renal Division - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-003 Porto Alegre, RS

Brazil

Phone: +55.51.3328.4584

Fax: +55.51.3233.2710

E-mail: [franvero@via-rs.net](mailto:franvero@via-rs.net)



## References

1. Burdick JF, Beschorner WE, Smith WR, *et al*: Characteristics of early routine renal allograft biopsies. *Transplantation* 38:679-684, 1984
2. McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM, *et al*: Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation* 42:352-358, 1986
3. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, *et al*: Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 57:208-211, 1994
4. Serón D, Díaz-Gallo C, Griño JM, *et al*: Characterization of interstitial infiltrate in early renal allograft biopsies in patients with stable renal function. *Transplant Proc* 23:1267-1269, 1991
5. Rush DN, Jeffery JR, Gough J: Protocol biopsies in stable renal transplant patients under triple immunosuppression: results at 6 months. *Transplant Proc* 26:2576, 1995
6. Rush DN, Jeffery JR, Gough J: Sequential protocol biopsies in renal transplant patients: repeated inflammation is associated with impaired graft function at 1 year. *Transplant Proc* 27:1017-1018, 1995
7. Veronese FV, Gonçalves LF, Edelweiss MI, Manfro RC: Interpretation of surveillance kidney allograft biopsies according to the Banff criteria. *Transplant Proc* 31:3019-3020, 1999
8. Platt JL, LeBien TW, Michael AF: Interstitial mononuclear cell populations in renal graft rejection. Identification by monoclonal antibodies in tissue sections. *J Exp Med* 155:17-30, 1982
9. Kolbec PC, Tatum AH, Sanfilippo F: Phenotypic evaluation of mononuclear cell infiltrates in renal allograft biopsies. *Transplant Proc* 17:893-895, 1985
10. McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM, *et al*: Leukocyte infiltration patterns in renal allografts assessed by immunoperoxidase staining of 245 sequential biopsies. *Transplant Proc* 17:560-561, 1985

11. Raftery MJ, Serón D, Koffman G, *et al*: The relevance of induced class II HLA antigens and macrophage infiltration in early renal allograft biopsies. *Transplantation* 48:238-243, 1989
12. Noronha IL, Eberlein-Gonska M, Hartley B, *et al*: In situ expression of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and interleukin-2 receptors in renal allograft biopsies. *Transplantation* 54:1017-1024, 1992
13. Noronha IL, Weis H, Hartley B, *et al*: Expression of cytokines, growth factors, and their receptors in renal allograft biopsies. *Transplant Proc* 25:917-918, 1993
14. Andersen CB, Ladefoged SD, Larsen S: Acute kidney graft rejection. A morphological and immunohistological study on "zero-hour" and follow-up biopsies with special emphasis on cellular infiltrates and adhesion molecules. *APMIS* 102:23-37, 1994
15. Manfro RC, Gonçalves LF, Rauber M, Moura LA: Analysis of ICAM-1 and HLA-DR expression on renal allograft aspirates. *Clin Transplant* 10:379-383, 1996
16. Thervet E, Patey N, Legendre CH, *et al*: Prospective serial evaluation of cell adhesion molecule expression in transplanted kidneys. *Transplant Proc* 27:1007-1008, 1995
17. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, *et al*: International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 44:411-422, 1993
18. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, *et al*: Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci* 94:695-700, 1997
19. Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR, *et al*: Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation* 66:1673-1681, 1998
20. Grimm PC, McKenna R, Nickerson P, *et al*: Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *J Am Soc Nephrol* 10:1582-1589, 1999
21. Kirk AD, Jacobson LM, Heisey DM, *et al*: Clinically stable human renal allografts

- contain histological and RNA-based findings that correlate with deteriorating graft function. *Transplantation* 68:1578-1582, 1999
22. D' Ardenne AJ, Dunnill MS, Thompson JF, *et al*: Cyclosporin and renal graft histology. *J Clin Pathol* 39:145-151, 1986
  23. Dimény E, Wahlberg J, Larsson E, Fellström B: Can histopathological findings in early renal allograft biopsies identify patients at risk for chronic vascular rejection? *Clin Transplantation* 9:79-84, 1995
  24. Serón D, Moresco F, Bover J, *et al*: Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 51:310-316, 1997
  25. Nickerson P, Jeffery JR, Gough, J, *et al*: The identification of clinical and histopathological risk factors of diminished renal function 2 years post-transplant. *J Am Soc Nephrol* 9:482-487, 1998
  26. Legendre C, Thervet E, Skhiri H, *et al*: Histologic features of chronic allograft nephropathy revealed by protocol biopsies in kidney transplant recipients. *Transplantation* 65:1506-1509, 1998
  27. Rush DN, Nickerson P, Gough J, *et al*: Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 9:2129-2134, 1998
  28. Nickerson P, Jeffery J, Gough J, *et al*: Effect of increasing baseline immunosuppression on the prevalence of clinical and subclinical rejection: a pilot study. *J Am Soc Nephrol* 10:1801-1805, 1999
  29. Rush DN, Karpinski ME, Nickerson P, *et al*: Does subclinical rejection contribute to chronic rejection in renal transplant patients? *Clin Transplant* 13:441-446, 1999
  30. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, *et al*: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55:713-723, 1999
  31. Fujihara CK, Malheiros DMA, Zatz R, Noronha IL: Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int* 54:1017-1024, 1992

32. Rush DN, Jeffery JR, Gough, J: Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation* 59:511-514, 1995
33. Rush, DN, Nickerson P, Jeffery JR, *et al*: Protocol biopsies in renal transplantation: research tool or clinically useful? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7:691-694, 1998
34. Saad R, Gritsch HA, Shapiro R, *et al*: Clinical significance of renal allograft biopsies with "borderline changes", as defined in the Banff schema. *Transplantation* 64:992-995, 1997
35. Rush DN, Grimm P, Gough J, *et al*: Predicting rejection: is early diagnosis achievable and important? *Graft* 2:31-35, 1999
36. Yilmaz S, Paavonen T, Häyry P: Chronic rejection of renal allografts. The impact of prolonged ischemia time on transplant histology. *Transplantation* 53:823-827, 1992
37. Halloran PF, Melk A, Barth C: Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol* 10:167-181, 1999
38. Gulanikar AC, MacDonald AS, Sungurtein U, *et al*: The incidence and impact of early rejection episodes of graft outcome in recipients of first cadaver kidney transplants. *Transplantation* 53:323-328, 1992
39. Basadonna GP, Matas AJ, Gillingham KJ, *et al*: Early vs late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation* 55:993-995, 1993
40. Cosio FG, Pelletier RP, Falkenhain ME, *et al*: Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63:1611-1615
41. Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Najarian JS: The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival ( $t^{1/2}$ ). *Transplantation* 57:857-859, 1994
42. Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, *et al*: Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int* 49:518-524, 1996
43. Mazzucchi E, Lucon AM, Nahas WC, *et al*: Histological outcome of acute cellular rejection in kidney transplantation after treatment with methylprednisolone. *Transplantation* 67:430-434, 1999
44. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB: Heightened intragraft CTL gene expression in

acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 152:5120-5127, 1994

45. Sharma VK, Bologa RM, Li B, *et al*: Molecular executors of cell death - differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* 62:1860-1866, 1996
46. Kummer JA, Wever PC, Kamp AM, *et al*: Expression of granzyme A and B proteins by cytotoxic lymphocytes involved in acute renal allograft rejection. *Kidney Int* 47:70-77, 1995
47. Copin MC, Noel C, Hazzan M, *et al*: Diagnostic and predictive value of an immunohistochemical profile in asymptomatic acute rejection of renal allografts. *Transplant Immunol* 3:229-239, 1995
48. Grimm PC, McKenna RM, Gospodarek EM, *et al*: Low frequency of infiltrating cells intensely expressing T cell cytokine mRNA in human renal allograft rejection. *Transplantation* 59:579-584, 1995
49. Dallmann MJ, Larsen CP, Morris PG: Cytokine gene transcription in vascularized organ grafts: analysis using semi-quantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med* 174:493-496, 1991
50. Kooijmans-Coutinho MF, Bruijn JA, Hermans J, *et al*: Evaluation by histology, immunohistology and PCR of protocolized renal biopsies 1 week post-transplant in relation to subsequent rejection episodes. *Nephrol Dial Transplant* 10:847-854, 1995
51. Krams SM, Falco DA, Villanueva JC, *et al*: Cytokine and T cell receptor gene expression at the site of allograft rejection. *Transplantation* 53:151-156, 1992
52. Suthanthiran M: Human allograft rejection: molecular characterization. *Nephrol Dial Transplant* 13:21-24, 1998
53. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, *et al*: Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejection of renal allografts. *Transplantation* 66:562-566, 1998
54. Li B, Hartono C, Ding R, *et al*: Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Eng J Med*

344:947-954, 2001

55. Sharma VK, Bologa RM, Xu GP, *et al*: Intragraft TGF- $\beta_1$  mRNA: A correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 49:1297-1303, 1996
56. Dallman MJ: Cytokine regulation of the immune response to organ transplants, in *Immunology of Renal Transplantation*, edited by Thomson A, Catto G, London, Edward Arnold, 1993, pp 97-111

**Table 1.** Histological diagnosis according to Banff criteria 1997

	Biopsy at 2 months (n = 32)	Biopsy at 12 months (n = 26)
Normal	3 (9.4) <sup>a</sup>	3 (11.5)
Suspicious for rejection	7 (21.8)	2 (7.7)
Acute rejection	9 (28.1)	2 (7.7)
Tubulointerstitial - Grade IA	5 (15.6)	
Tubulointerstitial - Grade IB	2 (6.3)	2 (7.7)
Vascular - Grade IIA	2 (6.3)	-
CAN <sup>b</sup>	2 (6.3)	12 (46.2)
Grade I	2 (6.3)	8 (31)
Grade II	-	4 (15.1)
Nonspecific changes	8 (25)	5 (19.2)
Not representative	3 (9.4)	2 (7.7)
Total	32 (100)	26 (100)

CAN - chronic allograft nephropathy

<sup>a</sup> N (%)

**Table 2.** Demographic and clinical data for patients with and without subclinical rejection

	B-2mo		B-12mo	
	ASCR (n = 16)	NoASCR (n = 13)	CAN (n = 12)	NoCAN (n = 12)
Age (years)	36 ± 12	33 ± 11	41 ± 10 <sup>a</sup>	32 ± 13
Sex (M/F)	12/4	8/5	8/4	10/2
Donor (C/L)	8/8	5/8	5/7	6/6
Donor's age (years)	33 ± 12	37 ± 9	36 ± 12	30 ± 9
Last panel (%)	6 ± 6	1 ± 3	0 ± 0	6 ± 11
Cold ischemia (hours)	18 ± 4	20 ± 4	22 ± 3 <sup>b</sup>	17 ± 4
Anastomosis (minutes)	42 ± 15	42 ± 16	46 ± 18	36 ± 13
ATN (n[%])	4 (25)	5 (38)	5 (42)	3 (25)
AR (n[%])	10 (63) <sup>c</sup>	4 (31)	6 (50)	4 (33)
AR - Total	0.6 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.5

M/F - male/female; C/L - cadaver/living; ATN - acute tubular necrosis; AR - acute rejection

<sup>a</sup>  $P = 0.077$  vs. NoCAN; <sup>b</sup>  $P = 0.066$  vs. NoCAN; <sup>c</sup>  $P = 0.095$  vs. NoASCR



**Table 3.** Serum creatinine and proteinuria levels in the groups with and without subclinical rejection

	B-2mo		B-12mo	
	ASCR (n = 16)	NoASCR (n = 13)	CAN (n = 12)	NoCAN (n = 12)
Creatinine (mg/dl)				
2 months	1.36 ± 0.29	1.31 ± 0.34	1.37 ± 0.30	1.23 ± 0.22
6 months	1.35 ± 0.41	1.28 ± 0.28	1.38 ± 0.36	1.21 ± 0.25
12 months	1.46 ± 0.53	1.34 ± 0.31	1.45 ± 0.49	1.24 ± 0.32
36 months	2.01 ± 1.79 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.35	2.15 ± 1.97 <sup>b</sup>	1.37 ± 0.40
Proteinuria (mg/24 h)				
2 months	400 ± 210	382 ± 345	407 ± 272	415 ± 306
12 months	404 ± 526	327 ± 251	506 ± 597	278 ± 165
24 months	409 ± 362	570 ± 720	537 ± 647	448 ± 433
36 months	548 ± 885 <sup>c</sup>	325 ± 358	637 ± 1011 <sup>d</sup>	363 ± 299

<sup>a</sup>  $P = .683$  vs. NoASCR ; <sup>b</sup>  $P = .128$  vs. NoCAN; <sup>c</sup>  $P = .705$  vs. NoASCR; <sup>d</sup>  $P = .651$  vs.

NoCAN

**Table 4.** Immunohistochemical scores in the analysis of the cellular infiltrate in patients with and without subclinical rejection

	Biopsy at 2 months		Biopsy at 12 months	
	ASCR	NoASCR	CAN	NoCAN
	(n = 16)	(n = 13)	(n = 12)	(n = 12)
CD3+ cells	1.92 ± 0.80 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.73	1.79 ± 0.75	1.58 ± 0.70
CD4+ lymphocytes	1.90 ± 0.99 <sup>b</sup>	1.08 ± 0.83	1.20 ± 0.81	1.35 ± 0.99
CD8+ lymphocytes	1.15 ± 0.82 <sup>c</sup>	0.75 ± 0.33	1.57 ± 0.95	1.44 ± 0.89
Macrophages	2.20 ± 0.70 <sup>d</sup>	1.52 ± 0.56	1.58 ± 0.75	1.77 ± 0.66

<sup>a</sup>  $P = 0.01$  vs. NoASCR ; <sup>b</sup>  $P = 0.032$  vs. NoASCR ; <sup>c</sup>  $P = .107$  vs. NoASCR; <sup>d</sup>  $P = 0.008$  vs.

NoASCR

**Table 5.** Immunohistochemical scores in the analysis of the immune activation markers in patients with and without subclinical rejection

	Biopsy at 2 months		Biopsy at 12 months	
	ASCR (n = 16)	NoASCR (n = 13)	CAN (n = 12)	NoCAN (n = 12)
IL-2R	1.48 ± 0.86 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.64	0.56 ± 0.62	0.63 ± 0.46
Perforin	1.42 ± 0.90 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.50	0.80 ± 0.72	0.55 ± 0.28
Granzyme B	1.24 ± 0.97 <sup>c</sup>	0.36 ± 0.55	1.01 ± 0.85	0.63 ± 0.69
TGF-β <sub>1</sub>	1.36 ± 0.72	1.60 ± 0.49	1.73 ± 0.54	1.44 ± 0.69

Abbreviations: IL-2R - interleukin 2 receptor; TGF-β<sub>1</sub> - transforming growth factor beta.

<sup>a</sup>*P* = 0.01 vs. NoASCR; <sup>b</sup>*P* = 0.068 vs. NoASCR; <sup>c</sup>*P* = 0.001 vs. NoASCR

**Versão em Português do artigo:**

**“Can early clinical, histological, and immunohistochemical evaluations predict the development of chronic allograft nephropathy?”**

**A avaliação clínica, histológica e imunohistoquímica precoce pode ser preditiva do desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto?**

***Autores***

Francisco V Veronese<sup>1,2</sup>, Irene L Noronha<sup>3</sup>, Roberto C Manfro<sup>2</sup>, David N Rush<sup>4</sup>, Sylvia Dancea<sup>5</sup>, Maria I Edelweiss<sup>6</sup>, Julio Goldberg<sup>7</sup>, Luiz F Gonçalves<sup>2</sup>

***Instituições***

<sup>1</sup>Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica e <sup>2</sup>Serviço de Nefrologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; <sup>3</sup>Serviço de Nefrologia, Departamento de Clínica Médica, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; <sup>4</sup>Departamento de Medicina Interna e <sup>5</sup>Departamento de Patologia, Universidade de Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada; <sup>6</sup>Serviço de Patologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; <sup>7</sup>Unidade de Transplante, Instituto de Nefrologia, Buenos Aires, Argentina

***Autor para correspondência***

Francisco V Veronese. Serviço de Nefrologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

Fone: 55.51.33284584; Fax: 55.51.32332710; e-mail: franvero@via-rs.net

***Título Resumido***

Rejeição subclínica no transplante renal

***Unitermos***

Rejeição, biópsias, transplante renal

## **A avaliação clínica, histológica e imunohistoquímica precoce pode ser preditiva do desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto?**

**Introdução.** A rejeição aguda subclínica (RASC) ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes transplantados renais estáveis submetidos a biópsias de protocolo. No presente estudo foram avaliadas a incidência de RASC e a expressão de marcadores de imunoativação em biópsias de vigilância do enxerto renal, que foram correlacionadas com o desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto.

**Pacientes e Métodos.** Foram realizadas biópsias de protocolo aos 2 e 12 meses pós-transplante em pacientes transplantados renais com função estável, utilizando-se a classificação de Banff para o diagnóstico histológico. A função do enxerto e a proteinúria foram mensurados até 36 meses de seguimento. Foi realizada avaliação imunohistoquímica das subpopulações de células e de marcadores de imunoativação nas biópsias de protocolo. A associação de variáveis independentes com nefropatia crônica do enxerto foi analisada por regressão logística com seleção progressiva.

**Resultados.** A incidência de RASC aos 2 meses foi 28,1% e de NCE aos 12 meses foi 46,2%. Os pacientes com RASC que evoluíram para NCE no primeiro ano de transplante apresentaram função do enxerto significativamente pior no final do seguimento. Tanto a marcação positiva para linfócitos T CD3+ e CD4+ e macrófagos quanto a expressão de IL-2R e granzima B foram significativamente mais intensas no grupo RASC. Entretanto, no modelo de regressão logística somente a expressão de granzima B correlacionou-se significativamente com RASC; a idade do receptor e a creatinina sérica aos 2 meses foram preditivas de NCE aos 12 meses.

**Conclusões.** A presença de RASC em biópsia de protocolo aos 2 meses esteve associada com pior função do enxerto no 3º ano pós transplante naqueles pacientes que evoluíram para NCE. Embora não tenha sido observado neste estudo associação de RASC com rejeição crônica, nossos resultados sugerem que a RASC é um processo imunologicamente ativo podendo potencialmente danificar o enxerto renal. Estes achados enfatizam a

importância das biópsias de protocolo na monitorização imunológica do rim transplantado.

## Introdução

Diversos estudos têm mostrado que cerca de 30% dos rins transplantados com função estável e que são submetidos a biópsias de protocolo apresentam um infiltrado mononuclear túbulo-intersticial e critérios histológicos para rejeição aguda [1-7]. A fenotipagem do infiltrado celular através de imunohistoquímica demonstrou que estas células são predominantemente linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+, e em menor proporção monócitos e macrófagos [1, 2, 8-10]. Mais recentemente, foi detectada a expressão *in situ* de antígenos HLA de classe II, citocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento em biópsias de enxertos renais sem rejeição clinicamente manifesta, sugerindo a presença de um processo imunológico ativo de significado até então não identificado [11-16].

A reação de polimerização em cadeia (PCR) permitiu detectar e quantificar a transcrição de genes de diversas citocinas e moléculas citotóxicas em enxertos estáveis, alguns deles com rejeição aguda histológica definida pelos critérios de Banff [17]. Foi então demonstrada a presença inequívoca de imunoativação, embora em grau menor do que na rejeição acompanhada de disfunção do enxerto [18-21]. Apesar destas evidências, ainda é controverso se pacientes com rejeição aguda subclínica (RASC) poderiam apresentar uma evolução clínica desfavorável a longo prazo, no que se refere a pior função do enxerto, evolução para nefropatia crônica e menor sobrevida do rim transplantado [6, 22, 23-26]. Também é discutível se a identificação da RASC através de biópsias de protocolo e o seu tratamento com imunossupressão mais vigorosa poderia modificar o curso imunológico e clínico do rim transplantado [27-29].

Neste estudo pacientes transplantados renais estáveis foram submetidos à biópsias de protocolo no primeiro ano pós transplante, avaliando-se a incidência de rejeição subclínica, o fenótipo das células do infiltrado e a expressão de moléculas de imunoativação no aloenxerto. Parâmetros clínicos e imunohistoquímicos aos 2 meses foram



correlacionados com o desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto (NCE) aos 12 meses, com o objetivo de identificar variáveis preditivas de rejeição crônica.

### **Pacientes e Métodos**

Entre março de 1996 e outubro de 1997 trinta e dois pacientes transplantados renais da Unidade de Transplante Renal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) foram incluídos neste estudo. Os critérios de inclusão foram creatinina sérica com variação inferior a 20% e imunossupressão inalterada por pelo menos 15 dias antes das biópsias de protocolo. Pacientes com disfunção aguda do enxerto ou presença de infecção ativa foram excluídos. Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA.

Foram avaliadas as seguintes variáveis no momento do transplante: idade e sexo do receptor, tipo e idade do doador, compatibilidade HLA para transplante intervivo, transplantes prévios, gestações, número total de transfusões, valor da última avaliação pré-transplante da reatividade de anticorpos contra painel, tempo de isquemia fria e tempo de anastomose vascular. Após o transplante, foram avaliados a incidência de necrose tubular aguda (NTA), definida pela necessidade de diálise na primeira semana do transplante, e a presença e número total de rejeições agudas clínicas. O diagnóstico de rejeição aguda foi baseado nas manifestações clínicas clássicas quando presentes, resposta ao tratamento e na biópsia do enxerto em casos de rejeição córtico-resistente.

A evolução da função do aloenxerto foi determinada pela dosagem da creatinina sérica diariamente até a alta hospitalar, duas vezes por semana no primeiro e segundo meses, semanal no terceiro mês, quinzenal no 4º mês, mensal até o 12º mês e bimensal até o 36º mês. Foi dosada a proteinúria de 24 horas aos 2, 12, 24 e 36 meses para rastreamento de nefropatia crônica do enxerto.

A imunossupressão de base consistiu de prednisona, azatioprina e ciclosporina neoral em 29 (90,6 %) pacientes; em três pacientes foi utilizado micofenolato mofetil em substituição à azatioprina. Quatro pacientes receberam terapia de indução com OKT3, e em

três casos o OKT3 foi empregado para resgate de rejeição córtico-resistente.

As biópsias de protocolo foram realizadas aos 2 meses pós transplante (B-2me) nos 32 pacientes incluídos, e aos 12 meses (B-12me) em 26 (81%) casos. Seis pacientes não foram rebiopsiados por: recusa (2), gestação (1), óbito com rim funcionante (1), perda do enxerto no final do 3º mês (1) e alteração da imunossupressão pelo paciente no 12º mês (1).

O procedimento foi realizado com pistola Bard (C.R. Bard Inc., Corington, GA, USA) e agulha 16-Gauge após localização ecográfica. Foram retirados dois fragmentos, um para microscopia óptica (MO) com as colorações convencionais e outro para imunohistoquímica. A interpretação da histopatologia foi realizada de acordo com a classificação de Banff de 1997 [30] por patologista renal (SD) sem conhecimento dos dados clínicos.

O fragmento para imunohistoquímica foi embebido em O.C.T. (Tissue-Tek®), imediatamente congelado em nitrogênio líquido e estocado a  $-70^{\circ}$  C, até a realização da imunohistoquímica. Os anticorpos anti-granzima B e anti-fator de crescimento transformador beta 1 ( $TGF\beta_1$ ) foram aplicados no tecido cortado do bloco de parafina; os demais foram processados em tecido congelado, cortado no criostato. Para fenotipagem das células do infiltrado foram utilizados anticorpos monoclonais murinos anti-humanos contra linfócito T CD3, linfócito CD4 e macrófago (CD68) (Dakopatts, Copenhague, Dinamarca), e linfócito CD8 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA). A técnica empregada para os anticorpos anti-CD3 e anti-CD68 foi a da fosfatase alcalina-antifosfatase alcalina (APAAP) [12], e para os anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina [31]. Como marcadores de imunoativação, foram utilizados anticorpos monoclonais contra receptor de interleucina 2 (IL-2R) (Clonab – Biotest AG, Dreieich, West Germany), granzima B (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) e perforina (Pharmacell, Paris, France), através da técnica da estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina [31]. Como marcador de fibrose, foi empregado o anticorpo monoclonal contra o fator de crescimento transformador

beta 1, TGF $\beta$ <sub>1</sub> (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), através da técnica da avidina-biotina-peroxidase [31].

A intensidade da expressão antigênica foi avaliada através de método semiquantitativo, convencionando-se os seguintes escores: 0, ausência de marcação; 1, marcação leve; 2, marcação moderada; 3, marcação intensa. A leitura das biópsias foi realizada por outros dois observadores, também cegos aos dados clínicos, sendo o escore final a média das duas leituras.

Na análise estatística, foram empregados o teste t de Student não pareado e o teste não paramétrico Mann-Whitney (variáveis contínuas), e o teste do Qui-quadrado ou exato de Fisher (variáveis categóricas). Foi realizada uma análise de regressão logística com seleção progressiva e eliminação por etapas, para a identificação de variáveis clínicas e imunohistoquímicas preditivas de nefropatia crônica do enxerto. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

## Resultados

Três biópsias no período de 2 meses e 2 biópsias aos 12 meses não foram representativas, sendo excluídas da análise. Foram incluídas então 29 biópsias e 24 biópsias nos dois períodos, respectivamente. De acordo com o período e o diagnóstico histopatológico (tabela 1), os pacientes foram divididos em quatro grupos. Na B-2me: 1) presença de rejeição aguda subclínica ou suspeita de rejeição (RASC), n = 16 (55%) e 2) ausência de RASC (SemRASC), n = 13 (45%); na B-12me: 3) presença de nefropatia crônica do enxerto (NCE), n = 12 (50%) ou 4) ausência de NCE (SemNCE), n = 12 (50%).

Os dados demográficos e clínicos são apresentados na tabela 2. Houve uma tendência da idade do receptor e do tempo de isquemia fria serem mais elevados nos pacientes com nefropatia crônica do enxerto, em relação ao grupo Sem NCE, e também do número total de rejeições agudas nos primeiros dois meses ser maior no grupo com RASC versus SemRASC. Não houve uma diferença estatisticamente significativa em relação ao

tipo e a idade do doador, grau de compatibilidade HLA, número de transplantes prévios, gestações, transfusões, reatividade contra painel, tempo de anastomose vascular e prevalência de NTA entre pacientes com e sem RASC, e também entre os casos com e sem NCE.

Não houve diferença estatisticamente significativa no nível de função do enxerto e na excreção de proteínas em urina de 24 horas entre pacientes com RASC vs. SemRASC e entre o grupo com NCE vs. SemNCE em todos os períodos do seguimento, como demonstrado na tabela 3. Embora a média de creatinina sérica e da proteinúria de 24 horas tenha sido maior ao final do terceiro ano nos grupos com RASC e com NCE, estes valores não alcançaram significância estatística em relação aos pacientes sem rejeição.

Analisando separadamente o subgrupo com RASC aos 2 meses que evoluiu para NCE aos 12 meses ( $n = 7$ ; 29,1%), em comparação com os pacientes com NCE não precedida de RASC na primeira biópsia ( $n = 5$ ; 20,8%), observamos que a creatinina sérica ao final do seguimento foi significativamente maior no grupo que apresentou RASC ( $2,70 \text{ mg/dl} \pm 2,50 \text{ mg/dl}$  vs.  $1,24 \text{ mg/dl} \pm 0,13 \text{ mg/dl}$ , respectivamente,  $p = 0,048$ ). A proteinúria final também foi mais elevada naqueles pacientes com RASC precoce ( $848 \text{ mg/24h} \pm 1294 \text{ mg/24h}$  vs.  $414 \text{ mg/24h} \pm 433 \text{ mg/24h}$ ,  $p = 0,662$ ), porém sem diferença estatisticamente significativa em relação ao outro grupo.

A análise de fenotipagem do infiltrado celular (tabela 4) mostrou que nos pacientes com rejeição aguda subclínica aos 2 meses o número de células CD3+ foi significativamente maior do que no grupo SemRASC, e esta expressão aumentada se manteve na biópsia de 12 meses. O número de linfócitos T auxiliares (CD4+) na B-2me também foi significativamente maior no grupo RASC, assim como o escore da marcação para macrófagos que neste grupo também foi significativamente maior na biópsia inicial.

Na biópsia de 2 meses, o escore para marcação de linfócitos citotóxicos (CD8+) não diferiu entre o grupo com RASC vs. SemRASC, como demonstrado na tabela 4. Entretanto, a marcação positiva para células CD8 na biópsia de 12 meses foi mais intensa

nos pacientes que haviam apresentado RASC aos 2 meses ( $1,83 \pm 0,95$  vs. SemRASC,  $1,08 \pm 0,60$ ,  $p = 0,035$ ), mostrando a persistência de um infiltrado inflamatório potencialmente citotóxico na biópsia do período tardio.

A expressão de IL-2R e de granzima B na biópsia de 2 meses apresentou-se significativamente aumentada nos pacientes com RASC, demonstrando a presença de células imunoativadas intraenxerto. Também houve uma tendência de uma expressão mais intensa de perforina no grupo RASC, como mostram os dados da tabela 5.

Na biópsia de 12 meses, o número de células infiltrantes e a expressão das moléculas de imunoativação nos pacientes com NCE foi semelhante ao observado no grupo SemNCE. Considerando o subgrupo de pacientes com RASC aos 2 meses que evoluiu para NCE aos 12 meses, apenas a expressão de granzima B na B-12me mostrou significância estatística em relação aos casos com NCE sem RASC prévia ( $1,43 \pm 0,81$  vs.  $0,48 \pm 0,42$  respectivamente,  $p = 0,038$ ). O número de linfócitos CD8+ na B-12me ( $2,21 \pm 0,93$  vs.  $1,35 \pm 0,95$ ,  $p = 0,164$ ) e a expressão de perforina na B-2me ( $1,86 \pm 1,14$  vs.  $1,05 \pm 0,48$ ,  $p = 0,131$ ), embora de maior magnitude no grupo com RASC que evoluiu para NCE, não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao outro grupo.

Na comparação das categorias histológicas RASC vs. SemRASC e NCE vs. SemNCE, a análise da intensidade da expressão de TGF- $\beta_1$ , tanto na biópsia inicial quanto aos 12 meses, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa, como apresentado na tabela 5.

No modelo de regressão logística foram incluídas as variáveis idade e sexo do receptor, número de transfusões, tipo e idade do doador, tempo de isquemia fria e de anastomose vascular, presença de NTA, número de rejeições clínicas, creatinina aos 2 e 6 meses pós transplante, presença de RASC na biópsia aos 2 meses e o escore derivado da expressão do linfócito T CD3, CD4 e CD8, macrófago, IL-2R, perforina, granzima B e TGF $\beta_1$  na biópsia de 2 meses.

Em uma análise adicional com os mesmos parâmetros no modelo, considerando

rejeição aguda subclínica aos 2 meses como variável dependente, a expressão de granzima B na B-2me foi a única variável que esteve independentemente associada ao desfecho RASC (Razão de chances = 58,4; IC 95%, 1,55-2194,67;  $p = 0,027$ ).

Na análise das variáveis preditivas de nefropatia crônica do enxerto houve uma associação estatisticamente significativa entre idade do receptor e o desenvolvimento de NCE (Razão de chances = 1,12; IC 95%, 1,004-1,25;  $p = 0,042$ ), e a creatinina aos 2 meses mostrou uma tendência de associação com NCE (Razão de chances = 58,5; IC 95%, 0,72-4710,76;  $p = 0,069$ ). Ajustando-se no modelo o nível da creatinina para a idade do receptor, o nível de função do enxerto aos 2 meses passou a ser preditivo de NCE (Razão de chances = 358,56; IC 95%, 1,52-84476,73;  $p = 0,034$ ).

A presença de RASC aos 2 meses e a creatinina sérica aos 6 meses não foram fatores preditivos de rejeição crônica. Nesta análise o tempo de anastomose vascular mostrou uma tendência de associação com NCE (Razão de chances = 1,09; IC 95%, 0,98-1,19;  $p = 0,083$ ). Analisando-se separadamente os 12 pacientes com NCE na B-12me, nenhuma variável clínica ou imunohistoquímica da fase inicial do transplante se correlacionou com rejeição crônica aos 12 meses. Considerando-se como variáveis independentes a co-expressão de linfócito citotóxico CD8+, macrófago e granzima B na B-2me, ou a co-expressão de IL-2R, perforina e granzima B na B-2me, não houve associação estatisticamente significativa entre a expressão em conjunto destes marcadores de imunoativação com a nefropatia crônica do enxerto aos 12 meses.

## **Discussão**

A utilidade das biópsias de vigilância para monitorização imunológica de rins transplantados estáveis ainda é debatida, embora diversos estudos tenham demonstrado que ao redor de 30% destes enxertos tem critérios inequívocos de rejeição aguda nos primeiros três meses pós transplante [3, 5-7, 26], e cerca de 20% a 50% apresentam rejeição crônica histológica após 1 ano do transplante [7, 24, 26, 32]. No presente estudo, a

prevalência de RASC e de NCE foi semelhante, 28,1% e 46,2% respectivamente. Serón et al [24], diferentemente das séries citadas, detectaram RASC em biópsia de protocolo 8 semanas pós-transplante em apenas 4,1% dos pacientes, o que poderia ser explicado, entre outros fatores, pelo esquema imunossupressor que incluiu indução com anticorpos antilinfocitários e pela precocidade da biópsia de vigilância. Este dado sugere que a imunossupressão pode influenciar a prevalência e a magnitude do infiltrado intersticial mononuclear, como já observado anteriormente para esquemas que incluíam ciclosporina [2].

No presente estudo, os pacientes com suspeita de rejeição na B-2me foram incluídos no grupo com rejeição aguda subclínica para fins de análise estatística, com base nos dados de Rush et al [33], que encontraram uma correlação significativa entre alterações limítrofes para rejeição e episódios de rejeição clínica em meses subsequentes. Igualmente, no estudo de Saad et al [34], o tratamento da rejeição “borderline” resultou na melhora da função do enxerto em uma proporção significativa de pacientes, sugerindo que esta categoria histológica represente uma rejeição tubulointersticial de grau leve.

Os dados demográficos e clínicos analisados não mostraram associação com rejeição aguda subclínica precoce. Outros autores também não encontraram correlação com variáveis como tipo e idade do doador, tempo de isquemia fria ou presença de NTA [3, 24, 35]. Rush et al [35], através de análise multivariada, verificaram que o grau de incompatibilidade HLA-DR entre doador e receptor esteve associado à rejeição subclínica. No presente estudo este dado não foi avaliado, uma vez que a seleção por compatibilidade HLA no transplante cadavérico foi introduzida apenas recentemente em nosso centro.

O tempo de isquemia fria mostrou uma tendência a ser mais elevado nos pacientes com NCE na B-12me. A influência do tempo de isquemia fria na função e histologia do enxerto foi demonstrada experimentalmente em ratos [36]. Halloran et al [37] enfatizaram que na transplantação clínica, o aumento dos tempos de preservação e de anastomose constitui um fator de risco para disfunção e menor sobrevida tardia do rim transplantado.

A idade do receptor e a creatinina sérica aos 2 meses foram preditivos de NCE.

Entretanto, apesar da significância estatística, deve-se ressaltar que, em função do pequeno número de casos com desfecho positivo, os valores da razão de chances e do intervalo de confiança muito amplos dificultam a interpretação dos resultados.

A rejeição aguda tem sido considerada um importante fator de risco para rejeição crônica e menor sobrevida tardia do rim transplantado, mas a associação causal entre rejeição aguda e crônica permanece obscura [37-42]. No estudo de Nickerson et al [25], cada episódio de rejeição aguda tardia aumentou em 5,9 vezes o risco de função reduzida do enxerto renal aos 2 anos pós transplante. Serón et al [24], avaliando o valor preditivo da biópsia de protocolo aos 3 meses para perda tardia do enxerto, observaram que a incidência de rejeição aguda antes da biópsia de protocolo foi maior nos pacientes com NCE, e na análise de regressão logística, apenas a rejeição aguda clínica e o nível sérico mais elevado de ciclosporina foram fatores preditivos de nefropatia crônica do enxerto. Em nosso estudo, entretanto, o número de episódios de rejeição aguda não diferiu entre os grupos com e sem nefropatia crônica do enxerto.

Pacientes com RASC aos 2 meses mostraram uma tendência de um número mais elevado de rejeições agudas clínicas no primeiro mês pós-transplante. Quatorze (43,8%) pacientes tiveram rejeição aguda tratada em média  $11,4 \pm 5,1$  dias após o transplante, e em 8 (57,1%) destes casos havia rejeição histológica na biópsia de protocolo aos 60 dias. É possível que nestes pacientes a RASC represente a continuidade de um processo de rejeição celular aguda inicial não controlada, como sugere Mazzucchi et al [43], que demonstraram persistência de rejeição aguda em 25% a 30% dos casos tratados com metilprednisolona em biópsias subsequentes, apesar da aparente resposta à pulsoterapia. Limchiu et al, em estudo prospectivo, demonstraram que RASC aos 2 meses esteve associada com um maior número de rejeições recorrentes até o 3º ano pós transplante, e no subgrupo de pacientes com RASC que foram tratados houve queda da creatinina sérica em mais de 20% do valor basal (abstract; Limchiu et al, 14<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Transplant Physicians 148:110, 1995).



Um dos objetivos deste estudo foi avaliar se a rejeição aguda subclínica é um fator de risco para nefropatia crônica do enxerto. Especula-se que o infiltrado celular invariavelmente presente em biópsias seriadas seja imunologicamente ativo, constituindo uma inflamação persistente de baixo grau que danifica o aloenxerto [6, 29, 33]. Em acordo com esta hipótese, Rush et al [7, 32] demonstraram que pacientes com rejeição limítrofe e RASC em biópsias seriadas, com escores de Banff mais elevados de inflamação aguda, apresentaram maior grau de lesões crônicas e pior função do enxerto no final do 1º ano de transplante. Esses autores sugerem que a inflamação persistente, mesmo que subclínica, pode levar à disfunção do enxerto se a imunossupressão não for eficiente para controle da RASC. Legendre et al [26] também observaram que a RASC presente em biópsia de protocolo aos 3 meses, em pacientes que nunca apresentaram rejeição clínica, foi um fator de risco para rejeição crônica aos 2 anos pós-transplante. Nickerson et al [25] também relataram que a presença de RASC em biópsia de protocolo aos 6 meses se correlacionou independentemente com a creatinina sérica aos 2 anos pós-transplante. No presente estudo, o grupo com nefropatia crônica precedida de RASC apresentou pior função do enxerto no 3º ano pós-transplante; a proteinúria também foi maior, embora sem diferença estatística em relação aos pacientes sem RASC prévia. Na análise de regressão logística, entretanto, a presença de RASC aos 2 meses não foi preditiva de NCE aos 12 meses, mas é possível que a ausência de significância estatística possa estar relacionada ao pequeno número de pacientes com o desfecho.

Em relação aos achados da imunohistoquímica, identificamos um número significativamente maior de linfócitos T CD3+, CD4+ e de macrófagos nas biópsias de pacientes com rejeição aguda subclínica aos 2 meses pós-transplante. Na biópsia de 12 meses, o grupo com RASC mostrou marcação mais intensa para linfócitos CD8+ citotóxicos, sugerindo a persistência de um infiltrado inflamatório ativo em período tardio do transplante. Diversos estudos empregando métodos de imunohistoquímica ou moleculares têm demonstrado a presença de células imunoativadas na rejeição aguda acompanhada de disfunção do enxerto [18, 44-46] e também no enxerto com função estável [19-21].

Particularmente, o escore para marcação de macrófagos foi mais elevado nas biópsias com RASC no presente estudo. Este dado também foi relatado por outros autores, em que a população de macrófagos constituiu quase 50% do total de células infiltrantes dos rins com rejeição [20], tendo este perfil fenotípico valor diagnóstico e preditivo de graus mais severos de rejeição celular [47]. Subpopulações específicas de células do infiltrado, entretanto, não se correlacionaram significativamente com nefropatia crônica do enxerto no presente estudo.

Na amostra estudada, a expressão de marcadores de imunoativação como IL-2R e granzima B foi significativamente maior nas biópsias com rejeição aguda subclínica, e houve uma tendência de marcação mais intensa para perforina nessas biópsias. Na rejeição aguda, tanto acompanhada de disfunção do enxerto quanto subclínica, a expressão do RNA mensageiro (RNAm) da IL-2 usualmente é mínima ou ausente [18, 19, 48] e provavelmente não sustentada, pois precede a disfunção do enxerto [49]. Em relação ao receptor de IL-2, Kooijimas-Coutinho et al [50], através de imunohistologia e PCR, documentaram a expressão precoce de IL-2R em biópsia de protocolo 7 dias após o transplante, em associação com episódios subsequentes de rejeição aguda; outros autores demonstraram na rejeição clínica em curso a intensa marcação para o receptor de IL-2 na superfície de células infiltrantes ativadas, também presente, embora em menor intensidade, nos enxertos sem rejeição histológica [12, 13, 14, 51].

A co-expressão intraenxerto do RNAm dos genes que codificam para perforina, granzima B e Fas ligante mostrou uma sensibilidade e especificidade de 100% para o diagnóstico de rejeição aguda [18], havendo uma correlação direta entre esta co-expressão e o grau de severidade da rejeição histológica definida pelos critérios de Banff [45]. Lipman et al [19], utilizando PCR quantitativo, também demonstraram em biópsias de enxertos estáveis com rejeição aguda subclínica a transcrição dos genes de perforina, granzima B e Fas ligante. Comparando com biópsias normais e com infiltrado limitrofe para rejeição, a expressão de perforina foi significativamente maior na RASC, assim como a expressão da cadeia beta do receptor de célula T, interferon gama, IL-4 e IL-15. No estudo de

Suthanthiran [52], com mesma metodologia mas em rins com rejeição clínica, a expressão do RNAm de granzima B e de Fas ligante mostrou uma excelente correlação com rejeição aguda, demonstrando o envolvimento das duas vias citolíticas na rejeição ao aloenxerto. Em acordo com estes dados, observamos que a expressão de granzima B detectada na B-2me foi preditiva de RASC aos 2 meses, e que esta expressão persistiu significativamente aumentada nos pacientes com RASC que evoluíram para NCE; embora sem diferença estatística, a expressão de perforina e dos linfócitos CD8+ citotóxicos também foi mais intensa. Estes dados reforçam a hipótese de que esta via citolítica pode estar presente como um dos mecanismos efetores de lesão do enxerto na rejeição aguda subclínica.

Mais recentemente, o diagnóstico não invasivo de rejeição aguda em transplantados renais também foi realizado através de métodos moleculares, identificando-se a expressão de moléculas efectoras em leucócitos do sangue periférico [53] e em células da urina [54], em correlação com a transcrição dos mesmos genes em biópsias de enxertos renais com rejeição aguda. No estudo de Li et al [54], a sensibilidade e a especificidade da expressão do RNAm de perforina e de granzima B em células da urina para o diagnóstico de rejeição aguda foram 83%, 83%, 79% e 77%, respectivamente.

A expressão do RNAm do TGF- $\beta_1$  tem sido associada à produção de matriz extracelular e colágeno, fibrose intersticial e nefropatia crônica do enxerto [55]. Na rejeição aguda, a análise quantitativa por PCR da expressão do gene de TGF- $\beta_1$  tem uma sensibilidade e especificidade de apenas 45% e 55%, respectivamente, não discriminando entre rejeição e não rejeição [18]. Na rejeição aguda subclínica, a transcrição do gene de TGF- $\beta_1$  é indetectável, tanto nas biópsias com rejeição limítrofe quanto na RASC [19]. No presente estudo, não houve diferença na expressão de TGF- $\beta_1$  nas biópsias com e sem RASC conforme esperado, mas surpreendentemente na nefropatia crônica do enxerto a marcação para TGF- $\beta_1$  foi semelhante a das demais categorias histológicas. Na análise de regressão logística este marcador de fibrose também não foi preditivo de NCE aos 12 meses. É possível que a quantificação do TGF- $\beta_1$  por um método mais sensível como o

PCR pudesse discriminar melhor as categorias histológicas em nosso estudo.

É importante enfatizar que o método imunohistoquímico apresenta limitações para o diagnóstico de imunoativação. Isoladamente ele não permite distinguir se células como linfócitos e macrófagos, por exemplo, estão efetivamente produzindo citocinas e outras moléculas, ou se estes produtos estão apenas presentes mas inativos [56]. Através de métodos mais sensíveis e específicos como o PCR ou a hibridização *in situ*, a identificação de células imunoativadas pode indicar a presença de um processo patogênico que necessite de tratamento [27], ou pelo menos uma imunossupressão profilática mais eficiente [28] para proteção do enxerto renal.

Em conclusão, a prevalência de RASC e de NCE no presente estudo não diferiu de outras séries descritas, e a presença de RASC precoce esteve associada a pior função do enxerto nos pacientes que evoluíram para NCE. O número de linfócitos T e de macrófagos e a expressão de IL-2R e de granzima B foram significativamente maiores nas biópsias com rejeição aguda subclínica, demonstrando a presença de imunoativação intraenxerto. Entretanto, nenhuma célula ou marcador específico isoladamente ou em conjunto foi preditivo do desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto. Estes resultados reforçam a necessidade de mais estudos com biópsias de protocolo para monitorização imunológica de pacientes transplantados renais.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Srta. Sabrina G. Oliveira, Srta. Ivone B. Oliveira e Sra. Teresinha G. Leitão pelo suporte técnico, relacionado a execução do extenso trabalho de preparação e quantificação da imunohistoquímica. Agradecemos também ao Dr. Vinícius Duval da Silva por seu importante suporte e aconselhamento durante esta pesquisa em relação à quantificação da expressão antigênica.

**Endereço para separatas:**

Francisco V. Veronese, M.D.

Renal Division - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-003

Porto Alegre, RS - Brazil

Phone: +55.51.3328.4584

Fax: +55.51.3233.2710

E-mail: [franvero@via-rs.net](mailto:franvero@via-rs.net)

## Referências

1. Burdick JF, Beschorner WE, Smith WR, *et al*: Characteristics of early routine renal allograft biopsies. *Transplantation* 38:679-684, 1984.
2. McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM, *et al*: Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation* 42:352-358, 1986.
3. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, *et al*: Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 57:208-211, 1994.
4. Séron D, Díaz-Gallo C, Griñó JM, *et al*: Characterization of interstitial infiltrate in early renal allograft biopsies in patients with stable renal function. *Transplant Proc* 23:1267-1269, 1991.
5. Rush DN, Jeffery JR, Gough J: Protocol biopsies in stable renal transplant patients under triple immunosuppression: results at 6 months. *Transplant Proc* 26:2576, 1995.
6. Rush DN, Jeffery JR, Gough J: Sequential protocol biopsies in renal transplant patients: repeated inflammation is associated with impaired graft function at 1 year. *Transplant Proc* 27:1017-1018, 1995.
7. Veronese FV, Gonçalves LF, Edelweiss MI, Manfro RC: Interpretation of surveillance kidney allograft biopsies according to the Banff criteria. *Transplant Proc* 31:3019-3020, 1999.
8. Platt JL, LeBien TW, Michael AF: Interstitial mononuclear cell populations in renal graft rejection. Identification by monoclonal antibodies in tissue sections. *J Exp Med* 155:17-30, 1982.
9. Kolbec PC, Tatum AH, Sanfilippo F: Phenotypic evaluation of mononuclear cell infiltrates in renal allograft biopsies. *Transplant Proc* 17:893-895, 1985.
10. McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM, *et al*: Leucocyte infiltration patterns in renal allografts assessed by immunoperoxidase staining of 245 sequential

- biopsies. *Transplant Proc* 17:560-561, 1985.
11. Raftery MJ, Serón D, Koffman G, *et al*: The relevance of induced class II HLA antigens and macrophage infiltration in early renal allograft biopsies. *Transplantation* 48:238-243, 1989.
  12. Noronha IL, Eberlein-Gonska M, Hartley B, *et al*: In situ expression of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and interleukin-2 receptors in renal allograft biopsies. *Transplantation* 54:1017-1024, 1992.
  13. Noronha IL, Weiss H, Hartley B, *et al*: Expression of cytokines, growth factors, and their receptors in renal allograft biopsies. *Transplant Proc* 25:917-918, 1993.
  14. Andersen CB, Ladefoged SD, Larsen S: Acute kidney graft rejection. A morphological and immunohistological study on "zero-hour" and follow-up biopsies with special emphasis on cellular infiltrates and adhesion molecules. *APMIS* 102:23-37, 1994.
  15. Manfro RC, Gonçalves LF, Rauber M, Moura LA: Analysis of ICAM-1 and HLA-DR expression on renal allograft aspirates. *Clin Transplantation* 10:379-383, 1996.
  16. Thervet E, Patey N, Legendre CH, *et al*: Prospective serial evaluation of cell adhesion molecule expression in transplanted kidneys. *Transplant Proc* 27:1007-1008, 1995.
  17. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, *et al*: International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 44:411-422, 1993.
  18. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, *et al*: Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci* 94:695-700, 1997.
  19. Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR, *et al*: Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation* 66:1673-1681, 1998.
  20. Grimm PC, McKenna R, Nickerson P, *et al*: Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *J Am Soc Nephrol* 10:1582-1589, 1999.

21. Kirk, AD, Jacobson, LM, Heisey, DM, *et al*: Clinically stable human renal allografts contain histological and RNA-based findings that correlate with deteriorating graft function. *Transplantation* 68:1578-1582, 1999.
22. D' Ardenne AJ, Dunnill MS, Thompson JF, *et al*: Cyclosporin and renal graft histology. *J Clin Pathol* 39:145-151, 1986.
23. Dimény E, Wahlberg J, Larsson E, Fellström B: Can histopathological findings in early renal allograft biopsies identify patients at risk for chronic vascular rejection? *Clin Transplantation* 9:79-84, 1995.
24. Serón D, Moresco F, Bover J, *et al*: Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 51:310-316, 1997.
25. Nickerson P, Jeffery JR, Gough, J, *et al*: Identification of clinical and histopathological risk factors for diminished renal function 2 years post-transplant. *J Am Soc Nephrol* 9:482-487, 1998.
26. Legendre C, Thervet E, Skhiri H, *et al*: Histologic features of chronic allograft nephropathy revealed by protocol biopsies in kidney transplant recipients. *Transplantation* 65:1506-1509, 1998.
27. Rush DN, Nickerson P, Gough J, *et al*: Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 9:2129-2134, 1998.
28. Nickerson P, Jeffery J, Gough J, *et al*: Effect of increasing baseline immunosuppression on the prevalence of clinical and subclinical rejection: a pilot study. *J Am Soc Nephrol* 10:1801-1805, 1999.
29. Rush DN, Karpinski ME, Nickerson P, Dancea S, Birk P, Jeffery JR: Does subclinical rejection contribute to chronic rejection in renal transplant patients? *Clin Transplantation* 13:441-446, 1999.
30. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, *et al*: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 55:713-723, 1999.
31. Fujihara CK, Malheiros DMA, Zatz R, Noronha IL: Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int* 54:1017-1024, 1992.



32. Rush DN, Jeffery JR, Gough, J: Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation* 59:511-514, 1995.
33. Rush, DN, Nickerson P, Jeffery JR, *et al*: Protocol biopsies in renal transplantation: research tool or clinically useful? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7:691-694, 1998.
34. Saad R, Gritsch HA, Shapiro R, *et al*: Clinical significance of renal allograft biopsies with "borderline changes", as defined in the Banff schema. *Transplantation* 64:992-995, 1997.
35. Rush DN, Grimm P, Gough J, *et al*: Predicting rejection: is early diagnosis achievable and important? *Graft* 2:31-35, 1999.
36. Yilmaz S, Paavonen T, Häyry P: Chronic rejection of renal allografts. The impact of prolonged ischemia time on transplant histology. *Transplantation* 53:823-827, 1992.
37. Halloran PF, Melk A, Barth C: Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol* 10:167-181, 1999.
38. Gulanikar AC, MacDonald AS, Sungurtein U, *et al*: The incidence and impact of early rejection episodes of graft outcome in recipients of first cadaver kidney transplants. *Transplantation* 53:323-328, 1992.
39. Basadonna GP, Matas AJ, Gillingham KJ, *et al*: Early vs late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation* 55:993-995, 1993.
40. Cosio FG, Pelletier RP, Falkenhain ME, *et al*: Impact of acute rejection and early allograft function on renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63:1611-1615.
41. Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Najarian JS: The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival ( $t^{1/2}$ ). *Transplantation* 57:857-859, 1994.
42. Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, *et al*: Chronic renal allograft rejection: Immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int* 49:518-524, 1996.
43. Mazzucchi E, Lucon AM, Nahas WC, *et al*: Histological outcome of acute cellular rejection in kidney transplantation after treatment with methylprednisolone. *Transplantation* 67:430-434, 1999.

44. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB: Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 152:5120-5127, 1994.
45. Sharma VK, Bologa RM, Li B, *et al*: Molecular executors of cell death - differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* 62:1860-1866, 1996.
46. Kummer JA, Wever PC, Kamp AM, *et al*: Expression of granzyme A and B proteins by cytotoxic lymphocytes involved in acute renal allograft rejection. *Kidney Int* 47:70-77, 1995.
47. Copin MC, Noel C, Hazzan M, *et al*: Diagnostic and predictive value of an immunohistochemical profile in asymptomatic acute rejection of renal allografts. *Transplant Immunol* 3:229-239, 1995.
48. Grimm PC, McKenna RM, Gospodarek EM, *et al*: Low frequency of infiltrating cells intensely expressing T cell cytokine mRNA in human renal allograft rejection. *Transplantation* 59:579-584, 1995.
49. Dallmann MJ, Larsen CP, Morris PG: Cytokine gene transcription in vascularized organ grafts: analysis using semi-quantitative polymerase chain reaction. *J Exp Med* 174:493-496, 1991.
50. Kooijmans-Coutinho MF, Bruijn JA, Hermans J, *et al*: Evaluation by histology, immunohistology and PCR of protocolized renal biopsies 1 week post-transplant in relation to subsequent rejection episodes. *Nephrol Dial Transplant* 10:847-854, 1995.
51. Krams SM, Falco, Villanueva JC, *et al*: Cytokine and T cell receptor gene expression at the site of allograft rejection. *Transplantation* 53:151-156, 1992.
52. Suthanthiran M: Human allograft rejection: molecular characterization. *Nephrol Dial Transplant* 13:21-24, 1998.
53. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, *et al*: Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 66:562-566, 1998.
54. Li B, Hartono C, Ding R, *et al*: Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by

measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Eng J Med* 344:947-954, 2001.

55. Sharma VK, Bologa RM, Xu GP, *et al*: Intragraft TGF- $\beta_1$  mRNA: A correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 49:1297-1303, 1996.
56. Dallman MJ: Cytokine regulation of the immune response to organ transplants, in: *Immunology of Renal Transplantation*, edited by Thomson A, Catto G, London, Edward Arnold, 1993, pp 97-111.

**Tabela 1** - Diagnósticos histológicos conforme a classificação de Banff 1997.

	Biópsia de 2 meses (N=32)	Biópsia de 12 meses (N=26)
Normal	3 (9,4) <sup>a</sup>	3 (11,5)
Suspeita de rejeição aguda	7 (21,8)	2 (7,7)
Rejeição aguda	9 (28,1)	2 (7,7)
Tubulointersticial - Grau IA	5 (15,6)	
Tubulointersticial - Grau IB	2 (6,3)	2 (7,7)
Vascular - Grau IIA	2 (6,3)	-
Nefropatia crônica do enxerto	2 (6,3)	12 (46,2)
Grau I	2 (6,3)	8 (31)
Grau II	-	4 (15,1)
Alterações inespecíficas	8 (25)	5 (19,2)
Não representativa	3 (9,4)	2 (7,7)
Total	32 (100)	26 (100)

<sup>a</sup> n (%)

**Tabela 2** - Dados demográficos e clínicos dos pacientes com e sem rejeição subclínica.

	B-2me		B-12me	
	RASC	SemRASC	NCE	SemNCE
	(N = 16)	(N = 13)	(N = 12)	(N = 12)
Idade (anos)	36 ± 12	33 ± 11	41 ± 10 <sup>a</sup>	32 ± 13
Sexo (M/F)	12/4	8/5	8/4	10/2
Doador (C/V)	8/8	5/8	5/7	6/6
Idade do doador (anos)	33 ± 12	37 ± 9	36 ± 12	30 ± 9
Último Painel (%)	6 ± 6	1 ± 3	0 ± 0	6 ± 11
Isquemia fria (horas)	18 ± 4	20 ± 4	22 ± 3 <sup>b</sup>	17 ± 4
Anastomose (minutos)	42 ± 15	42 ± 16	46 ± 18	36 ± 13
NTA (n[%])	4(25)	5(38)	5(42)	3(25)
RA (n[%])	10(63) <sup>c</sup>	4(31)	6(50)	4(33)
Total de RA	0,6 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,5 ± 0,5	0,3 ± 0,5

Abreviações: M/F: masculino/feminino; C/V: cadavérico/vivo; NTA: necrose tubular aguda; RA: rejeição aguda.

<sup>a</sup> p = 0,077 versus SemNCE; <sup>b</sup> p = 0,066 versus SemNCE; <sup>c</sup> p = 0,095 versus SemRASC.

**Tabela 3** - Nível de creatinina sérica e de proteinúria nos grupos com e sem rejeição subclínica.

	B-2me		B-12me	
	RASC (n=16)	SemRASC (n=13)	NCE (n=12)	SemNCE (n=12)
Creatinina (mg/dl)				
2 meses	1,36 ± 0,29	1,31 ± 0,34	1,37 ± 0,30	1,23 ± 0,22
6 meses	1,35 ± 0,41	1,28 ± 0,28	1,38 ± 0,36	1,21 ± 0,25
12 meses	1,46 ± 0,53	1,34 ± 0,31	1,45 ± 0,49	1,24 ± 0,32
36 meses	2,01 ± 1,79 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,35	2,15 ± 1,97 <sup>b</sup>	1,37 ± 0,400
Proteinúria (mg/24 h)				
2 meses	400 ± 210	382 ± 345	407 ± 272	415 ± 306
12 meses	404 ± 526	327 ± 251	506 ± 597	278 ± 165
24 meses	409 ± 362	570 ± 720	537 ± 647	448 ± 433
36 meses	548 ± 885 <sup>c</sup>	325 ± 358	637 ± 1011 <sup>d</sup>	363 ± 299

<sup>a</sup>p=0,683, versus SemRASC ; <sup>b</sup>p=0,128, versus SemNCE; <sup>c</sup>p=0,705, versus SemRASC;  
<sup>d</sup>p=0,651, versus SemNCE.

**Tabela 4** - Escores da imunohistoquímica na análise do infiltrado celular nos pacientes com e sem rejeição subclínica.

	Biópsia de 2 meses		Biópsia de 12 meses	
	RASC (n=16)	SemRASC (n=13)	NCE (n=12)	SemNCE (n=12)
Células CD3+	1,92 ± 0,80 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,73	1,79 ± 0,75	1,58 ± 0,70
Linfócitos CD4+	1,90 ± 0,99 <sup>b</sup>	1,08 ± 0,83	1,20 ± 0,81	1,35 ± 0,99
Linfócitos CD8+	1,15 ± 0,82 <sup>c</sup>	0,75 ± 0,33	1,57 ± 0,95	1,44 ± 0,89
Macrófagos	2,20 ± 0,70 <sup>d</sup>	1,52 ± 0,56	1,58 ± 0,75	1,77 ± 0,66

<sup>a</sup>p=0,01, versus SemRASC ; <sup>b</sup>p = 0,032, versus SemRASC ; <sup>c</sup>p=0,107, versus SemRASC;  
<sup>d</sup>p=0,008, versus SemRASC.

**Tabela 5** - Escores da imunohistoquímica na análise dos marcadores de imunoativação nos pacientes com e sem rejeição subclínica.

	Biópsia de 2 meses		Biópsia de 12 meses	
	RASC (n=16)	SemRASC (n=13)	NCE (n=12)	SemNCE (n=12)
IL-2R	1,48 ± 0,86 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,64	0,56 ± 0,62	0,63 ± 0,46
Perforina	1,42 ± 0,90 <sup>b</sup>	0,87 ± 0,50	0,80 ± 0,72	0,55 ± 0,28
Granzima B	1,24 ± 0,97 <sup>c</sup>	0,36 ± 0,55	1,01 ± 0,85	0,63 ± 0,69
TGF-β <sub>1</sub>	1,36 ± 0,72	1,60 ± 0,49	1,73 ± 0,54	1,44 ± 0,69

Abreviações: IL-2R: receptor de interleucina 2; TGF-β<sub>1</sub>: fator de crescimento transformador beta; <sup>a</sup> p=0,01, versus SemRASC ; <sup>b</sup> p=0,068, versus SemRASC ; <sup>c</sup> p=0,001, versus SemRASC.



**5.2. ARTIGO 2**

## Interpretation of Surveillance Kidney Allograft Biopsies According to the Banff Criteria

F.V. Veronese, L.F. Gonçalves, M.I. Edelweiss, and R.C. Manfro

**T**HE DEVELOPMENT of chronic rejection has been correlated with acute rejection episodes,<sup>1,2</sup> and late renal transplant loss is mainly due to chronic rejection.<sup>3</sup> Subclinical rejection, detected by routine graft biopsies in approximately 30% of stable kidney allografts, is being increasingly described<sup>4</sup> and treated.<sup>5</sup> Its relation to chronic allograft nephropathy and the need for altering immunosuppression to treat it is still unclear.

The purpose of this study was to evaluate the utility of surveillance kidney allograft biopsies to diagnose early subclinical rejection, to determine its prevalence in our transplant center, and to verify its association with late development of chronic rejection.

### MATERIALS AND METHODS

#### Patients

Thirty-two adult transplant patients (17 from cadaveric and 15 from living-related donors) participated in the study, which was approved by the Medical Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Basic immunosuppression consisted of prednisone, azathioprine, and cyclosporine A; six patients received antilymphocytic therapy (OKT3); four as an induction and two for steroid-resistant rejection.

#### Biopsies

Inclusion criteria were stable graft function (serum creatinine variation less than 10%) and unaltered immunosuppression from 15 days before biopsy. Core renal biopsies were done at 2 (B1) and 12 (B2) months after transplantation, using a spring-loaded 16-gauge gun after ultrasound localization. Histologic diagnosis using the Banff schema<sup>6</sup> was carried out by a renal pathologist who was blinded to clinical data. A second analysis was performed 6 months later to measure reproducibility. In five patients the second biopsy was not done, because of refusal (2), pregnancy (1), death with a functioning kidney (1), and early allograft loss (1). One B2 biopsy was not representative, so it was excluded from the analysis. Thirty-two B1 biopsies and 26 B2 biopsies were included in the study.

Biopsy findings were correlated with clinical and laboratory data. The association between early subclinical rejection and the development of chronic rejection at 1 year was also studied.

#### Statistics

Comparisons were made by analysis of variance (ANOVA) and chi-square test and also by Kruskal-Wallis and Fisher Exact Test when appropriate. Intraobserver variation in respect to the pres-

Table 1. Demographic and Clinical Data From Transplant Cohort

	n* (%)
Age (y)	35.6 ± 11.9 <sup>†</sup>
Gender (male/female)	18 (56)/14 (44)
Number of pregnancies	1.4 ± 1.3
Number of transfusions	1.9 ± 2.9
Preservation time (h)	18.2 ± 4.3
Vascular anastomosis time (min)	40.6 ± 14.8
Delayed graft function	10 (31)
Acute clinical rejection	17 (53)

\*n = 32.

<sup>†</sup>mean ± SD.

ence or absence of acute (B1) and chronic (B2) rejection was estimated by kappa statistic. *P* values < .05 were considered as significant.

### RESULTS

Demographic and clinical data are shown in Table 1. The complication related to the biopsy procedure was self-limiting gross hematuria that occurred in four cases, with bladder clots in two of these patients.

At 2 months, average serum creatinine was  $1.3 \pm 0.4$  mg/dL and proteinuria  $403 \pm 269$  mg/d. In this period, 16(50%) biopsies were interpreted as normal (no rejection), 3(9%) were borderline for acute rejection, 10(31%) patients had acute cellular rejection as Banff I or II; 1(3%) had chronic allograft nephropathy (Banff I) and 2(6%) had cyclosporine-associated changes (Table 2). At 1 year, average serum creatinine was  $1.4 \pm 0.4$  mg/dL and proteinuria  $524 \pm 836$  mg/d (2 versus 12 month values, *P* = .28). Among the 1-year biopsies nine (33%) were described as normal, one (4%) was borderline for acute rejection, two (8%) were classified as having acute cellular rejection Banff II and III; six (22%) biopsies had histologic findings of chronic rejection, either Banff I or II; six (23%) had the diagnosis of cyclosporine-associated changes, and five (19%) were char-

From the Renal Transplant Unit, Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Universidade Federal do Rio Grande do Sul Medical School, Porto Alegre, Brazil.

Address reprint requests to Francisco V. Veronese, Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil, 90035-003.

**Table 2. Histologic Findings According to the Banff Schema**

Diagnosis	B1 (2 months)	B2 (12 months)
Normal (no rejection)	16 (50)*	9 (33)
Borderline changes	3 (9)	1 (4)
Acute rejection grade I	8 (25)	—
Acute rejection grade II	2 (6)	1 (4)
Acute rejection grade III	—	1 (4)
CAN <sup>†</sup> grade I	1 (3)	3 (11)
CAN grade II	—	3 (11)
Cyclosporine-associated changes	2 (6)	6 (23)
Nonspecific changes	—	2 (7)
Total	32 (100)	26 (100)

\*n (%).

<sup>†</sup>CAN: chronic allograft nephropathy.

acterized as a chronic process. In two (7%) biopsies there were nonspecific changes, described as focal interstitial fibrosis and tubular atrophy in one biopsy and segmental sclerosis in few glomeruli in the other.

Kappa values for intraobserver agreement were 0.60 ( $P = .03$ ) to the presence or absence of acute rejection at the B1 biopsy and 0.50 ( $P = .12$ ) to the presence or absence of chronic rejection at the B2 biopsy.

Comparing patients with and without subclinical rejection, no difference was found on the prevalence of delayed graft function and serum creatinine and proteinuria levels (Table 3). Patients with early clinical rejection had a higher serum creatinine both at 2 and 12 months ( $1.5 \pm 0.4$  mg/dL  $\times 1.2 \pm 0.2$  mg/dL,  $P = .01$  and  $1.6 \pm 0.5$  mg/dL  $\times 1.2 \pm 0.2$  mg/dL,  $P = .04$ , respectively), but the proteinuria levels were not different in this comparison.

There was no association between the presence of subclinical rejection at 2 months and chronic allograft nephropathy in the 12-month biopsy (RR = 0.73; [95% CI], 0.56 – 0.94;  $P = .14$ ), but there was a trend toward the occurrence of early clinical rejection to be associated with chronic rejection (RR = 1.41; [95% CI], 0.68 – 2.13;  $P = .07$ ). No association was found between early clinical rejection and the presence of subclinical rejection in the protocol biopsies at 2 and 12 months posttransplantation.

**Table 3. Clinical Findings in Patients With and Without Subclinical Rejection at 2 Months**

	Subclinical Rejection (n = 10)	No Subclinical Rejection (n = 22)	P
Delayed graft function	2 (20%)*	8 (36%)	NS <sup>†</sup>
Serum creatinine (mg/dL)			
2 months	$1.2 \pm 0.2^{\ddagger}$	$1.4 \pm 0.4$	NS
12 months	$1.3 \pm 0.5$	$1.4 \pm 0.4$	NS
Proteinuria (mg/day)			
2 months	$377 \pm 186$	$415 \pm 303$	NS
12 months	$524 \pm 658$	$525 \pm 925$	NS

\*n (%).

<sup>†</sup>NS = not significant.<sup>‡</sup>mean  $\pm$  SD.

## DISCUSSION

This study showed a high prevalence of subclinical rejection in renal transplant patients with an optimal and stable graft function. Histologic acute cellular rejection at 2 months (31%) and chronic allograft nephropathy at 12 months (22%) were the main findings. Other authors have described similar findings,<sup>4,7,8</sup> such as the association of subclinical rejection with impaired renal transplant function in the long term.<sup>9</sup> Rush et al<sup>10</sup> have reported that subclinical rejection at 6 months is an independent predictor of an elevated serum creatinine at 24 months. Even a borderline mononuclear infiltrate can be associated with late chronic damage and graft dysfunction.<sup>9</sup> We didn't find such an association, perhaps because the cohort was small, and the follow-up short. As in other studies,<sup>1,2</sup> our results showed a higher creatinine in patients with clinical rejection in the short and long term and a trend for early clinical rejection to be associated with chronic rejection at 1 year.

In five patients with cyclosporine-associated chronic changes the diagnosis of chronic allograft nephropathy could not be ruled out. In account of this, the prevalence of chronic damage related to rejection in the 1-year biopsy may be underestimated.

Several clinical validation studies of the Banff 1993 to 1995 classification have been performed,<sup>11,12</sup> but its utility in terms of predicting outcome remains undefined. However, as in our study, routine renal transplant biopsies scored according to Banff schema have proved to add to the immunologic monitoring of kidney allografts.<sup>4,7,8,9</sup> Certainly more studies on subclinical rejection will have to be performed. Immunohistology and molecular methods will need to be done for better definition of the mechanisms of rejection and probably they will help in individualization of therapy.

## REFERENCES

1. Matas AJ, Gillingham K, Payne WD, et al: Transplantation 57:857, 1994
2. Flechner S, Modlin C, Serrano D, et al: Transplantation 62:1235, 1996
3. Paul L: Kidney Int 47:1491, 1995
4. Serón D, Moresco F, Bover J, et al: Kidney Int 51:10, 1997
5. Rush DN, Nickerson P, Gough J, et al: J Am Soc Nephrol 9:2129, 1998
6. Solez K, Benediktsson H, Cavallo T, et al: Transplant Proc 28:441, 1996
7. Serón D, Diaz-Gallo C, Griño J, et al: Transplant Proc 23:1267, 1991
8. Isoniemi H, Krogerus L, von Willebrand E, et al: Kidney Int 41:155, 1992
9. Rush DN, Jeffrey J, Gough J: Transplant Proc 27:1017, 1995
10. Nickerson P, Jeffrey J, Gough J, et al: J Am Soc Nephrol 9:482, 1998
11. Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, et al: Kidney Int 49:481, 1996
12. Hansen HE, Olsen S, Madsen M: J Am Soc Nephrol 8:684a, 1997

**Versão em português do artigo:**

**“Interpretation of Surveillance Kidney Allograft Biopsies According to the Banff Criteria”**

**Interpretação de Biópsias de Vigilância do Aloenxerto Renal de Acordo com os Critérios de Banff**

***Autores***

F.V. Veronese, L.F. Gonçalves, M.I. Edelweiss, and R.C. Manfro

***Instituição***

Unidade de Transplante Renal, Divisão de Nefrologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre;  
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

***Autor para correspondência***

Francisco V. Veronese, Divisão de Nefrologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS. Brasil, CEP 90035-003.

## **Introdução**

O desenvolvimento de rejeição crônica tem sido correlacionado com episódios de rejeição aguda<sup>1,2</sup>, e a perda tardia do rim transplantado é principalmente devida à rejeição crônica<sup>3</sup>. A rejeição subclínica, detectada por biópsias de rotina do enxerto em aproximadamente 30% dos rins transplantados estáveis, está sendo cada vez mais descrita<sup>4</sup> e tratada<sup>5</sup>. Ainda é controversa a relação causal entre rejeição aguda subclínica e a nefropatia crônica do enxerto, assim como a necessidade de alterar a imunossupressão para tratar a rejeição subclínica.

O objetivo deste estudo foi avaliar a utilidade das biópsias de vigilância do aloenxerto renal para o diagnóstico precoce da rejeição subclínica, determinar a sua prevalência no nosso centro de transplante e verificar a sua associação com o desenvolvimento tardio de rejeição crônica.

## **Material e métodos**

### **Pacientes**

Trinta e dois pacientes adultos transplantados (17 de doador cadáver e 15 de doador vivo parente) participaram do estudo, que foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A imunossupressão de base consistiu de prednisona, azatioprina e ciclosporina A; seis pacientes receberam terapia antilinfocitária (OKT3®), quatro como terapia de indução e dois para tratamento de rejeição córtico-resistente.

### **Biópsias**

Os critérios de inclusão foram função do enxerto estável (variação da creatinina sérica inferior a 10%) e imunossupressão inalterada quinze dias antes da biópsia. As biópsias renais foram realizadas aos 2 meses (B1) e 12 meses (B2) após o transplante, usando uma pistola automática com agulha 16-gauge após localização ultrassonográfica. O

diagnóstico histológico utilizando a classificação de Banff foi efetuado por um patologista renal, sem conhecimento dos dados clínicos. Uma segunda análise foi realizada 6 meses após para avaliar a reprodutibilidade (variação intraobservador). Em cinco pacientes a segunda biópsia não foi realizada, por recusa (2), gravidez (1), óbito com rim funcionante (1) e perda precoce do aloenxerto (1). Uma biópsia de 2 meses (B2) não foi representativa, sendo excluída da análise. Trinta e duas biópsias B1 e 26 biópsias B2 foram incluídas no estudo.

Os achados histológicos foram correlacionados com dados clínicos e laboratoriais. A associação entre rejeição subclínica precoce e desenvolvimento de rejeição crônica aos 12 meses também foi estudada.

#### Análise Estatística

Comparações entre grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) e teste de Kruskal-Wallis, e pelo teste do Qui-quadrado e teste Exato de Fisher quando apropriados. A variação intraobservador em relação à presença ou ausência de rejeição aguda (na B1) e crônica (na B2) foi estimada pela estatística kappa. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### Resultados

Os dados demográficos e clínicos são apresentados na Tabela 1. Como complicações do procedimento foi observado hematúria macroscópica auto-limitada em quatro casos, com coágulos na bexiga em dois destes pacientes.

Aos 2 meses, a média de creatinina sérica foi  $1,3 \pm 0,4$  mg/dl e de proteinúria  $403 \pm 269$  mg/dia. Neste período, 16 (50%) biópsias foram interpretadas como normais (sem rejeição), 3 (9%) foram limítrofes para rejeição, 10 (31%) pacientes tiveram rejeição celular aguda com Banff grau I ou grau II; 1 (3%) apresentou nefropatia crônica do enxerto (Banff grau I) e 2 (6%) casos foram detectadas alterações associadas à ciclosporina (Tabela 2).

Aos 12 meses, a média de creatinina sérica foi  $1,4 \pm 0,4$  mg/dl e de proteinúria  $524 \pm 836$  mg/dia (valores de B1 versus de B2,  $p = 0,28$ ). Em relação às biópsias de 12 meses, 9 (33%) foram descritas como normais, 1 (4%) como limítrofe para rejeição, 2 (8%) foram classificadas como rejeição celular aguda com Banff grau II e grau III; seis (22%) biópsias tiveram achados histológicos de rejeição crônica, com Banff grau I ou grau II; em seis (23%) o diagnóstico foi alterações associadas à ciclosporina, e 5 (19%) foram caracterizadas como dano crônico do enxerto. Em duas (7%) biópsias havia alterações inespecíficas, descritas como fibrose intersticial focal e atrofia tubular em uma biópsia, e esclerose segmentar em alguns glomérulos na outra.

Os valores de kappa da concordância intraobservador para presença ou ausência de rejeição aguda na biópsia B1 foram  $k = 0,60$  ( $p = 0,03$ ) e para a presença ou ausência de rejeição crônica na biópsia B2,  $k = 0,50$  ( $p = 0,12$ ).

Comparando pacientes com e sem rejeição subclínica aos 2 meses, não foi observada diferença estatisticamente significativa na prevalência de necrose tubular aguda, nos valores de creatinina sérica e na excreção de proteínas em urina de 24 horas (Tabela 3). Pacientes com rejeição clínica precoce tiveram uma creatinina sérica mais elevada, tanto aos 2 meses quanto aos 12 meses ( $1,5 \pm 0,4$  mg/dl x  $1,2 \pm 0,2$  mg/dl,  $p = 0,01$  e  $1,6 \pm 0,5$  mg/dl x  $1,2 \pm 0,2$  mg/dl,  $p = 0,04$ , respectivamente), mas os níveis de proteinúria não diferiram entre os dois grupos.

Não houve associação estatisticamente significativa entre a presença de rejeição subclínica aos 2 meses e de nefropatia crônica do enxerto na biópsia de 12 meses (RR = 0,73; [IC 95%], 0,56 – 0,94;  $p = 0,14$ ), mas houve uma tendência da rejeição clínica precoce estar associada com rejeição crônica (RR = 1,41; [IC 95%], 0,68 – 2,13;  $p = 0,07$ ). Não foi observada associação estatisticamente significativa entre rejeição clínica precoce e a presença de rejeição subclínica nas biópsias de protocolo aos 2 meses e 12 meses após o transplante.

## Discussão

Este estudo mostrou uma alta prevalência de rejeição subclínica em pacientes transplantados renais com função ótima e estável do enxerto. A rejeição celular aguda histológica aos 2 meses (31%) e a nefropatia crônica do enxerto aos 12 meses (22%) foram os principais achados. Outros autores têm descrito achados similares<sup>4,7,8</sup> tais como a associação de rejeição subclínica com pior função do rim transplantado a longo prazo<sup>9</sup>. Rush e colaboradores<sup>10</sup> demonstraram que rejeição subclínica aos 6 meses é um fator preditivo independente de uma creatinina sérica elevada aos 24 meses. Mesmo um infiltrado mononuclear limítrofe pode estar associado com dano crônico tardio e disfunção do enxerto<sup>9</sup>. Neste estudo não foi observada esta associação, talvez pelo fato da coorte estudada ser pequena e o tempo de seguimento curto. Assim como em outros estudos<sup>1,2</sup>, nossos resultados mostraram uma creatinina maior em pacientes com rejeição clínica a curto e a longo prazo, e uma tendência da rejeição clínica precoce estar associada com rejeição crônica em 1 ano de transplante.

Em cinco pacientes com alterações crônicas associadas à ciclosporina o diagnóstico de nefropatia crônica do enxerto não pode ser excluído. Por este motivo, a prevalência de dano crônico relacionado à rejeição na biópsia de 1 ano pode estar subestimada.

Muitos estudos de validação clínica da classificação de Banff de 1993-1995 têm sido realizados<sup>11,12</sup>, mas a sua utilidade em termos de prever desfechos permanece indefinida. Entretanto, assim como demonstrado no presente estudo, biópsias de rotina de rins transplantados graduadas por escores da classificação de Banff têm comprovada utilidade para a monitorização imunológica dos aloenxertos renais<sup>4,7,8,9</sup>. Certamente mais estudos sobre a rejeição subclínica deverão ser realizados. Métodos imunohistológicos e moleculares serão necessários para melhor definir os mecanismos de rejeição, provavelmente auxiliando na individualização da terapia imunossupressora.



**Referências**

1. Matas AJ, Gillingham K, Payne WD, et al: *Transplantation* 57:857, 1994
2. Flechner S, Modlin C, Serrano D, et al: *Transplantation* 62:1235, 1996
3. Paul L: *Kidney Int* 47:1491, 1995
4. Serón D, Moresco F, Bover J, et al: *Kidney Int* 51:10, 1997
5. Rush DN, Nickerson P, Gough J, et al: *J Am Soc Nephrol* 9:2129, 1998
6. Solez K, Benediktsson H, Cavallo T, et al: *Transplant Proc* 28:441, 1996
7. Serón D, Diaz-Gallo C, Grinyó J, et al: *Transplant Proc* 23:1267, 1991
8. Isoniemi H, Krogerus L, von Willebrand E, et al: *Kidney Int* 41:155, 1992
9. Rush DN, Jeffrey J, Gough J: *Transplant Proc* 27:1017, 1995
10. Nickerson P, Jeffrey J, Gough J, et al: *J Am Soc Nephrol* 9:482, 1998
11. Gaber LW, Moore LW, Alloway RR, et al: *Kidney Int* 49:481, 1996
12. Hansen HE, Olsen S, Madsen M: *J Am Soc Nephrol* 8:684a, 1997

**Tabela 1 - Dados Demográficos e Clínicos da Coorte de Transplantados**

	<i>n</i> * (%)
Idade (anos)	35,6 ± 11,9**
Sexo (masculino/feminino)	18 (56)/14 (44)
Número de gestações	1,4 ± 1,3
Número de transfusões	1,9 ± 2,9
Tempo de preservação (horas)	18,2 ± 4,3
Tempo de anastomose vascular (minutos)	40,6 ± 14,8
Necrose tubular aguda	10 (31)
Rejeição aguda clínica	17 (53)

*n*\* = 32

\*\* media ± desvio-padrão

**Tabela 2** - Achados Histológicos de Acordo com os Critérios de Banff.

Diagnóstico	B1 (2 meses)	B2 (12 meses)
Normal (sem rejeição)	16 (50)*	9 (33)
Alterações limítrofes	3(9)	1(4)
Rejeição aguda grau I	8(25)	—
Rejeição aguda grau II	2(6)	1(4)
Rejeição aguda grau III	—	1(4)
NCE** grau I	1(3)	3(11)
NCE** grau II	—	3(11)
Alterações associadas à ciclosporina	2(6)	6(23)
Alterações não específicas	—	2(7)
Total	32(100)	26(100)

\*n (%)

\*\*NCE: nefropatia crônica do enxerto

**Table 3** - Achados Clínicos em Pacientes Com e Sem Rejeição Subclínica aos 2 Meses.

	Rejeição Subclínica (n = 10)	Sem Rejeição Subclínica (n = 22)	P
Necrose tubular aguda	2 (20%)*	8 (36%)	NS **
Creatinina sérica (mg/dl)			
2 meses	1,2 ± 0,2***	1,4 ± 0,4	NS
12 meses	1,3 ± 0,5	1,4 ± 0,4	NS
Proteinúria (mg/dia)			
2 meses	377 ± 186	415 ± 303	NS
12 meses	524 ± 658	525 ± 925	NS

\*n (%).

\*\* NS = não significativo

\*\*\* média ± desvio-padrão

### 5.3. ARTIGO 3

#### **Protocol biopsies in renal transplant patients: three years of follow-up**

##### ***Authors***

F.V. Veronese, I.L. Noronha, R.C. Manfro, M.I. Edelweiss, J. Goldberg, S.G. Oliveira, I.B. Oliveira, T.G. Leitão, L.F. Gonçalves

##### ***Institutions***

Renal Division, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil; Renal Division, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; Transplant Division, Instituto de Nefrologia, Buenos Aires, Argentina

##### ***Author for correspondence***

Francisco V. Veronese. Renal Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, ZIP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

***Key words:*** subclinical rejection, protocol biopsies, kidney transplantation

***Grant support:*** CAPES, Brazil

## Summary

**Purposes:** Acute subclinical rejection (SAR) in stable renal transplant patients may be a risk factor for chronic allograft nephropathy (CAN). In this study clinical parameters and the expression of immunoactivation markers on protocol biopsies were analyzed, to identify predictive variables associated with the development of CAN and poor graft function up to three years of follow-up post-transplant.

**Materials and Methods:** Protocol biopsies were obtained at 2 months (B-2mo) and 12 months (B-12mo) post-transplant in patients with stable renal function. The Banff criteria were used for histological diagnosis. Graft function and urinary excretion of protein in 24 hours were assessed through 36 months of follow-up. Immunohistochemical evaluation of cell subpopulations (CD3+, CD4+, and CD8+ T lymphocytes and macrophages) and immunoactivation markers (interleukin-2 receptor (IL-2R), perforin and granzyme B) were performed on the biopsies. Interobserver variation in relation to the Banff diagnosis was measured by the kappa statistic.

**Results:** The prevalence of SAR at two months and of CAN at 12 months was 32% and 58%, respectively. Graft function at 6 months was significantly worsened in patients with SAR that developed CAN in the first year post-transplant. Kappa values for interobserver agreement was excellent for acute rejection ( $k=0.72$ ,  $p=0.0001$ ) but the reproducibility for chronic rejection was poor ( $k=0.01$ ,  $p=0.93$ ). In SAR patients, a significantly increased number of positive CD3 and CD8 T cells and a significantly higher expression of granzyme B were found in B-2mo, as well as an increased IL-2R expression in B-12mo. There was no association between SAR, cell phenotypes or expression of immunoactivation markers at B-2mo and the development of CAN at 12 months post-transplant.

**Conclusion:** Although we could not identify in this study any clinical or immunohistochemical marker to specifically predict the development of CAN, a high prevalence of SAR with signs of immunoactivation was found 2 months after transplantation,

and 40% of these patients developed chronic rejection later. These findings strengthen the value of protocol biopsies and the need for additional studies.

## **Introduction**

Subclinical acute rejection is found in nearly 30% of stable renal transplant patients submitted to surveillance biopsies (1,2,3). Protocol biopsies are not routinely done in clinical practice, because it is still controversial if this silent inflammatory infiltrate reflects intragraft immunoactivation and if it is associated with the development of chronic lesions and late graft dysfunction (4,5). The need to increase the immunosuppression in the face of subclinical rejection is also under discussion (6,7).

In this study stable renal transplant patients were submitted to protocol biopsies in the first year posttransplant, which were classified according to Banff schema. Clinical parameters and the expression of immunoactivation markers on these biopsies were analyzed, to identify predictive variables associated with the development of chronic allograft nephropathy and poor graft function up to three years of follow-up.

## **Materials and methods**

Thirty-two patients transplanted between March, 1996 and October, 1997 were included in this prospective study. Inclusion criteria were stable graft function (serum creatinine variation less than 10%) and no alteration of immunosuppression at least fifteen days prior to biopsy. All patients had the first biopsy done at 2 months (B-2mo) and 26(81%) were biopsied also at 12 months (B-12mo) posttransplant (2 refuses, 1 graft loss, 1 death, 1 pregnancy, and 1 altered immunosuppression). Histological diagnosis using the Banff 1997 schema was carried out by two renal pathologists, who were blinded to the clinical data and to the other histological diagnosis and grading. Reproducibility of the Banff diagnosis in respect to the presence of acute rejection in B-2mo and chronic allograft nephropathy at B-12mo was also evaluated.

Renal biopsy specimens were analyzed by immunohistochemistry using alkaline phosphatase antialkaline phosphatase (APAAP) and streptavidine-biotin techniques and the following monoclonal antibodies: T cell surface markers (CD3, CD4, CD8), macrophage



(CD68) and immunoactivation markers (interleukin-2 receptor (IL-2R), perforin and granzyme B). Biopsies were semiquantitatively scored by two another blind observers, according to the intensity of the antigen expression : 0, no positivity; 1+, weak positivity; 2+, moderate positivity; 3+, intense positivity. The average of the two scores was presented.

Graft function and 24-hours proteinuria were evaluated through the third year post-transplant. These data and also acute subclinical rejection and immunohistochemistry at 2 months biopsy were correlated with the development of chronic allograft nephropathy at 12 months.

Comparisons between groups were made by t test for unpaired data. Chi-square test was used to test for associations between categoric variables. The interobserver variation in relation to the Banff diagnosis was calculated by the kappa statistic. Significant differences were defined by  $p < 0.05$ .

## Results

One biopsy at 2 months and two biopsies at 12 months were excluded because the specimens were not representative. According to the time of the biopsy and to Banff diagnosis four groups were categorized: at B-2mo, subclinical acute rejection (SAR),  $n=10(32\%)$ , and patients without evidence of SAR (NoSAR),  $n=21(78\%)$ ; at B-12mo, chronic allograft nephropathy (CAN),  $n=14(58\%)$ , and biopsies without CAN (NoCAN),  $n=10(42\%)$ .

Demographic and clinical data did not differ between SAR and NoSAR, and also between CAN and NoCAN groups, except for the cold ischemia time that had been significantly higher in the CAN group (21 h versus 16 h,  $p=0.049$ ). Graft function and proteinuria were not statistically different between patients with and without acute and chronic rejection up to the third year post-transplant, but there was a trend towards a higher serum creatinine at six months in the CAN group compared to NoCAN ( $1.5 \pm 0.3$  mg/dL versus  $1.1 \pm 0.3$  mg/dL,  $p=0.09$ ).

Four (40%) patients with subclinical acute rejection in B-2mo developed chronic

allograft nephropathy at 12 months. Considering all clinical and immunohistochemical variables, only serum creatinine at 6 months reached statistical difference when these patients were compared to patients that did not develop CAN ( $1.6 \pm 0.2$  mg/dL versus  $1.1 \pm 0.1$  mg/dL,  $p=0.007$ , respectively). A trend for a higher serum creatinine at 12 and 24 months had also been showed in these four patients, but at the end of follow-up graft function was similar ( $2.0 \pm 0.6$  mg/dL versus  $1.5 \pm 0.5$  mg/dL,  $p=NS$ ). There was no association between early subclinical acute rejection and the development of chronic allograft nephropathy at 1 year.

Kappa values for interobserver agreement was excellent for acute rejection ( $k = 0.72$ ,  $p=0.0001$ ) but the reproducibility for chronic rejection was poor ( $k = 0.01$ ,  $p=0.93$ ).

Immunohistochemical findings showed that in patients with subclinical acute rejection in the B-2mo there was a significant increased number of positive cells expressing CD3 ( $2.1 \pm 0.8$  versus  $1.3 \pm 0.7$ ,  $p=0.02$ ) and CD8 ( $1.4 \pm 0.9$  versus  $0.8 \pm 0.5$ ,  $p=0.02$ ), and a trend to a higher number of CD4+ lymphocytes ( $2.0 \pm 1.1$  versus  $1.3 \pm 0.8$ ,  $p=0.09$ ). An increased expression of granzyme B in this group was also observed ( $1.3 \pm 0.9$  versus  $0.6 \pm 0.8$ ,  $p=0.047$ ), when compared to NoSAR patients. In the B-12mo, a higher expression of IL-2R ( $0.4 \pm 0.4$  versus  $0.9 \pm 0.6$ ,  $p=0.034$ ) was found in the NoCAN group; the scores for the remaining antibodies did not differ between the patients who had and who had not developed chronic rejection one year post-transplant.

No specific cell phenotype or immunoactivation marker at 2 months was associated with the development of CAN one year after transplantation, but a trend towards a higher CD4 positivity ( $p=0.09$ ) was observed in B-12mo with chronic rejection.

## Discussion

In this study one-third of protocol biopsies performed at 2 months in stable renal transplant recipients had subclinical acute rejection according to Banff criteria. Other groups had shown this finding before, suggesting that silent tubulointerstitial infiltrates could have

harmful effects on graft function and long-term outcome (1,2,8,9). According to this data, our results showed a higher serum creatinine at six months in patients with chronic allograft nephropathy that have had subclinical acute rejection 2 months after transplantation. However, there was no statistically significant difference in graft function between SAR and NoSAR groups at the end of follow-up. A higher level of proteinuria at 1 and 3 years was also observed in patients with subclinical acute rejection at 2 months, but this finding did not reach statistical significance.

We also analyzed phenotypic and immunoactivation markers of the graft cells by immunohistochemistry. No specific cell or molecule expressed in the 2 months biopsy was associated with later chronic rejection, but a trend for a higher expression of CD4+ T cell was found in patients with CAN. Grimm et al (10) compared protocol biopsies with normal graft histology or subclinical rejection with those with clinical rejection. They found a spectrum of increasing expression of CD3, CD4, CD8, CD68, IL-2R and perforin from normal through subclinical to clinical rejection. Interestingly, only CD3 was higher expressed in subclinical rejection when compared to normal biopsies. Lipman et al (11), using competitive template polymerase chain reaction, also demonstrated molecular evidence for subclinical rejection when heightened amounts of transcripts for interferon-gamma, IL-4, IL-15, perforin and Fas Ligand genes were expressed in stable renal allograft biopsies compared to normal ones.

Although we could not identify any immunoactivation marker to specifically predict the development of CAN, a high prevalence of SAR with signs of immunoactivation was found 2 months after transplantation, and 40% of these patients got on to chronic rejection later. These findings strengthen the value of protocol biopsies and the need for additional studies.

**References**

1. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, et al: *Transplantation* 57:208, 1994
2. Serón D, Moresco F, Bover J, et al: *Kidney Int* 51:10, 1997
3. Veronese FV, Gonçalves LF, Edelweiss MI, Manfro RC: *Transplant Proc* 31:3019, 1999
4. Rush DN, Karpinski ME, Nickerson P, et al: *Clin Transplantation* 13:441, 1999
5. Dimény E, Wahlberg J, Larsson E, Fellström B: *Clin Transplantation* 9:79, 1995
6. Rush DN, Nickerson P, Gough J, et al: *J Am Soc Nephrol* 9:2129, 1998
7. Meehan SM, Siegel CT, Aronson AJ, et al: *J Am Soc Nephrol* 10:1806, 1999
8. Rush DN, Jeffery JR, Gough J: *Transplantation* 59:511, 1995.
9. D'Ardenne AJ, Dunnill MS, Thompson JF, et al: *J Clin Pathol* 39:145, 1986.
10. Grimm PC, McKenna R, Nickerson P, et al: *J Am Soc Nephrol* 10:66, 1999
11. Lipman ML, Shen Y, Jeffery J, et al: *Transplantation* 66:1673, 1998

**Table 1** - Demographic and clinical data of patients with and without subclinical rejection.

	B-2mo		B-12mo	
	SAR (n=10)	NoSAR (n=21)	CAN (n=14)	NoCAN (n=10)
Age (years)	38 ± 12	34 ± 11	39 ± 12	32 ± 12
Gender (M/F)	7/3	15/6	10/4	8/2
Donor (C/L)	6/4	8/13	6/8	5/5
Cold ischemia (h)	18 ± 5	19 ± 4	21 ± 3	16 ± 5 <sup>1</sup>
Anastomosis (min)	43 ± 17	40 ± 13	44 ± 18	37 ± 13
DGF [n(%)]	3(30)	6(29)	6(43)	2(20)
Clinical AR [n(%)]	5(50)	9(43)	5(36)	6(60)

M/F: male/female; C/L: cadaveric/living; DGF: delayed graft function; AR: acute rejection.

<sup>1</sup> p = 0.049, CAN versus NoCAN

**Table 2** - Serum creatinine and proteinuria in patients with and without subclinical rejection.

	B-2mo		B-12mo	
	SAR (n=10)	NoSAR (n=21)	CAN (n=14)	NoCAN (n=10)
Creatinine (mg/dl)				
2 months	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,4	1,2 ± 0,3
6 months	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,4	1,5 ± 0,4	1,1 ± 0,3 <sup>1</sup>
1 year	1,5 ± 0,5	1,3 ± 0,4	1,5 ± 0,4	1,2 ± 0,4
3 years	1,7 ± 0,6	1,8 ± 1,6	1,6 ± 0,5	2,0 ± 2,2
Proteinuria (mg/24h)				
2 months	370 ± 182	398 ± 299	449 ± 338	364 ± 193
1 year	537 ± 648	290 ± 219	366 ± 231	433 ± 651
3 years	680 ± 1055	337 ± 362	348 ± 343	729 ± 1076

<sup>1</sup> p = 0.09, CAN versus NoCAN

**Table 3** - Scores from the immunohistochemical data in patients with and without subclinical rejection.

	B-2mo		p	B-12mo		p
	SAR (n=10)	NoSAR (n=21)		CAN (n=14)	NoCAN (n=10)	
CD3	2,1 ± 0,8	1,3 ± 0,7	0,02	1,6 ± 0,7	1,9 ± 0,8	NS
CD4	2,0 ± 1,1	1,3 ± 0,8	0,09	1,1 ± 0,8	1,7 ± 1,1	NS
CD8	1,4 ± 0,9	0,8 ± 0,5	0,02	1,3 ± 0,9	1,9 ± 1,1	NS
CD68	2,1 ± 0,6	1,8 ± 0,7	NS	1,7 ± 0,7	1,7 ± 0,7	NS
IL-2R	1,1 ± 1,0	1,1 ± 0,8	NS	0,4 ± 0,4	0,9 ± 0,6	0,034
Perforin	1,4 ± 1,1	1,0 ± 0,6	NS	0,7 ± 0,7	0,6 ± 0,4	NS
Gz-B	1,3 ± 0,9	0,6 ± 0,8	0,047	0,6 ± 0,5	1,0 ± 1,1	NS

CD68: macrophage; Gz-B: granzyme B; NS: not significant.

**Versão em português do artigo****“Protocol Biopsies in Renal Transplant Patients: Three Years of Follow-up”****Biópsias de Protocolo em Pacientes Transplantados Renais: Seguimento de Três Anos*****Autores***

F.V. Veronese<sup>1</sup>, I.L. Noronha<sup>2</sup>, R.C. Manfro<sup>1</sup>, M.I. Edelweiss<sup>3</sup>, J. Goldberg<sup>4</sup>, S.G. Oliveira<sup>2</sup>, I.B. Oliveira<sup>2</sup>, T.G. Leitão<sup>2</sup>, L.F. Gonçalves<sup>1</sup>

***Instituições***

<sup>1</sup>Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; <sup>2</sup>Serviço de Nefrologia, Departamento de Clínica Médica, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP; <sup>3</sup>Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; <sup>4</sup>Unidade de Transplante, Instituto de Nefrologia, Buenos Aires, Argentina

***Autor para correspondência***

Francisco V. Veronese. Serviço de Nefrologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

***Unitermos:*** rejeição subclínica, biópsias de protocolo, transplante renal

***Apoio:*** CAPES, Brasil



## Resumo

**Objetivos:** A rejeição aguda subclínica (RASC) em pacientes transplantados renais estáveis pode ser um fator de risco para a nefropatia crônica do enxerto (NCE). Foram analisados neste estudo parâmetros clínicos e a expressão de marcadores de imunoativação em biópsias de protocolo, com o objetivo de identificar variáveis preditivas do desenvolvimento de NCE e disfunção do enxerto até três anos de seguimento após o transplante.

**Materiais e Métodos:** As biópsias de protocolo foram realizadas aos 2 meses (B-2me) e 12 meses (B-12me) pós-transplante em pacientes com função do enxerto estável. Foram empregados os critérios de Banff para o diagnóstico histológico. A função do enxerto e a excreção urinária de proteínas em 24 horas foram avaliadas até 36 meses de seguimento. Foi realizada nas biópsias a avaliação imunohistoquímica das subpopulações de células (linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+, e macrófagos) e dos marcadores de imunoativação (receptor de interleucina 2 (IL-2R), perforina e granzima B). Foi mensurada a variação interobservador para o diagnóstico de Banff.

**Resultados:** A prevalência de RASC aos 2 meses e de NCE aos 12 meses foi de 32% e 58% respectivamente. A função do enxerto aos 6 meses foi significativamente pior nos pacientes com RASC que desenvolveram NCE no primeiro ano de transplante. O valor de kappa para o grau de concordância interobservador foi excelente para rejeição aguda ( $k=0,72$ ,  $p=0,0001$ ), mas a reprodutibilidade para rejeição crônica foi pobre ( $k=0,01$ ,  $p=0,93$ ). Nos pacientes com RASC, foi observado um número significativamente maior de células T CD3+ e CD8+, e uma expressão significativamente aumentada de granzima B na B-2me, assim como uma maior expressão de IL-2R na B-12me. Não houve associação entre RASC, fenótipo das subpopulações de células ou expressão dos marcadores de imunoativação na B-2me com o desenvolvimento de NCE aos 12 meses pós-transplante.

**Conclusões:** Embora não tenha sido identificado neste estudo nenhum marcador clínico

ou imunohistoquímico preditivo do desenvolvimento de NCE, foi observada uma prevalência elevada de RASC com sinais de imunoativação aos 2 meses após o transplante, e 40% desses pacientes desenvolveram rejeição crônica tardiamente. Esses achados reforçam o valor das biópsias de protocolo e a necessidade de estudos adicionais.

## Introdução

A rejeição aguda subclínica é encontrada em aproximadamente 30% dos pacientes transplantados renais estáveis submetidos à biópsias de vigilância<sup>1,2,3</sup>. As biópsias de protocolo não são realizadas rotineiramente na prática clínica, pois ainda é controverso se o infiltrado inflamatório que invariavelmente se observa reflete a presença de imunoativação intra-enxerto, e se esta rejeição está associada com o desenvolvimento de lesões crônicas e disfunção tardia do enxerto<sup>4,5</sup>. A necessidade de aumentar a imunossupressão na presença de rejeição subclínica também permanece em discussão<sup>6,7</sup>.

Neste estudo, pacientes transplantados renais estáveis foram submetidos à biópsias de protocolo no primeiro ano após o transplante, as quais foram classificadas de acordo com os critérios de Banff. Parâmetros clínicos e a expressão de marcadores de imunoativação nestas biópsias foram analisados, para identificar variáveis preditivas do desenvolvimento de rejeição crônica e pior função do enxerto até três de anos de seguimento pós-transplante.

## Material e métodos

Trinta e dois pacientes transplantados renais entre março de 1996 e outubro de 1997 foram incluídos neste estudo prospectivo. Os critérios de inclusão foram função do enxerto estável (variação da creatinina sérica inferior a 10%) e nenhuma alteração da imunossupressão por pelo menos quinze dias antes das biópsias. Todos os pacientes foram submetidos a uma primeira biópsia aos 2 meses (B-2me) e 26 (81%) pacientes foram biopsiados também aos 12 meses (B-12me) após o transplante (2 recusas, 1 perda do enxerto, 1 óbito, 1 gestação, 1 alteração de imunossupressão). O diagnóstico histológico utilizando os critérios de Banff de 1997 foi realizado por dois patologistas renais cegados para os dados clínicos e para o diagnóstico e graduação histológica do outro patologista. A reprodutibilidade do diagnóstico de Banff em relação à presença de rejeição aguda na B-2me e de nefropatia crônica do enxerto na B-12me também foi avaliada.

As biópsias do enxerto renal foram analisadas por imunohistoquímica através das técnicas da fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina (APAAP) e estreptavidina-biotina, utilizando-se os seguintes anticorpos monoclonais: marcadores de superfície do linfócito T (CD3, CD4, CD8), macrófagos (CD68) e marcadores de imunotivação (receptor de interleucina 2 (IL-2R), perforina e granzima B). As biópsias receberam escores através de método semi-quantitativo por dois outros observadores também cegados aos dados clínicos e ao diagnóstico histológico, de acordo com a intensidade da expressão antigênica: 0, sem positividade; 1+, positividade fraca; 2+ positividade moderada; 3+, positividade intensa. O escore final foi derivado da média dos escores dos dois observadores.

A função do enxerto e a proteinúria foram avaliados até o 3º ano de transplante. Estes dois parâmetros, e também a presença de rejeição aguda subclínica e a imunohistoquímica da biópsia de 2 meses, foram correlacionados com o desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto aos 12 meses.

Comparações entre grupos foram efetuadas pelo Teste t para dados não pareados. O teste do Qui-quadrado foi usado para testar associações entre as variáveis categóricas. A variação interobservador em relação aos diagnósticos de Banff foi calculada pela estatística kappa. Diferenças estatisticamente significativas foram definidas por  $p < 0,05$ .

## Resultados

Uma biópsia de 2 meses e duas biópsias de 12 meses foram excluídas pois as amostras não foram representativas. De acordo com o período da biópsia e com os diagnósticos de Banff foram categorizados quatro grupos: na B-2me, presença de rejeição aguda subclínica (RASC),  $n=10$  (32%), e pacientes sem evidências de RASC (SemRASC),  $n=21$  (78%); na B-12me, presença de nefropatia crônica do enxerto (NCE),  $n=14$  (58%), e biópsias sem NCE (SemNCE),  $n = 10$  (42%).

Os dados clínicos e demográficos não diferiram entre os grupos RASC e SemRASC, e também entre NCE e SemNCE, exceto o tempo de isquemia fria que foi

significativamente maior no grupo NCE (21 horas vs. 16 horas,  $p=0,049$ ). A função do enxerto e a proteinúria não foram estatisticamente diferentes entre pacientes com e sem RASC e com e sem NCE nos primeiros três anos de transplante, mas houve uma tendência da creatinina sérica aos 6 meses ser mais elevada no grupo NCE quando comparado com o grupo SemNCE ( $1,5 \pm 0,3$  mg/dl vs.  $1,1 \pm 0,3$  mg/dl,  $p = 0,09$ ).

Quatro (40%) pacientes com rejeição aguda subclínica na B-2me desenvolveram nefropatia crônica do enxerto aos 12 meses. Considerando todas as variáveis clínicas e imunohistoquímicas deste subgrupo, apenas a creatinina sérica aos 6 meses alcançou diferença estatisticamente significativa em relação aos pacientes que não desenvolveram NCE ( $1,6 \pm 0,2$  mg/dl vs.  $1,1 \pm 0,1$  mg/dl,  $p=0,007$ , respectivamente). Uma tendência para aumento da creatinina sérica aos 12 e 24 meses também foi observada nesses quatro pacientes, mas no final do seguimento a função do enxerto foi semelhante em relação ao outro grupo ( $2,0 \pm 0,6$  mg/dl vs.  $1,5 \pm 0,5$  mg/dl,  $p=NS$ ). Não houve associação entre rejeição subclínica precoce e o desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto 1 ano após o transplante.

O valor de kappa para concordância do diagnóstico histológico foi excelente para rejeição aguda ( $k = 0,72$ ,  $p=0,0001$ ), mas a reprodutibilidade para o diagnóstico de rejeição crônica foi pobre ( $k = 0,01$ ,  $p=0,93$ ).

Os achados imunohistoquímicos da B-2me revelaram que nos pacientes com rejeição aguda subclínica o número de células positivas para CD3 ( $2,1 \pm 0,8$  vs.  $1,3 \pm 0,7$ ,  $p=0,02$ ) e para CD8 ( $1,4 \pm 0,9$  vs.  $0,8 \pm 0,5$ ,  $p=0,02$ ) foi significativamente maior do que no grupo SemRASC, e também houve uma tendência de um maior número de linfócitos CD4+ naquele grupo ( $2,0 \pm 1,1$  vs.  $1,3 \pm 0,8$ ,  $p=0,09$ ). Uma expressão aumentada de granzima B no grupo RASC também foi observada ( $1,3 \pm 0,9$  vs.  $0,6 \pm 0,8$ ,  $p=0,047$ ), em relação aos pacientes do grupo SemRASC. Na B-12me, uma maior expressão de IL-2R ( $0,4 \pm 0,4$  vs.  $0,9 \pm 0,6$ ,  $p=0,034$ ) foi verificada no grupo SemNCE; os escores para os demais anticorpos avaliados não diferiram entre os pacientes que tinham e os que não tinham desenvolvido

rejeição crônica 1 ano após o transplante.

Nenhum fenótipo celular ou marcador de imunoativação específico na biópsia de 2 meses esteve associado com o desenvolvimento de NCE um ano pós-transplante, mas observou-se uma tendência para maior positividade de linfócitos CD4 ( $p=0,09$ ) nas biópsias de 12 meses com rejeição crônica.

## Discussão

Neste estudo um terço das biópsias de protocolo realizadas aos 2 meses após o transplante em receptores de transplante renal estáveis apresentou rejeição aguda subclínica pelos critérios de Banff. Outros autores haviam mostrado estes achados anteriormente, sugerindo que este infiltrado tubulointersticial silencioso poderia ter efeitos prejudiciais na função e sobrevida do enxerto a longo prazo<sup>1,2,8,9</sup>. Em acordo com estes dados, no presente estudo a creatinina sérica aos seis meses foi significativamente mais elevada nos pacientes com nefropatia crônica do enxerto que tiveram rejeição aguda subclínica na biópsia de 2 meses pós-transplante. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na função do enxerto entre os grupos RASC e SemRASC no final do acompanhamento. Uma maior excreção de proteínas em 24 horas no 1º e 3º anos pós-transplante também foi observada no grupo com rejeição aguda subclínica aos 2 meses, mas este resultado não alcançou significância estatística.

Também foram analisados marcadores fenotípicos e de imunoativação das células do enxerto através da imunohistoquímica. Nenhuma célula ou molécula específica com expressão na biópsia de 2 meses esteve associada com rejeição crônica tardia, mas uma tendência para maior expressão de linfócitos T CD4+ foi encontrada nos pacientes com NCE. Grimm e cols.<sup>10</sup> compararam rins transplantados com histologia normal, com rejeição subclínica e com rejeição acompanhada de disfunção do enxerto diagnosticados por biópsias de protocolo. Estes autores encontraram um espectro crescente de expressão de células CD3+, CD4+, CD8+, CD68+, de IL-R2 e de perforina partindo de biópsias normais e

com RASC até os enxertos com rejeição aguda clínica. Um dado interessante relatado por esses autores foi que apenas a expressão de linfócitos CD3+ estava significativamente aumentada nas biópsias com rejeição subclínica em relação às biópsias normais. Lipman e cols.<sup>11</sup>, utilizando reação em cadeia pela polimerase pelo método competitivo, também demonstraram evidências moleculares de imunoativação na rejeição subclínica, detectando um aumento estatisticamente significativo da transcrição dos genes de interferon-gama, IL-4, IL-15, perforina e Fas ligante em biópsias de enxertos renais estáveis com RASC em relação a rins histologicamente normais.

Embora não tenha sido identificado nenhum marcador de imunoativação específico preditivo do desenvolvimento de NCE, uma prevalência elevada de RASC com sinais de imunoativação intra-enxerto foi observada aos 2 meses após o transplante, e 40% desses pacientes desenvolveram rejeição crônica posteriormente. Estes achados reforçam o valor das biópsias de protocolo e a necessidade de estudos adicionais.

## Referências

1. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 1994;57(2):208-11.
2. Serón D, Moresco F, Bover J, Condom E, Gil-Vernet S, Cañas C, et al. Early protocol renal allograft biopsies and graft outcome. *Kidney Int* 1997; 51(1):310-16.
3. Veronese FV, Gonçalves LF, Edelweiss MI, Manfro RC. Interpretation of surveillance kidney allograft biopsies according to the Banff criteria. *Transplant Proc* 1993;31(7):3019-20.
4. Rush DN, Karpinski ME, Nickerson P, Dancea S, Birk P, Jeffery JR. Does subclinical rejection contribute to chronic rejection in renal transplant patients? *Clin Transplantation* 1999;13(6):441-46.
5. Dimény E, Wahlberg J, Larsson E, Fellström B. Can histopathological findings in early renal allograft biopsies identify patients at risk for chronic vascular rejection? *Clin Transplant* 1995;9(2):79-84.
6. Rush DN, Nickerson P, Gough J, et al. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(11):2129-34.
7. Meehan SM, Siegel CT, Aronson AJ, Bartosh SM, Thistlethwaite JR, Woodle ES, et al. The relationship of untreated borderline infiltrates by Banff criteria to acute rejection in renal allograft biopsies. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(8):1806-14.
8. Rush DN, Jeffery JR, Gough, J: Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. *Transplantation* 1995; 59:511-4.
9. d'Ardenne AJ, Dunnill MS, Thompson JF, McWhinnie D, Wood RF, Morris P. Cyclosporin and renal graft histology. *J Clin Pathol* 1986;39(2):145-51.
10. Grimm PC, McKenna R, Nickerson P, Russell ME, Gough J, Gospodarek E, et al. Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(7):1582-89.



11. Lipman ML, Shen Y, Jeffery JR, Gough J, McKenna M, Grimm PC, et al. Immune-activation gene expression in clinically stable renal allograft biopsies: molecular evidence for subclinical rejection. *Transplantation* 1998;66(12):1673-81.

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos dos pacientes com e sem rejeição subclínica

	B-2me		B-12me	
	RASC (n=10)	SemRASC (n=21)	NCE (n=14)	SemNCE (n=10)
Idade (anos)	38 ± 12	34 ± 11	39 ± 12	32 ± 12
Sexo (M/F)	7/3	15/6	10/4	8/2
Doador (C/V)	6/4	8/13	6/8	5/5
Isquemia fria (h)	18 ± 5	19 ± 4	21 ± 3	16 ± 5 <sup>†</sup>
Anastomose (min)	43 ± 17	40 ± 13	44 ± 18	37 ± 13
NTA [n(%)]	3(30)	6(29)	6(43)	2(20)
RA Clínica	5(50)	9(43)	5(36)	6(60)

M/F: masculino/feminino; C/V: cadavérico/vivo; NTA: necrose tubular aguda

RA: rejeição aguda; <sup>†</sup> p = 0,049, NCE versus SemNCE

Tabela 2. Creatinina sérica e proteinúria dos pacientes com e sem rejeição subclínica

	B-2me		B-12me	
	RASC (n=10)	SemRASC (n=21)	NCE (n=14)	SemNCE (n=10)
Creatinina (mg/dl)				
2 meses	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,4	1,2 ± 0,3
6 meses	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,4	1,5 ± 0,4	1,1 ± 0,3 <sup>†</sup>
1 ano	1,5 ± 0,5	1,3 ± 0,4	1,5 ± 0,4	1,2 ± 0,4
3 anos	1,7 ± 0,6	1,8 ± 1,6	1,6 ± 0,5	2,0 ± 2,2
Proteinúria (mg/24h)				
2 meses	370 ± 182	398 ± 299	449 ± 338	364 ± 193
1 ano	537 ± 648	290 ± 219	366 ± 231	433 ± 651
3 anos	680 ± 1055	337 ± 362	348 ± 343	729 ± 1076

<sup>†</sup> p = 0,09, NCE versus SemNCE

Tabela 3. Escores da expressão imunohistoquímica das biópsias com e sem rejeição subclínica

	B-2me		P	B-12me		p
	RASC (n=10)	SemRASC (n=21)		NCE (n=14)	SemNCE (n=10)	
CD3	2,1 ± 0,8	1,3 ± 0,7	0,02	1,6 ± 0,7	1,9 ± 0,8	NS
CD4	2,0 ± 1,1	1,3 ± 0,8	0,09	1,1 ± 0,8	1,7 ± 1,1	NS
CD8	1,4 ± 0,9	0,8 ± 0,5	0,02	1,3 ± 0,9	1,9 ± 1,1	NS
CD68	2,1 ± 0,6	1,8 ± 0,7	NS	1,7 ± 0,7	1,7 ± 0,7	NS
IL-2	1,1 ± 1,0	1,1 ± 0,8	NS	0,4 ± 0,4	0,9 ± 0,6	0,034
Perforina	1,4 ± 1,1	1,0 ± 0,6	NS	0,7 ± 0,7	0,6 ± 0,4	NS
GzB-B	1,3 ± 0,9	0,6 ± 0,8	0,047	0,6 ± 0,5	1,0 ± 1,1	NS

CD68: macrófago; GzB-B: granzima B; NS: não significativo.

**6. ANEXOS**

## 6.1. ANEXO 1

### CLASSIFICAÇÃO DE BANFF 1997

---

1. Normal
2. Rejeição mediada por anticorpos
  - Imediata; Retardada
3. Suspeita de rejeição aguda
  - Infiltrado focal de células mononucleares de leve a moderado, com focos de tubulite leve, t1 (1 a 4 células mononucleares por secção tubular); sempre < i2 t2
4. Rejeição aguda
  - Tipo A – “tubulointersticial” sem presença de vasculite; i2 ou i3 (>25% parênquima)
    - Leve a moderada – infiltrado intersticial i2 (>25% do parênquima afetado) e focos de tubulite moderada (t2); Moderada a severa – infiltrado intersticial (idem) e focos de tubulite severa (t3)
  - Tipo B – “vascular” com arterite da íntima
    - Leve – v1; moderado – v2
  - Tipo C – rejeição aguda severa
    - Alterações fibrinóides e/ou arterite transmural e necrose das células musculares lisas da média (v3)
5. Nefropatia crônica do enxerto
  - Espessamento fibroso da íntima das artérias, ruptura da lâmina elástica interna e/ou glomerulopatia do transplante
  - Grau I: leve (fibrose intersticial e atrofia tubular leve; ct1, ci1)
  - Grau II: moderada (fibrose intersticial e atrofia tubular moderada (ct2, ci2) em 25% a 50% do parênquima)
  - Grau III: severa (fibrose intersticial e atrofia tubular severa (ct3, ci3) em > 50% do parênquima)

---

Adaptado de: Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bousib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999;55(2):713-23.

## 6.2. ANEXO 2

### A. CRITÉRIOS QUANTITATIVOS DE BANFF PARA SEVERIDADE DA REJEIÇÃO AGUDA:

1. GLOMERULITE (g): acúmulo de células mononucleares na luz capilar, com edema da célula endotelial

0 = sem glomerulite

1 = glomerulite em < 25% dos glomérulos

2 = glomerulite segmentar ou global em 25% a 75% dos glomérulos

3 = glomerulite (mais global) em todos ou quase todos os glomérulos

2. TUBULITE (t): invasão de células mononucleares através da membrana basal tubular (MBT), embaixo ou entre as células tubulares

0 = sem células mononucleares nos túbulos

1 = focos de 1 a 4 células por seção tubular ou 10 células tubulares

2 = focos com 5 a 10 células por seção tubular ou 10 células tubulares

3 = focos com > 10 células por seção tubular ou t2 (e i2 ou i3) com pelo menos 2 áreas de destruição da MBT acompanhadas de t2 e i2/i3 em alguma área da biópsia.

3. INFLAMAÇÃO INTERSTICIAL (i): extensão de parênquima infiltrado por células mononucleares; i\* = presença de números significativos de eosinófilos, PMN ou plasmócitos (especificar qual)

0 = < 10% do parênquima com infiltrado intersticial

1 = 11% a 25% do parênquima com infiltrado intersticial

2 = 26% a 50% do parênquima com infiltrado intersticial

3 = > 50% do parênquima com infiltrado intersticial

4. VASOS:

4.1 ARTÉRIAS (v): arterite da íntima; v\* = indica infarto e/ou hemorragia intersticial

0 = sem arterite

1 = arterite da íntima leve a moderada em pelo menos 1 vaso

2 = arterite da íntima moderada a severa em pelo menos 1 vaso.

3 = arterite da íntima severa em > 1 vaso e/ou arterite “transmural”, alteração fibrinóide e necrose das células musculares lisas da média, freqüentemente com infarto e hemorragia intersticial focais.

4.2 ARTERÍOLAS (ah): espessamento arteriolar hialino PAS positivo e com padrão nodular na periferia das arteríolas (sugestivas de toxicidade por ciclosporina; diferenciar de hipertensão ou diabetes no receptor)

0 = sem espessamento arteriolar hialino PAS positivo

1 = espessamento arteriolar hialino PAS positivo leve a moderado em pelo menos 1 arteríola

2 = espessamento arteriolar hialino PAS positivo moderado a severo em > 1 arteríola

3 = espessamento arteriolar hialino PAS positivo severo em muitas arteríolas

## B. CRITÉRIOS QUANTITATIVOS DE BANFF PARA SEVERIDADE DA NEFROPATIA CRÔNICA DO ENXERTO: colocar a letra “c” antes de g, i, t e v

1. GLOMÉRULO (cg): alargamento do espaço subendotelial, expansão mesangial, edema das células endoteliais, interposição periférica do mesângio e ocasionalmente crescentes celulares e adesões do tufo glomerular à cápsula de Bowman (PAS e PASM)

cg 0 = sem glomerulopatia crônica do transplante (duplo contorno em < 10% das alças capilares periféricas, nos glomérulos mais severamente afetados).

cg 1 = glomerulopatia crônica do transplante leve (espessamento da MB com duplo contorno em < 25% dos glomérulos não esclerosados).

cg2 = glomerulopatia crônica do transplante moderada (idem, em 26%-50%...).

cg 3 = glomerulopatia crônica do transplante severa (idem, em > 50%...).

2. TÚBULO-INTERSTÍCIO (ct, ci): atrofia e/ou perda tubular (atrofia progressiva e



severa), fibrose intersticial (tricromio, PAS, PASM).

ct 0 = sem atrofia ou perda tubular.

ct 1 = atrofia ou perda tubular leve (< 25% dos túbulos corticais).

ct 2 = atrofia ou perda tubular moderada (> 25% e < 50% dos túbulos corticais).

ct 3 = atrofia ou perda tubular severa (> 50% dos túbulos corticais).

ci 0 = sem fibrose intersticial.

ci 1 = fibrose intersticial leve, frequentemente com infiltrado inflamatório mononuclear em área cortical (> 6% e < 25% do interstício).

ci 2 = fibrose intersticial moderada, frequentemente com infiltrado inflamatório mononuclear (> 25% e < 50% do interstício).

ci 3 = fibrose intersticial severa, freqüentemente com infiltrado inflamatório mononuclear (> 50% do interstício).

3. VASOS (cv): espessamento fibroso da íntima das artérias, ruptura da lâmina elástica interna das artérias.

cv 0 = sem alterações vasculares.

cv 1 = espessamento fibroso da íntima leve (de até 25%), freqüentemente com fragmentação da lâmina elástica interna, ou presença de "foam cells" ou células mononucleares ocasionais.

cv 2 = espessamento fibroso da íntima moderado (26% a 50%), freqüentemente com fragmentação da lâmina elástica interna.

cv 3 = espessamento fibroso da íntima severo (> 50%), freqüentemente com fragmentação da lâmina elástica interna (oclusão severa).

4. MATRIZ MESANGIAL (mm): expansão do espaço mesangial entre os capilares adjacentes. Se a largura deste espaço exceder o de 2 células mesangiais em pelo menos 2 lóbulos glomerulares, a mm será considerada moderadamente aumentada.

mm 0 = ausência de aumento da mm.

mm 1 = aumento pelo menos moderado da mm em até 25% dos glomérulos não

esclerosados afetados.

mm 2 = aumento pelo menos moderado da mm de 26% a 50% dos glomérulos não esclerosados afetados.

mm 3 = aumento pelo menos moderado da mm em > 50% dos glomérulos não esclerosados afetados.

### 6.3. ANEXO 3

#### TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Título da Pesquisa: Reprodutibilidade da Classificação de Banff na Avaliação de Rejeição do Enxerto em Biópsias de Protocolo de Pacientes Transplantados Renais.

Investigador principal: Dr. Francisco José Veríssimo Veronese.

Número do protocolo: \_\_\_\_\_

##### 1. Objetivo do estudo:

Pesquisar se existe rejeição no rim transplantado que está funcionando bem, e pelo estudo de médicos especialistas em biópsias tentar estabelecer qual o tipo e gravidade da rejeição.

##### 2. Procedimento:

Você será submetido a uma biópsia do rim transplantado, no 2º e no 12º meses do transplante. Normalmente esta biópsia só é realizada quando o rim transplantado não está funcionando bem, mas para fins desta pesquisa este procedimento será realizado duas vezes, se não houver rejeição aparente e se o rim estiver funcionando normalmente nas últimas duas semanas antes da biópsia.

A biópsia é feita da seguinte maneira: 1) limpeza da pele com álcool e colocação de panos esterilizados, para diminuir o risco de infecção; 2) injeção de remédio para tirar a dor no local onde será feita a biópsia; 3) corte pequeno (2 a 3 mm) na pele com o bisturi 4) colocação da agulha no rim para retirar um pedacinho do mesmo, com cerca de 10 mm de comprimento por 1,5 mm de largura. A biópsia será então enviada para o laboratório.

Após a biópsia você ficará deitado de costas por 12 a 24 horas, com um peso de 1 kg sobre o rim para evitar que sangre. Durante 12 a 24 horas, será feita verificação freqüente da pressão arterial e do pulso, e também controle da cor e quantidade da urina.

##### 3. Riscos e desconfortos:

Os problemas que podem surgir pela biópsia do rim são sangramento, choque

(pressão arterial baixa) e infecção. Mas esses problemas ocorrem com muito pouca frequência, em menos de sete de mil pacientes que são biopsiados. O risco de morte por estas complicações é muito baixo, de 0,1%.

#### 4. Benefícios:

Embora você possa não receber nenhum benefício direto ou imediato deste estudo, a sua participação será muito importante para o conhecimento médico sobre a rejeição do rim transplantado.

#### 5. Procedimentos alternativos:

Existe outra técnica para pesquisar a rejeição no rim transplantado, a aspiração do rim com uma agulha muito fina. Os riscos desta aspiração do rim são menores do que os da biópsia, mas a aspiração só mostra alguns tipos de problemas, nem sempre permitindo que se possa diferenciar qual a complicação que está afetando o rim transplantado, principalmente quando já se passaram alguns meses do transplante. Assim a biópsia permite um diagnóstico mais preciso e definitivo.

#### 6. Custo/pagamento:

Se você escolher participar deste estudo, não existe custo ou pagamento de qualquer espécie por sua participação.

#### 7. Confidencialidade:

Os seus exames serão identificados por um código (número de registro), e o seu nome nunca será citado em nenhum registro ou divulgação desta pesquisa.

Pelo presente termo de Consentimento Informado, declaro que fui informado, de forma clara e detalhada, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos a que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios da presente pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

Fui igualmente informado:

- da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;

- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- do compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade em continuar participando;
- da disponibilidade de tratamento médico e de indenização, conforme estabelece a legislação, caso existam danos a minha saúde, diretamente causados por esta pesquisa;
- de que se existirem gastos adicionais, estes serão por conta do orçamento da pesquisa.

O Pesquisador Responsável por este Projeto de Pesquisa é o Dr. Francisco Veronese, cujo telefone é 3233.8914, tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição de atenção à saúde em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome e assinatura do Paciente ou Voluntário

---

---

Nome e assinatura do Responsável Legal, quando for o caso

---

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

---

Observação: O presente documento, baseado nos artigos 10 a 16 das Normas de Pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde, será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do Paciente ou de seu Responsável Legal e a outra com o Pesquisador Responsável.

**6.4. ANEXO 4**

## PROTOCOLO DOS DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS

PACIENTE Nº.: \_\_\_\_\_

## 1. DADOS DEMOGRÁFICOS:

Nome: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ anos Sexo: ( ) M ( ) F Cor: ( ) B ( ) P ( ) M

Transplante prévio: ( ) Não ( ) 1 ( ) 2

CMV: ( ) Pos ( ) Neg Hepatite: ( ) B ( ) C

Gestações: ( ) Não ( ) Especificar Transfusões: ( ) Não ( ) Especificar

Reatividade contra painel: atual: \_\_\_\_\_ histórica: \_\_\_\_\_ pico: \_\_\_\_\_

Compatibilidade HLA: ( ) 0 haplo ( ) 1 haplo ( ) idêntico

Doador: ( ) vivo relacionado ( ) vivo não relacionado ( ) cadáver

Isquemia fria: \_\_\_\_\_ horas Isquemia quente: \_\_\_\_\_ minutos

NTA: ( ) Sim ( ) Não

Nº. de rejeições: ( ) 0 ( ) 1 ( ) 2 ( ) Especificar

Imunossupressão: ( ) Prednisona + Azatioprina + Ciclosporina

( ) Idem + OKT3 profilático

( ) Idem + OKT3 terapêutico

( ) Prednisona + Ciclosporina ( ) Prednisona + Azatioprina

( ) Outro (especificar): \_\_\_\_\_

Toxicidade por Ciclosporina: ( ) Não ( ) Clínica ( ) Na biópsia

Infecção nos 1º.s dois meses: ( ) Sim ( ) Não

## 2. DADOS LABORATORIAIS

Dia	1	7	14	21	30	45	60	75	90	4m	5m	6m	7m	8m	9m	10 m	11 m	12 m	
Cr	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
RA																			
Prot							X					X							X

Abreviaturas: m: mês Cr: creatinina (mg/dl) RA: rejeição aguda

Prot: proteinúria de 24 horas (mg/dia)

Urocultura: ( ) negativa ( ) Agente: \_\_\_\_\_ Período: \_\_\_\_\_

( ) Agente: \_\_\_\_\_ Período: \_\_\_\_\_

CMV agudo: ( ) Sim ( ) Não

Outra infecção: \_\_\_\_\_

**6.5. ANEXO 5****DADOS DA HISTOPATOLOGIA**

Biópsia renal: Bx 2 meses ( ) representativa ( ) não representativa

( ) complicações: \_\_\_\_\_

Bx 12 meses ( ) representativa ( ) não representativa

( ) complicações: \_\_\_\_\_

BIÓPSIA 2 MESES			PROTOCOLO Nº							
Esco- re	g	cg	T	Ct	i	Ci	v	cv	Mm	ah
0										
1										
2										
3										
Conclusão		Usar 1 código apenas:								

BIÓPSIA 12 MESES			PROTOCOLO Nº							
Esco- re	g	cg	t	Ct	i	Ci	v	cv	Mm	ah
0										
1										
2										
3										
Conclusão		Usar 1 código apenas:								

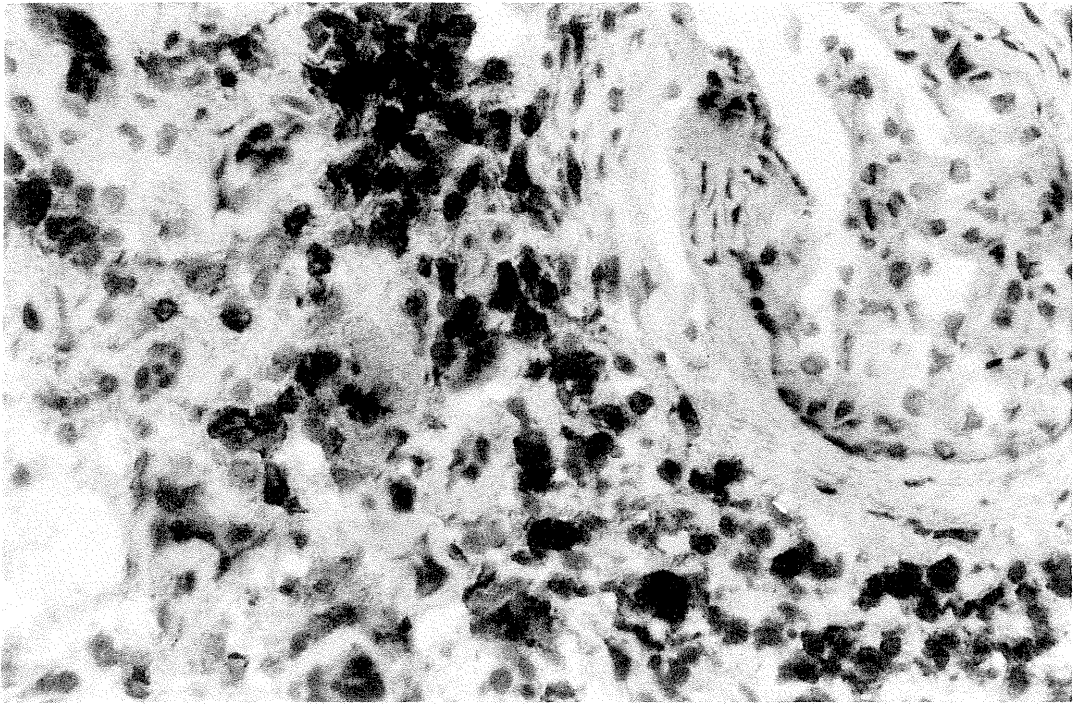


## CÓDIGOS:

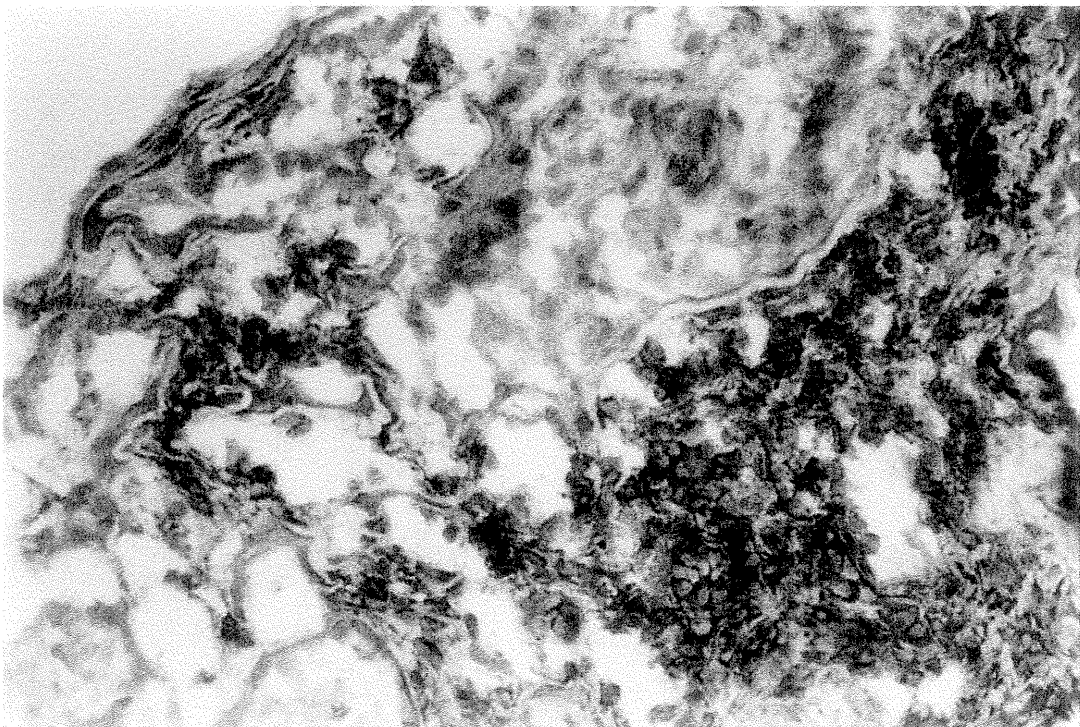
1. Normal
2. Suspeita de rejeição aguda
3. Rejeição aguda tipo I A
4. Rejeição aguda tipo I B
5. Rejeição aguda tipo II A
6. Rejeição aguda tipo II B
7. Rejeição aguda tipo III
8. Nefropatia crônica do enxerto grau I
9. Nefropatia crônica do enxerto grau II
10. Nefropatia crônica do enxerto grau III
11. Alterações associadas à ciclosporina (agudas/crônicas)
12. Outras alterações (não relacionadas à rejeição)
13. Tecido não representativo

## 6.6. ANEXO 6

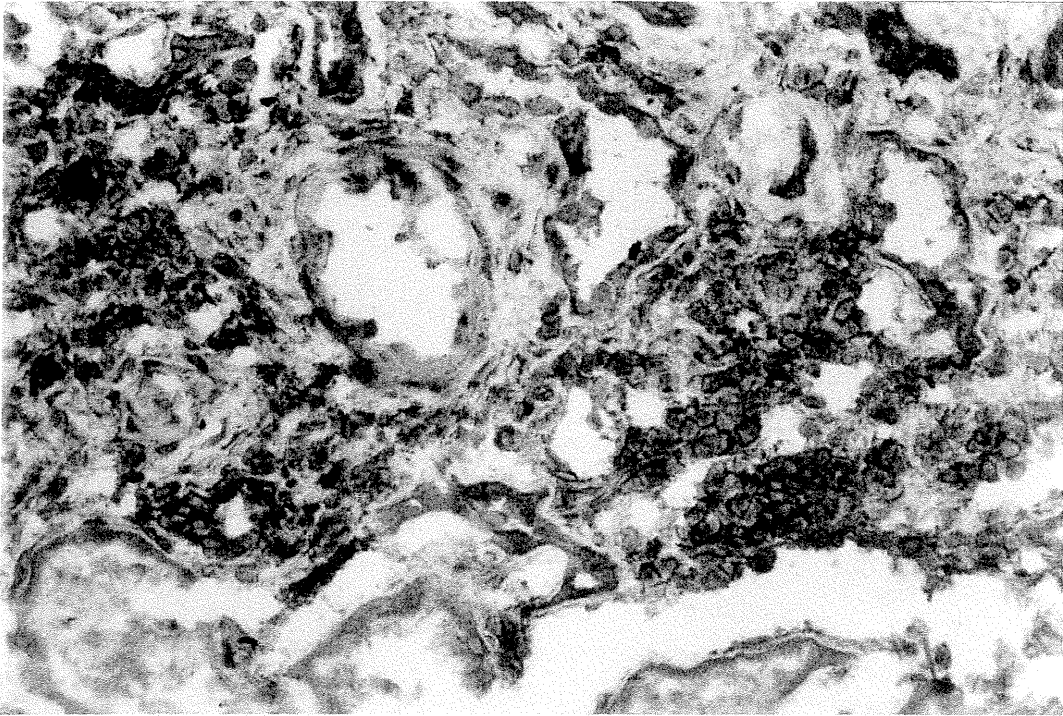
Imunohistoquímica aplicada nas biópsias de vigilância do rim transplantado.



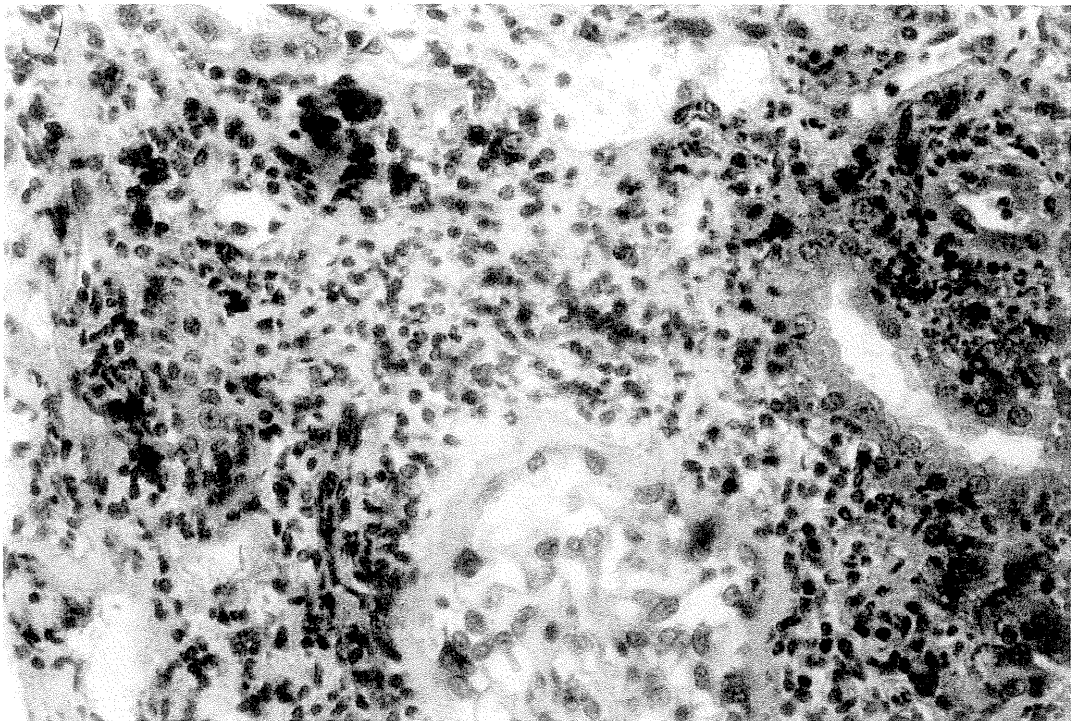
**Foto 1** – Expressão de linfócitos T CD3 positivos, de localização intersticial e periglomerular (400x).



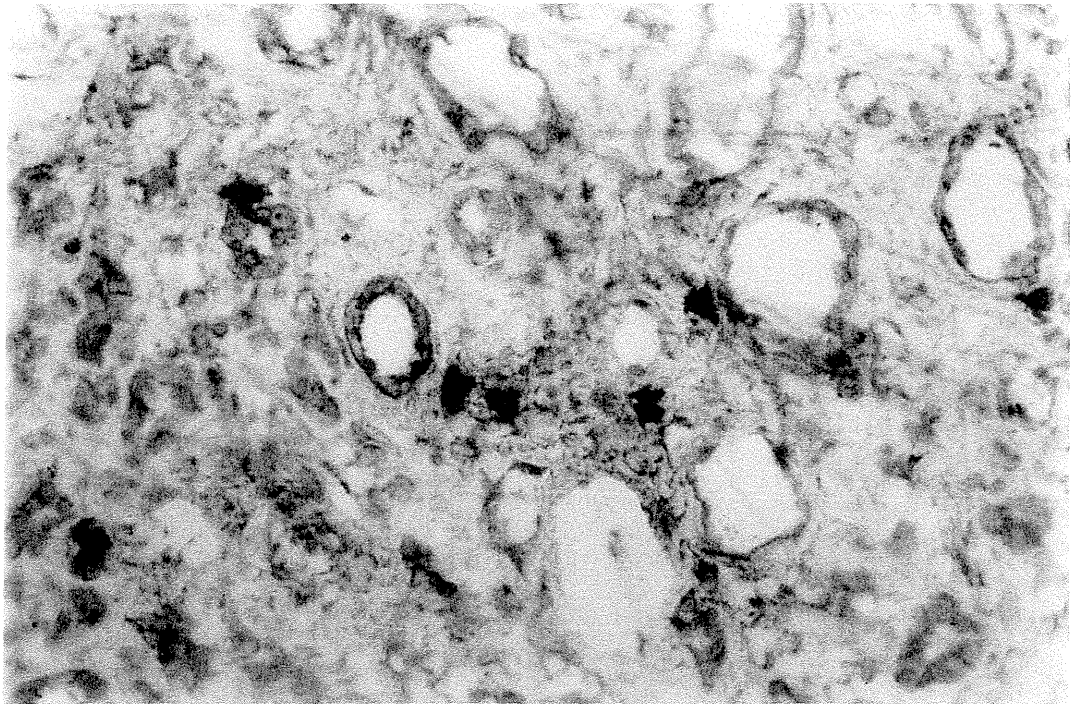
**Foto 2** – Expressão de linfócitos T CD4 positivos, de localização peritubular e intersticial (400x).



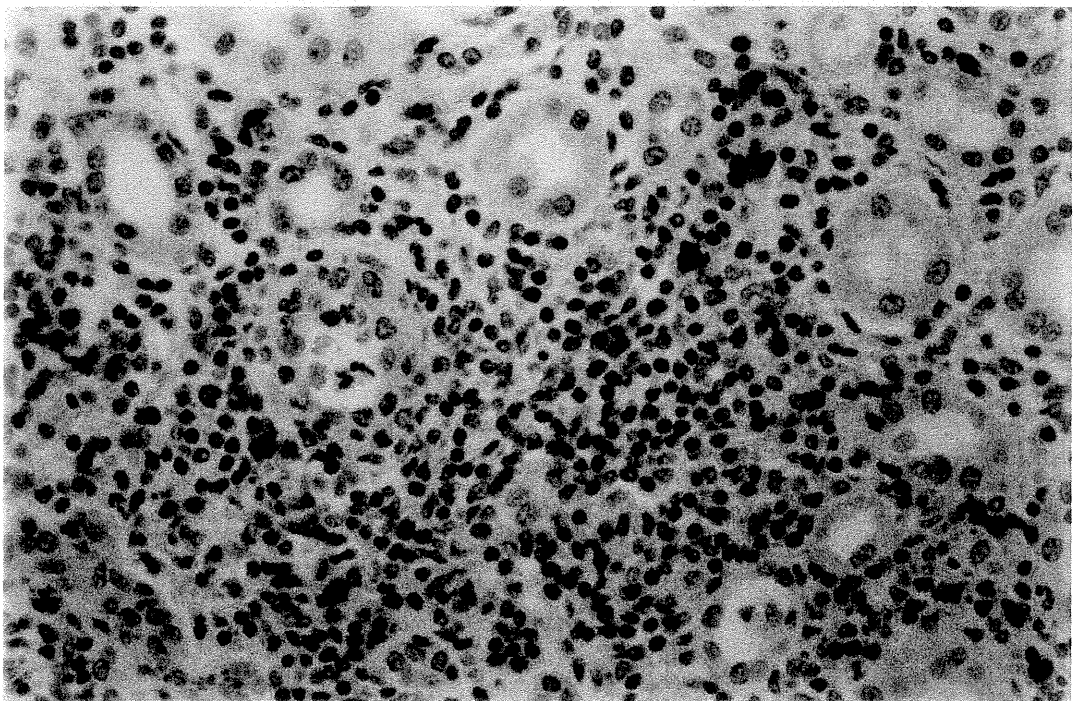
**Foto 3** – Expressão de linfócitos T CD8 positivos, de localização peritubular e intersticial (400 x).



**Foto 4** – Expressão de macrófagos (células CD68 positivas), em células tubulares e intersticiais (400 x).



**Foto 5** – Expressão de perforina em linfócitos citotóxicos, de localização peritubular e intersticial (400 x).



**Foto 6** – Expressão de granzima B em linfócitos citotóxicos, em células tubulares e intersticiais (400 x).

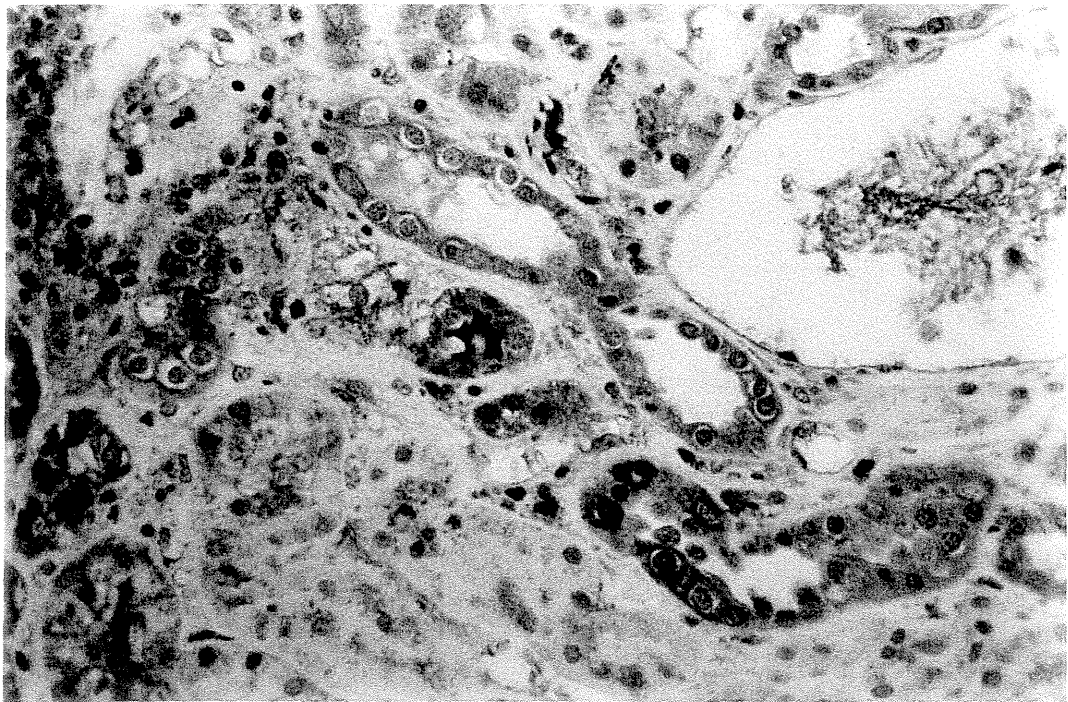


Foto 7 – Expressão de fator de crescimento transformador beta-1 (TGF $\beta$ 1) em células tubulares (400 x).