

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

**AVALIAÇÃO DA MONITORIZAÇÃO DA TERAPIA COM ANTICORPOS
POLICLONAIS ANTI-LINFÓCITOS T EM TRANSPLANTE RENAL:
CONTAGEM LINFOCITÁRIA TOTAL E DE CÉLULAS T CD3⁺ NO SANGUE
PERIFÉRICO**

Dissertação de Mestrado

Fabiani Palagi Machado

Porto Alegre, 2016

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

AVALIAÇÃO DA MONITORIZAÇÃO DA TERAPIA COM ANTICORPOS
POLICLONAIS ANTILINFÓCITOS T EM TRANSPLANTE RENAL:
CONTAGEM LINFOCITÁRIA TOTAL E DE CÉLULAS T CD3⁺ NO SANGUE
PERIFÉRICO

*Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências
Médicas da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul para a
obtenção do título de Mestre.*

Autor: Fabiani Palagi Machado

Orientador: Prof. Roberto Ceratti Manfro

Porto Alegre, 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Machado, Fabiani Palagi
AVALIAÇÃO DA MONITORIZAÇÃO DA TERAPIA COM
ANTICORPOS POLICLONAIS ANTILINFÓCITOS T EM
TRANSPLANTE RENAL: CONTAGEM LINFOCITÁRIA TOTAL E DE
CÉLULAS T CD3+ NO SANGUE PERIFÉRICO / Fabiani Palagi
Machado. -- 2016.

48 f.

Orientador: ROBERTO CERATTI MANFRO.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2016.

1. transplante renal . 2. imunossupressão. 3.
monitorização imunológica. 4. linfócitos T. I. CERATTI
MANFRO, ROBERTO, orient. II. Título.

Agradecimentos

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

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

Ao Prof. Dr Roberto Ceratti Manfro, pela oportunidade, ensinamentos, confiança, tempo dispensado em orientações e revisões proporcionando o auxílio e amparo necessários para a concretização deste trabalho.

À minha família, principalmente meus pais, Jane e Miguel e meu namorado, Pedro, pela compreensão, apoio e estímulo em todas as horas, estando ao meu lado, mesmo que à distância, nos momentos mais difíceis.

Resumo

Introdução: A globulina anti-timocitária (ATG) é um anticorpo policlonal depletor de linfócitos amplamente utilizado no transplante de órgãos. O monitoramento deste agente em receptores de transplante renal pode ser realizado por contagem de linfócitos totais e células T CD3⁺ no sangue periférico.

Objetivo: Avaliar a correlação entre estas duas formas de monitorização.

Métodos: Estudo retrospectivo, centro único, avaliou 226 pacientes que receberam enxerto renal entre 2008 e 2013 e que foram tratados com ATG para terapia de indução ou para tratamento de rejeição celular aguda grave. A primeira dose foi administrada no intra-operatório e as subsequentes de acordo com os níveis de células T CD3⁺ ou número de linfócitos totais no sangue periférico. Os coeficientes de correlação e concordância foram avaliados em amostras pareadas.

Resultados: No total 664 amostras pareadas foram analisadas para o número de linfócitos totais e células T CD3⁺. O coeficiente de correlação de Spearman entre os resultados foi 0.416 (P < 0.001) para a amostra geral, 0.435 (P < 0.001) para os pacientes em indução e 0.285 (P < 0.005) para os pacientes em tratamento de rejeição. O coeficiente de concordância Kappa entre as amostras gerais foi 0.267 (P < 0.001), 0.280 (P < 0.001) para indução e 0.155 (P < 0.081) para pacientes em tratamento. Os parâmetros diagnósticos para a contagem de linfócitos totais foram calculados usando o número de células T CD3⁺ como padrão-ouro com o ponto de corte de > 20 células/mm³. Na curva ROC o melhor ponto (256 linfócitos/mm³) apresenta área sobre a curva de 0.71 (95% CI: 0.67-0.75) com sensibilidade de 66.8%, especificidade 66.5%, valor preditivo positivo 46.6% e valor preditivo negativo 82.1%.

Conclusão: Baseados nestes resultados consideramos que a monitorização da administração e do intervalo das doses de ATG deva ser realizada através da contagem de células T CD3⁺, por citometria de fluxo, em detrimento dos linfócitos totais no sangue periférico.

Palavras-chave: transplante renal, imunossupressão, monitorização imunológica, linfócitos T

Abstract

Background: Anti-thymocyte globulin (ATG) is a preparation of depleting antibodies largely utilized in organ transplantation. The monitoring of this agent in renal transplant recipients can be accomplished by counting total lymphocytes and CD3⁺T cells in the peripheral blood.

Objective: Evaluated the correlation between these two measurements.

Methods: Retrospective study, single center study that evaluated 226 patients who received a kidney graft between 2008 and 2013 and where treated with ATG either for induction therapy or for treatment a severe acute cellular rejection. The first dose was given intra-operatively and subsequent doses were administered according to the levels of CD3⁺ T cells or number of total lymphocytes in the peripheral blood. Correlation and concordance coefficients were evaluated in paired samples.

Results: A total of 664 paired samples were analyzed for the number of lymphocytes and CD3⁺ T. The Spearman's correlation coefficient between the results was 0.416 (P < 0.001) to all samples, 0.435 (P < 0.001) for induction therapy samples and 0.285 (P<0.005) for therapeutic samples. The Kappa's concordance coefficient between samples was 0.267 (P < 0.001) to all samples, 0.280 (P < 0.001) for induction therapy samples and 0.155 (P<0.081) for therapeutic samples. The diagnostic parameters for the total lymphocyte counting were calculated using number of CD3⁺ T cells as the gold standard at the cut off at > 20 cells/mm³. At the ROC curve using the best cut off (256 lymphocytes/mm³) an AUC of 0.71 (95% CI: 0.67-0.75) was found along with a sensitivity 68.8%, specificity 66.5%, positive predictive value 46.6% and negative predictive value 82.1%.

Conclusion: Based upon these results it is not possible to reliably replace the flow cytometric assay for CD3⁺ T cells by the counting of total lymphocytes in the peripheral blood in the monitoring of ATG administration in kidney transplant recipients.

Key-words: kidney transplantation, immunosuppression, immunologic monitoring, T-lymphocytes.

Lista de Figuras

Figura 1. Evolução do número anual de transplantes renais no Brasil -----	17
Figura 2. Ativação do linfócito T-----	20
Figura 3. Mecanismos efetores da rejeição alôgenica-----	24
Figura 4. Anticorpos presentes na globulina anti-timocitária-----	31

Lista de Siglas e Abreviaturas

ALG, globulina anti-linfocitária

ATG, globulina anti-timocitária

CAA, células apresentadoras de antígenos

CMV, citomegalovírus

DNA, ácido desoxirribonucleico

DGF, atraso na função do enxerto (*delayed graft function*)

DSA, anticorpo específico contra o doador

EBV, vírus Epstein Barr

HLA, antígeno leucocitário humano (*human leucocyte antigens*)

IC, inibidor de calcineurina

IFN, interferon gama

IL 1, interleucina 1

IL2, interleucina 2

IL 6, interleucina 6

IL2R, receptor da interleucina 2

LIR, lesão de isquemia e reperfusão

MHC, complexo principal de histocompatibilidade

NK, “natural killer”

OKT 3, anticorpo monoclonal anti-CD3

PTLD, doença linfoproliferativa pós-transplante

RA, rejeição aguda

RNAm, ácido ribonucléico mensageiro

RCT, receptor de células T

TGF BETA, fator de transformação do crescimento beta

TH2, linfócitos T auxiliares 2

TNF, fator de necrose tumoral

T reg, linfócitos T reguladores

Sumário

1. Introdução	13
2. Revisão da literatura	16
2.1. Histórico.....	16
2.2. Imunologia dos transplantes.....	18
2.2.1. Rejeição	18
2.2.2. Mecanismos efetores da rejeição	22
2.2.3. A Rejeição Aguda.....	25
2.3. Regimes imunossupressores.....	27
2.3.1. Terapias de indução	27
2.4. Globulina anti-timocitária	30
3. Marco Teórico	36
4. Justificativa.....	37
5. Objetivos	38
5.1. Geral.....	38
5.2. Específicos	38
6. Referências bibliográficas da revisão	39
7. Artigo.....	49

1. Introdução

O transplante renal constitui um dos maiores avanços da medicina nos últimos 60 anos, sendo considerado o melhor tratamento para doença renal crônica terminal em médio e longo prazos, e também o tratamento de menor custo. Para a obtenção desses desfechos exitosos é fundamental que se controle e monitorize adequadamente a resposta imune ao enxerto desde sua implantação. Os linfócitos T e B são cruciais na resposta aloimune ao mediar as rejeições celulares e por anticorpos, respectivamente, e assim serem os principais efetores das rejeições aguda e crônica (1).

A globulina anti-timocitária (ATG) possui um papel chave nos regimes de indução imunossupressora utilizados nos transplantes renais assim como no tratamento de rejeições celulares agudas resistentes a esteróides (2). É uma solução purificada que contém uma variedade de imunoglobulinas específicas para antígenos presentes nas células T, incluindo CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD18, CD25, HLA-DR e HLA classe I. Essa solução é produzida através da imunização de coelhos com timócitos humanos. O uso desses agentes tem particular importância na indução de imunossupressão em pacientes que possuem maior predisposição aos efeitos nefrotóxicos dos inibidores de calcineurina (IC), podendo a introdução desses ser retardada. A indução com anticorpos também é de grande valor nos pacientes com maior risco imunológico como receptores pediátricos, afro-descendentes, re-transplantados e previamente sensibilizados a antígenos HLA (3–5).

Os anticorpos policlonais têm benefícios definidos no transplante renal, porém quando associados à imunossupressão excessiva podem resultar em complicações hematológicas, infecciosas e neoplásicas (6–8). O uso de doses reduzidas de ATG é objeto de estudos recentes, mas com resultados ainda inconclusivos (9–11).

O conceito de monitorização de células T em pacientes recebendo globulina anti-timocitária foi pela primeira vez proposto em 1975 no intuito de melhorar a eficácia do tratamento de rejeição aguda e evitar imunossupressão excessiva (12). O regime de doses é guiado por contagem diária de linfócitos T CD3⁺, proporcionando o acompanhamento da dose de ATG através dos seus efeitos biológicos nas células T (11). Esse é um método racional e seguro de regular a dose desse anticorpo, sendo possível reduzir o montante total de droga administrado ao paciente e conseqüentemente reduzir as complicações, bem como o custo do tratamento, sem perder efeito no benefício da imunossupressão (2,13,14). Trabalhos mostram uma redução de 60% na dose total de ATG e 58% no custo da terapia observado em pacientes que foram monitorados com o uso de contagem de células T CD3⁺ (15,16). Buchler et al ao avaliar a ocorrência de rejeição aguda descobriu que todos os casos estavam relacionados com contagem de linfócitos T CD3⁺ > 20 células/mm³. Em uma pequena amostra apresentou concordância do valor de linfócitos totais < 200 células/mm³ e T CD3⁺ < 20 células/mm³ (65). Franco et al encontrou correlação entre o valor de linfócitos totais e T CD3⁺ apenas esporadicamente havendo grande discrepância entre os métodos (66). Ata et al avaliou dois grupos de pacientes a fim de monitorar o uso de ATG para indução no transplante renal baseado na quantificação de linfócitos totais e T CD3⁺. O primeiro grupo apresentou maior labilidade de imunomodulação refletindo a necessidade de doses maiores de ATG e maior custo. Não houve diferença na incidência de rejeição ou infecção entre os grupos nos primeiros três meses pós-transplante.

Entretanto, a monitorização dos linfócitos T é cara e a técnica de citometria de fluxo não está disponível em todos os centros transplantadores (17). Por isso, estudar a contagem dos linfócitos totais de maneira que estes possam ser empregados com segurança é uma alternativa. A correlação entre a contagem dos linfócitos totais e as células T CD3⁺ já foi estudada em outros trabalhos, porém com pequeno número de pacientes e com resultados discordantes. Em um estudo encontrou-se que a probabilidade é de 92% de achar menos de 20 células T CD3⁺/μL quando a contagem de linfócitos totais é < 200/μL (18), em outro mostrou-se que uma correlação forte era apenas esporadicamente encontrada (15). Portanto, é importante determinar, nessa população de pacientes transplantados, a acuidade diagnóstica desses métodos.

Tendo em vista que a contagem de células T CD3⁺ é o método preferencialmente utilizado e considerado padrão para a monitorização da terapia com globulina anti-timocitária, porém substancialmente caro e indisponível na maioria dos serviços de transplante do Brasil, a validação de um método mais simples, a contagem de linfócitos totais, obtidos no leucograma, torna-se relevante.

2. Revisão da literatura

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados a monitorização do uso de timoglobulina - efeitos biológicos sobre as células T. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: LILACS, SCIELO, PUBMED e periódicos CAPES. Foram realizadas buscas através dos temas: timoglobulina, ATG, transplante renal, monitorização, linfócitos totais e TCD3⁺.

2.1. Histórico

O transplante renal é reconhecido como um importante avanço da medicina moderna por oferecer melhor expectativa e qualidade de vida aos pacientes com doença renal terminal. O primeiro transplante de órgão ocorrido com sucesso foi feito em Boston, em 1954, entre gêmeos idênticos, o qual anunciava o início de novas perspectivas para os pacientes com doença renal crônica (19,20). No Brasil os transplantes renais começaram em 1964, e na sequência vieram os demais órgãos (21).

Nas décadas de 60 a 80 a sobrevida dos pacientes melhorou progressivamente, alcançando 90%, e a do enxerto de 50% a 60% no primeiro ano de transplante, baseados na imunossupressão com azatioprina e prednisona. A introdução da ciclosporina nos anos 80 fez a sobrevida do paciente ultrapassar os 90% e a do enxerto 80%. Com o passar do tempo, o melhor conhecimento da terapia imunossupressora combinada, do manejo adequado do potencial doador e conseqüentemente dos órgãos, e a prevenção de infecções oportunistas contribuíram para desfechos clínicos mais favoráveis (22). Mesmo candidatos a receptores com altos títulos de anticorpos anti-HLA, que eram

considerados previamente como não-transplantáveis, puderam ser dessensibilizados e submetidos ao transplante (23).

O transplante renal permite ao doente renal crônico terminal a oportunidade de melhor sobrevida em relação a manutenção em diálise. Quando se compara pacientes que foram transplantados com aqueles em lista de espera para o transplante, a mortalidade chegou a ser 68% menor para os primeiros em um estudo com seguimento de 3 anos (24–26).

No Brasil o transplante de órgãos apresenta uma evolução constante nas últimas duas décadas (Figura 1). Isso ocorre como consequência do aumento progressivo na efetivação das doações que alcançaram 14 doadores pmp no término do primeiro semestre de 2016. No nosso país, em 2015, foram realizados 5579 transplantes renais, sendo 1184 com doador vivo e 4395 com doador falecido (27).

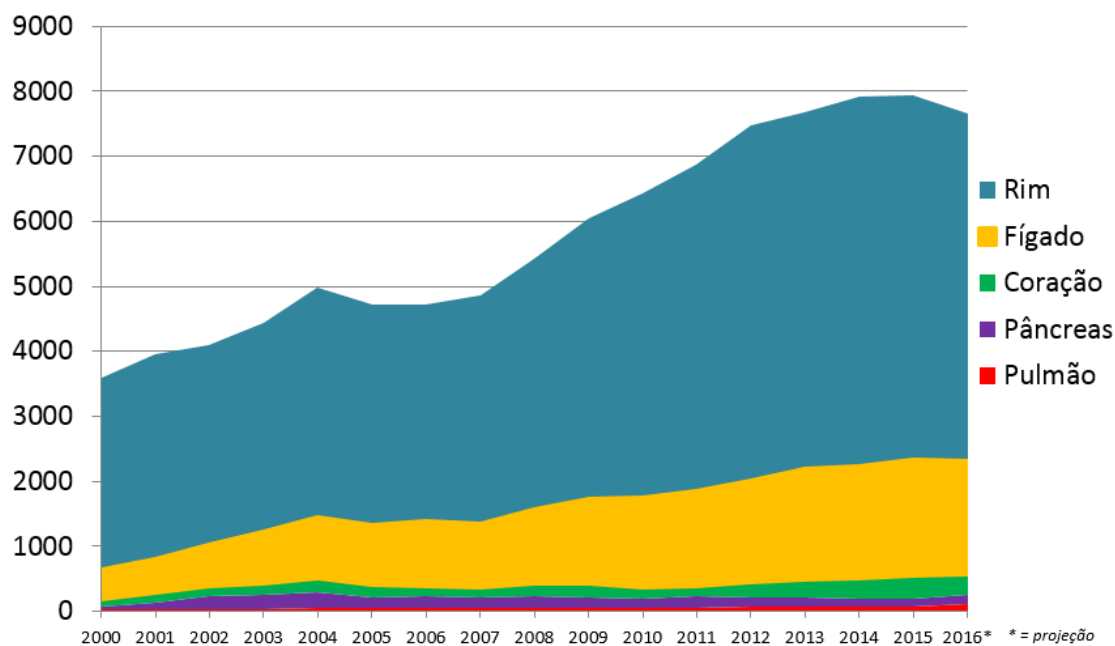


Figura 1. Evolução do número anual de transplantes de órgãos sólidos no Brasil. Fonte: Registro Brasileiro de Transplantes de Órgãos. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos e Tecidos.

2.2 Imunologia dos transplantes

2.2.1. Rejeição

Os alotransplantes são os realizados entre indivíduos da mesma espécie geneticamente diferentes (28).

A resposta imune cria mecanismos que levam ao reconhecimento e destruição de patógenos. No entanto, essa reação pode ser determinada a qualquer antígeno, podendo ocorrer em resposta àqueles do órgão transplantado. A rejeição ao aloenxerto envolve uma complexa rede de interações celulares e humorais. Após o reconhecimento antigênico pelas células apresentadoras do antígeno, o linfócito T apresenta um papel central: mediando e executando respostas celulares e humorais aos aloantígenos (29).

As principais moléculas responsáveis pela resposta alogênica e, conseqüentemente, pela rejeição, são os antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) o qual compreende proteínas da superfície celular codificada por genes localizados no braço curto do cromossoma 6 (30). Estes aloantígenos são conhecidos como antígenos de leucócitos humanos (HLA – Human leukocyte antigens) e o seu elevado polimorfismo permite ao sistema imunitário reconhecer antígenos “self” e “non-self” (31). Os genes do MHC codificam proteínas de duas classes: MHC de classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) encontram-se em praticamente todas as superfícies celulares. O MHC está envolvido no reconhecimento de antígenos proteicos externos, incluindo tecidos transplantados e são reconhecidos por

linfócitos T com especificidade antigênica. Geralmente, as moléculas de classe I são reconhecidas por linfócitos T citotóxicos ou T CD8⁺. Por outro lado, os MHC de classe II (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ) apenas se encontram em células apresentadoras de antígenos (CAA – células apresentadoras de antígenos) e células ativadas do sistema imune. Pensa-se que os MHC de classe II são os que desempenham o papel predominante na resposta imunitária inicial a antígenos de tecidos transplantados. Ao entrarem em contacto com um antígeno “non-self”, os HLA de classe II ativam os linfócitos T (helper ou CD4⁺) que, por sua vez, sofrem uma expansão clonal através da produção de citocinas reguladoras (30,32).

O objetivo do MHC é apresentar proteínas de modo que possam ser reconhecidas por linfócitos T através dos seus receptores antígeno-específicos. Os MHC são compostos por um polipeptídeo altamente polimórfico na cadeia alfa e outro monomórfico na cadeia beta, consistindo em b2-microglobulina no caso dos MHC de classe I, expresso em todas as células nucleadas. As moléculas de classe II do MHC são constitutivamente expressas apenas nas CAAs, incluindo as células dendríticas, macrófagos e células B. Estas moléculas apresentam uma cadeia alfa altamente variável e uma cadeia beta fixa. As proteínas nativas devem ser processadas em fragmentos menores, que se podem ligar a moléculas MHC. O aminoácido altamente variável vai determinar a especificidade de ligação de peptídeos e o reconhecimento do antígeno das células T. Funcionalmente, o receptor de células T (RCT) pode reconhecer tanto moléculas de classe I quanto de classe II. As restrições são impostas pelo engajamento das moléculas da superfície das células T CD4⁺ para a classe II e T CD8⁺ para classe I (figura 2) (33,34).

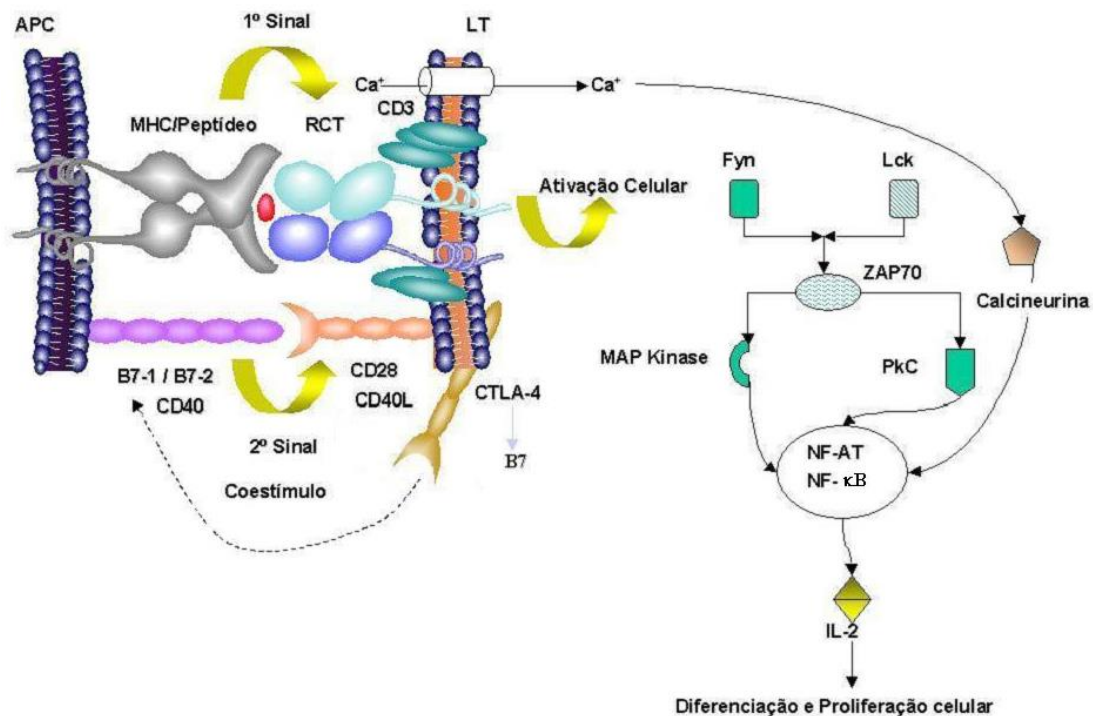


Figura 2. Ativação do linfócito T. O primeiro sinal para a ativação do linfócito T é dado pelo reconhecimento do complexo MHC/peptídeo pelo linfócito através do RCT. As moléculas co-estimuladoras fornecem o segundo sinal de ativação, que ocorre pela interação entre B7 (ou CD80 e CD86) e CD40 (nas células apresentadoras de antígeno) com CD 28 e CD40L (nos linfócitos), respectivamente. Todas essas interações culminam na ativação de cascatas de sinalização intracelulares, levando à diferenciação e proliferação dos linfócitos T. Por outro lado, a interação da molécula CTLA-4 com B7 inibe a proliferação do linfócito T. Modificado de referência (35).

Os receptores de células T não são capazes de reconhecer o antígeno livre, reconhecendo-o apenas na superfície de outras células, sejam células do doador, sejam das células apresentadoras de antígeno. Dependendo da natureza e da origem da célula que apresenta o antígeno, são caracterizadas duas vias de alo-reconhecimento: a via direta e a via indireta (36).

Segundo o modelo da via direta de reconhecimento, os receptores de células T são capazes de identificar alomoléculas intactas de MHC presentes nas células do

doador. Tem sido proposto que a rejeição celular aguda na fase inicial pós-transplante é mediada predominantemente pela via direta, embora a via indireta também tenha participação neste tipo de rejeição. Pelo modelo da via indireta de reconhecimento, células da linhagem monocítica/macrofágica, bem como células dendríticas e endoteliais, fagocitam moléculas MHC das células do enxerto, processando-as e reexpressando-as na superfície celular na forma de um complexo tridimensional formado por MHC + peptídeo (37–39).

A interação de moléculas do MHC com o receptor do linfócito T gera o primeiro sinal para o processo de ativação do linfócito T. Esse receptor de célula T é então ligado a um outro grupo de moléculas de superfície da célula T, o receptor CD3, um complexo que consiste em pelo menos 5 cadeias covalentes: G, D, ϵ , Z, e h. Quando o RCT se liga a um antígeno apresentado - MHC, existe uma alteração conformacional na CD3 que ativa as vias intracelulares de sinalização. Este sinal dirigido para o antígeno é traduzido pelo complexo RCT/CD3 para o citoplasma da célula T. Este sinal é essencial, mas não suficiente para a ativação completa das células T. Determina a ativação de enzimas presentes na membrana da célula T, promovendo fosforilação de fosfolípidos de membrana, dando início a uma série de eventos citoplasmáticos que vão desde a abertura de canais iônicos para cálcio até a ativação da calcineurina, uma fosfatase cálcio-dependente. Esta fosfatase induz de maneira rápida e eficiente o aumento da transcrição de genes que codificam IL-2 e outras citocinas. Concomitantemente, há aumento da expressão de receptores para IL-2 nas células T vizinhas ao local do reconhecimento inicial, amplificando assim a resposta imune celular (37–39).

A interação da IL-2 com o seu receptor (IL-2R) induz crescimento e diferenciação celular, levando à proliferação clonal e determinando o aparecimento de grande número de células efetoras. O resultado final de toda esta cadeia de eventos é o

agravamento da resposta inflamatória local e agressão ao aloenxerto através de diferentes vias efetoras.

Mais recentemente, foi demonstrado que a interação de MHC com receptores de células T não é suficiente para ativar completamente as células T para a produção de citocinas e indução de proliferação celular. Assim, foi reconhecido um segundo sinal co-estimulatório de ativação do linfócito T que pode ser o resultado da interação de CD28 na superfície dos linfócitos com seus ligantes B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) presentes nas células apresentadoras de antígenos. A ligação do CD-28 com seu receptor (B7-1 ou B7-2) potencializa a transcrição de IL-2, aumentando, assim, a secreção desta citocina, resultando em proliferação e expansão clonal das células T. Por outro lado, estudos recentes demonstraram que a ativação desencadeada pela ligação do CD-28/B7 pode ser bloqueada de maneira extremamente eficiente por uma proteína de fusão, a CTLA4Ig. Esta proteína bloqueia o ligante B7, servindo como um regulador negativo do processo de expansão clonal (40–44).

2.2.2. Mecanismos efetores da rejeição

Os seres humanos possuem um sistema imune inato capaz de bloquear rapidamente a propagação de patógenos infecciosos. A imunidade inata é frequentemente iniciada por receptores Toll-like, modulada por ativação do complemento e mediada por macrófagos e células “natural-killers”. Recentemente tem havido interesse no conceito de que esta via pode interagir com mecanismos aloimunes, formando assim uma ligação potencial entre lesão inespecífica (por exemplo: lesão de isquemia- reperfusão ou infecções) e rejeição aguda (45).

Por outro lado as células T e B fornecem alta especificidade com o desenvolvimento da imunidade adaptativa, a qual requer dias a semanas. É importante

reconhecer que outras células do sistema imune podem contribuir para a rejeição como as células endoteliais que participam da maturação das células dendríticas, células mesangiais na matriz do rim e que regulam respostas imunes e células epiteliais tubulares que expressam TGF beta e outras citocinas que podem contribuir para a fibrose. O sistema do complemento serve como uma interface importante entre a imunidade inata e adaptativa. Os componentes terminais da via são efetores importantes para destruição do transplante. Levando à lesão da membrana, infiltração de neutrófilos e danos às células epiteliais e endoteliais. Além disso, o sistema complemento é também envolvido na estimulação de células T e B (46).

A via Fas/Fas (FasL) é outro importante mecanismo efector. Fas é expressa em células do parênquima, enquanto que a FasL é induzida após ativação de células T CD4⁺. A ligação cruzada de Fas com FasL ativa a caspase 8 e propaga um sinal de morte que termina em apoptose. A ativação da caspase pode levar a lesões celulares irreversíveis e ocorrer independentemente de receptores da superfície celular. As células T CD8⁺ produzem moléculas citotóxicas que são letais para as células, uma delas a granzima B que requer uma estrutura de poro para obter acesso a célula. Quando a granzima B entra no citosol da célula alvo desencadeia vias que resultam em morte celular apoptótica. As células NK também são efectoras produzindo IFN-gama e promovendo assim inflamação (figura 3) (47–49).

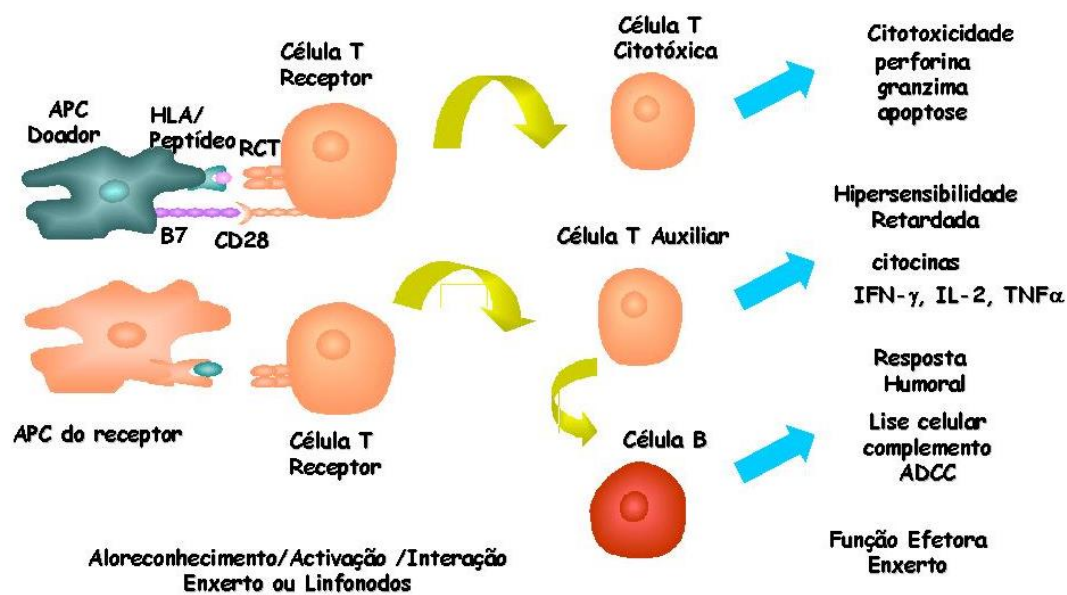


Figura 3. Mecanismos efetores da resposta alogênica. O reconhecimento alogênico pelos linfócitos T desencadeia uma série de interações entre diferentes células do sistema imune, ativando diversos mecanismos efetores de agressão ao enxerto, como citotoxicidade mediada por células, seja por apoptose ou pela ação de substâncias citolíticas, como perforina e granzima; reação imunológica de hipersensibilidade retardada (ou tardia), com a produção de diversas citocinas inflamatórias; citotoxicidade mediada por anticorpos, seja pela ativação da cascata do complemento ou com o envolvimento conjunto de células NK (citotoxicidade dependente de anticorpo). Todos esses mecanismos são capazes de causar dano ao tecido transplantado. Modificado de referência (35).

Com a ajuda de células T TH2 as células B derivadas da medula óssea podem diferenciar-se e produzir anticorpos específicos que agem por fixação do complemento ou opsonização das células. Servem também como excelentes apresentadores de antígenos. Aloanticorpos foram identificados como agentes causadores de rejeição aguda ou crônica. Estes são dirigidos principalmente contra antígenos HLA. No entanto, aloanticorpos para antígenos não-HLA (por exemplo, antígenos endoteliais ou epiteliais) foram identificados. Os anticorpos anti-HLA pré-formados ocorrem mais

comumente em pacientes que já foram transplantados, gestaram ou foram transfundidos. Menos comumente pode se desenvolver reação cruzada após exposição a vacinas, vírus ou outros agentes patogênicos (50).

2.2.3. A Rejeição Aguda

A rejeição de transplantes pode ser classificada com base em critérios clínico-patológicos em hiperaguda, aguda e crônica. Embora formas agudas de rejeição sejam geralmente divididas em celular e humoral, às vezes há componentes de ambas no mesmo tecido. A rejeição crônica tem crescente reconhecimento devido ao papel dos anticorpos em mediar danos imunes (51). Biópsia do rim transplantado continua a ser o padrão-ouro para o diagnóstico. Rejeição subclínica é encontrada em 5% a 25% das biópsias de protocolo realizadas durante os primeiros 6 meses pós-transplante em pacientes com função renal preservada. Tal fato tem despertado interesse no desenvolvimento de biomarcadores imunes que podem ser utilizados como preditores de rejeição sem necessitar de procedimento invasivo (1,52).

A rejeição celular aguda usualmente ocorre nos primeiros meses após o transplante. É mediada pela ativação e proliferação de células T. Atualmente a rejeição celular aguda raramente é sintomática e na maioria das vezes é reconhecida pelo declínio da função renal (aumento da creatinina no soro ou diminuição da taxa de filtração glomerular). Histologicamente é caracterizada por inflamação intersticial (uma mistura de linfócitos, macrófagos e ocasionalmente eosinófilos), inflamação vascular (infiltração linfocítica da íntima vascular), ou ambos. O envolvimento vascular reflete uma variante mais grave do que a doença intersticial isolada, evidenciado por uma menor resposta à terapia e pior sobrevida do transplante a longo prazo (28,53)

A rejeição aguda mediada por anticorpos pode ocorrer logo após o transplante em pacientes sensibilizados ou a qualquer momento em pacientes que desenvolvem DSAs. Os sintomas são escassos e a apresentação costuma ser por alteração laboratorial de perda de função renal e/ou proteinúria. A principal característica histológica da rejeição humoral aguda é capilarite peritubular manifestada por infiltração de linfócitos e especialmente neutrófilos. Em casos graves necrose fibrinóide pode ser vista nos capilares peritubulares e glomérulos. A presença de C4d nos capilares peritubulares, um componente do complemento que se liga ao tecido renal doente após a ativação do mesmo, é altamente sugestivo de rejeição humoral aguda e é estreitamente associada com a presença de DSAs na circulação (28,54).

Os critérios histopatológicos da rejeição dos transplantes renais vem sendo padronizados pela Classificação Internacional de Banff, cuja última atualização foi publicada em 2013 (51,55).

2.3. Regimes imunossupressores

O desafio no transplante é utilizar uma estratégia terapêutica que permita inibir ou interromper a resposta imunológica do hospedeiro de forma eficaz, evitando assim a rejeição do enxerto. No entanto, essas ações não são alvo-específicas e seus resultados dependem e muito do imunossupressor e da dose utilizados (56).

Podem ser genericamente caracterizados como de indução, manutenção e terapias de resgate. A imunossupressão de indução é intensa de tal forma que seu uso deve ser temporário pelos efeitos tóxicos que poderiam ser causados a longo prazo. A terapia de manutenção é menos potente, mas tolerável para uso crônico. Já o tratamento de rejeição assemelha-se ao de indução pela sua intensidade (57–60).

2.3.1. Terapias de indução

Inclui principalmente várias preparações de anticorpos: anticorpos policlonais – globulina anti-linfocítica (ALG) e globulina anti-timocitária (ATG); anticorpos monoclonais – OKT3, anti-CD25, anti-CD20 e anti-CD52, e imunoglobulina. Estes imunossupressores, especialmente a ALG, ATG e o OKT3, atuam através da depleção ou inativação não seletiva dos linfócitos, causando uma imunossupressão profunda e com mais efeitos colaterais (61).

AGENTES POLICLONAIS:

Globulina anti-linfocítica: soro policlonal produzido através da infusão de linfócitos humanos em animais de diferentes espécies. O mecanismo de ação consiste na diminuição das células T circulantes. Os linfócitos revestidos por ALG são destruídos ou eliminados do sangue periférico pelas células do sistema reticuloendotelial do baço e do fígado.

Globulina anti-timocitária: derivada do coelho e disponível na Europa desde 1985. É o anticorpo policlonal mais comumente usado e é eficaz na prevenção e na reversão da rejeição aguda (62–65). Essa droga é objeto desse trabalho e será relatada com maior detalhamento a seguir.

Anticorpos Monoclonais: OKT3 e inibidor de IL-2

OKT3: anticorpo monoclonal anti-CD3 das células T usado na prevenção e no tratamento dos episódios de rejeição aguda. O OKT3 liga-se ao complexo RCT, o qual é internalizado e não expresso na superfície celular, modulando o receptor e inativando as funções das células T, bloqueando não só as células T imaturas, mas também as funções das células T citotóxicas e reguladoras envolvidas na reação de rejeição do enxerto.

BLOQUEADORES DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA 2:

O IL-2R é um complexo de várias cadeias polipeptídeas transmembranas, das quais três foram caracterizadas: $-\alpha$ (CD25), $-\beta$ e $-\gamma$. A associação não-covalente dessas cadeias forma um sítio de ligação de alta afinidade para a IL-2. A cadeia α (IL-2R α) está presente apenas nas células T ativadas e num subconjunto de células B ativadas e de CAA. Assim, o tratamento com o anticorpo monoclonal anti-CD25 atinge uma pequena população de células rica em células T ativadas pelo antígeno específico. Há dois agentes disponíveis: basiliximab (anticorpo anti-CD25 quimérico) e daclizumab (anticorpo anti-CD25 humanizado), que inibem a reação de rejeição através da ligação aos IL-2R, deixando as células sem receptores livres para a IL-2. Não oferecem imunossupressão adequada por si só para prevenir a reação de rejeição, porque a proliferação das células T pode ocorrer através dos receptores IL-2 β e γ ou de outras vias. Por conseguinte, ambos devem ser usados em conjunto com outros imunossupressores (66–68).

ANTICORPO MONOCLONAL ANTI CD-20

Rituximabe: é um anticorpo monoclonal anti-CD20 quimérico que elimina a maioria das células B e foi inicialmente aprovado para o tratamento de linfomas de células B não Hodgkin refratários. Curiosamente foi introduzido no transplante renal para tratar a doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD), devido à sua ação depletora das células B. Também é usado, em alguns centros, para diminuir a produção de anticorpos em pacientes com alto risco imunológico ou nos protocolos em que exista cross-match positivo (69–71).

ANTICORPO MONOCLONAL ANTI CD-52:

Alemtuzumab ou Campath 1H: anticorpo monoclonal humanizado que interage especialmente com a glicoproteína de superfície celular CD52, que é expressa nas células B, nas células T, nos macrófagos e nos monócitos. Uma vez ligado ao CD52, produz uma depleção profunda e prolongada das células (T, B e NK) (72,73).

IMUNOGLOBULINAS POLICLONAIS:

As imunoglobulinas são constituídas por um pool de plasma de milhares de doadores selecionados e deve conter todos os anticorpos encontrados normalmente nos humanos. Atuam através de vários mecanismos para modular o sistema imunológico, incluindo a neutralização dos anticorpos circulantes, regulando a produção de citocinas das células T, inibindo a proliferação dos linfócitos e controlando a apoptose. As imunoglobulinas policlonais são usadas principalmente nos protocolos em que existem anticorpos anti-doador ou em incompatibilidade AB0, associada a plasmaferese. Adicionalmente, a administração endovenosa das imunoglobulinas policlonais são usadas para o tratamento da rejeição humoral de todos os tipos de órgãos transplantados (71,74).

2.4. Globulina anti-timocitária

Globulina anti-timocitária (Thymoglobulin ®; Genzyme, Cambridge, Mass., EUA) é uma imunoglobulina policlonal anti-linfócitos T, gerada em coelhos, purificada usada para a prevenção e tratamento da rejeição aguda (RA) após o transplante renal, principalmente as resistentes a esteróides, rejeições vasculares e as mediadas por anticorpos. A eficácia anti-rejeição do ATG foi estabelecida pela primeira vez em 1999, quando comparado com globulina antitimócitos equina (75).

As preparações antilinfócitos começaram em 1899 com os trabalhos de Metchnikoff (76). Em 1963 os antilinfocíticos foram testados no soro e produziram linfopenia, levando a uma nova perspectiva na área de transplantes (77). A primeira vez que foi utilizado em humanos foi em 1965 no transplante de rim. Desde 1984, a globulina anti-timocitária tem sido usada efetivamente no transplante de órgãos para prevenção e tratamento da rejeição aguda (78,79).

O mecanismo de ação principal é a depleção de células T, mas também ocorre a modulação dos receptores de superfície dessas células (80). A depleção dos linfócitos no sangue periférico acontece por lise celular dependente do complemento e mediada por anticorpos citotóxicos levando a ativação da morte celular. Em concentrações adequadas ocorre ativação da expressão do CD 178 (CD95-L) em células T em repouso e a apoptose de células T pré-ativadas envolvendo interações Fas/Fas-L (81). A depleção linfocitária ocorre rapidamente após a administração intravenosa da medicação. A recuperação é gradual sendo que em cerca de 40% dos pacientes tratados com globulina anti-timocitária (em uma média de 6 doses de 1,5 mg/kg/dia) aproximadamente 50% dos linfócitos retornam a contagem inicial em 3 meses (82). O ATG atua nas células T não só na periferia, mas também em tecidos linfóides secundários, onde a grande maioria das células T residem e a apresentação do antígeno

ocorre. Notavelmente nenhum esgotamento de linfócitos foi observado no timo em qualquer nível de dosagem. O tratamento com ATG modula a expressão de várias moléculas que controlam a ativação das células T, incluindo o receptor de células T (RCT)/CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8. O ATG induz a redução na expressão de integrinas e moléculas de adesão na superfície celular as quais facilitam a adesão de leucócitos no endotélio. Assim, a reperfusão na presença de ATG reduz a adesão de leucócitos e quase completamente inibe a adesão deles ao endotélio em modelos primatas (83) .

Célula T	Célula T ativada	Célula B	Plasma	Monócito	Célula dendrítica	Célula apresentadora antígeno
CD3	CD4	CD5	CD5	CD86	HLA-DR	HLA-DR
CD4	CD4	HLA-DR	HLA-DR	CD49d	CD58	CD58
CD8	CD8	CD58	CD58	CD50	CD80	CD80
CD5	CD5	CD152	CD28	CD54	CD86	CD86
CD2	CD2	CD40	CD38	CD102	CD40	CD40
CD58	CD58	CD7		CCR5	CD50	CD50
CD28	CD28	CD80*		CCR7		CD16
CCR5	CD80	CD86*		CXCR4		
CCR7	CD86	CD6		CD45		
CXCR4	CD152		Leucócitos	CD7	Células epiteliais, endoteliais, fibroblastos	
HLA-DR	CCR5	CD11a	CD99	CD38		
CD7	CCR7	CD44	A4 integrin		CD58	CD99
	CXCR4	CD45	CD102		CD40	CD102
	CD38	CD52	CD54		CD44	CD38
	CD6	CD49d			CD50	
		CD50			CD54	

Figura 4. Anticorpos presentes na globulina anti-timocitária. Modificado de referência (84).

A globulina anti-timocitária tem mostrado induzir fortemente a apoptose *in vitro* de células B ativadas e células plasmáticas da medula óssea. Parece ligar-se com várias proteínas de superfície de células B (CD30, CD38, CD95, CD80, e HLA-DR) garantindo sua atividade (8).

Embora *in vivo* o tratamento com ATG não esteja associado com redução de células esplênicas ou da medula óssea, pode reduzir o risco de rejeição mediada por anticorpos em pacientes com anticorpos pré-formados específicos ao doador. Essa complexa e prolongada imunomodulação induzida pelo ATG contribui para a eficácia deste agente no transplante de órgãos sólidos (85) .

A globulina anti-timocitária parece ter um papel na indução de tolerância imunológica. As células T reguladoras (Treg), um subconjunto especializado de células T, têm mostrado desempenhar um papel importante na modulação da resposta imunitária a aloantígenos e na manutenção de autotolerância (86–88). A globulina anti-timocitária, de maneira dose-dependente, converte os linfócitos CD4⁺, CD25⁺ e Foxp3⁺ em células funcionalmente imunossupressoras, podendo suprimir a resposta imune em cultura mista de linfócitos, sem interferir na resposta de memória. Também inibe eficazmente a quimiotaxia de células T através do CXCR4 (89,90). Todos estes efeitos em teoria podem contribuir para a anergia das células T e potencialmente maior sobrevida do enxerto.

Em relação as possíveis complicações relacionadas ao uso de ATG elas podem ser agudas ou tardias. Entre as agudas temos anafilaxia, febre, calafrios, rigidez, dispnéia, náuseas, vômitos, diarreia, hipotensão ou hipertensão, mal-estar, erupção cutânea e cefaléia. Reações mais graves incluem edema agudo de pulmão, infarto do miocárdio, taquicardia e raramente morte (91). Devido à presença de anticorpos de reação cruzada contra células não linfóides, anemia hemolítica, trombose, trombocitopenia e neutropenia podem ocorrer (83,92). Entre as reações tardias estão a doença do soro e as infecções. A doença do soro tende a ocorrer 5-15 dias após o início da terapia.

A associação entre terapias depletoras de linfócitos e infecções virais é bem estabelecida. Depois do tratamento com ATG há um aumento na incidência e severidade das infecções, particularmente naqueles pacientes que não recebem profilaxia (84,93–95). As complicações infecciosas incluem citomegalovírus (CMV) (13,4%), sepsis (12,2%), candidíase (3,7%), herpes simplex (4,9%) e infecções urinárias (18,3%), esses episódios estão relacionados principalmente a doses mais elevadas de ATG (5).

A linfopenia parece estar relacionada ao surgimento de algumas mas não todas as neoplasias malignas (96,97). A incidência de malignidade é significativamente mais elevada para receptores de órgãos transplantados do que para a população em geral. A doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD) atinge aproximadamente 1% dos pacientes, o que confere um risco de linfoma cerca de 20 vezes maior do que o observado em não transplantados (98). A relação entre imunossupressão e incidência de PTLD e tumores sólidos “de novo” é sugerida em vários estudos (99–103). O efeito imunológico das terapias para evitar a rejeição dos transplantes altera os mecanismos antitumorais que acabam predispondo esses pacientes a maior incidência de neoplasias (104). A PTLD parece estar relacionada a transformações no tecido linfóide causadas pela ação primária ou reativação do vírus Epstein-Barr (EBV) (105,106). Os receptores que receberam doses menores de ATG têm risco menor de desenvolver PTLD (107). Câncer de pele (basocelular e escamoso) é o mais comum tanto na população geral quanto em transplantados, porém esses com três vezes mais chance de desenvolver a doença (108). Os pacientes com neoplasias pós-transplante têm maiores taxas de mortalidade. Nos EUA a taxa de mortalidade por doenças malignas é de 1,9 por 1000 doentes/ano, o que representa aproximadamente 7% da taxa de mortalidade total (108).

A lesão de isquemia-reperfusão (LIR) é uma doença inflamatória aguda na qual as células e órgãos transplantados são danificadas por um processo inflamatório, decorrente de isquemia e reperfusão, podendo levar a disfunção e morte celular (109). A patogênese da LIR renal é multifatorial. Inicialmente refere-se às lesões de células hipóxicas e anóxicas durante a fase isquêmica, seguido de respostas inflamatórias durante a fase de reperfusão, sendo atribuído um papel significativo na patogênese da isquemia-reperfusão (110–112). Assim, a inativação destas células é um pré-requisito para conseguir alguma proteção, pois está associada a um aumento da taxa de rejeição aguda, disfunção primária, função retardada do enxerto (DGF) e mais tardiamente à falência e perda do enxerto (92,113).

Em relação a DGF, que é definida como necessidade de diálise na primeira semana após o transplante, Goggins et al mostraram que a administração intra-operatória, antes da reperfusão do enxerto, está associada com uma significativa diminuição da função retardada do enxerto, melhor função renal no primeiro mês pós-transplante, e uma diminuição no tempo de internação pós-transplante (114). Sabe-se que os pacientes com DGF têm um risco aumentado de rejeição aguda e menor sobrevida do enxerto (115–117). Apesar do custo inicial do transplante ser maior com o uso de ATG, essa diferença pode ser compensada com a diminuição do tempo de internação e até de tratamentos de rejeição (118).

Tendo em vista que a globulina anti-timocitária induz uma rápida e profunda depleção de linfócitos T, muitos pesquisadores propõem que a dose seja administrada e individualizada de acordo com efeitos biológicos da droga. Nos anos 70, Bishop et al e Cosimi et al já defendiam o monitoramento diário dos linfócitos (linfócitos totais e/ou T CD3⁺) e plaquetas durante a terapia (12,119). Neste contexto, os linfócitos T CD3⁺ são considerados o melhor marcador de atividade (2,7,84). O uso de doses intermitentes de

ATG, baseado na quantificação de células T CD3⁺, tem eficácia similar ao regime diário, porém com redução da dose cumulativa empregada, dos custos e permitindo a possibilidade de atraso do início de medicamentos potencialmente nefrotóxicos, como os inibidores de calcineurina (2,7,14,94,120–124). Os efeitos hematológicos e imunológicos devem ser monitorados a curto e longo prazos. O monitoramento de células T CD3⁺, através da técnica de citometria de fluxo, serve para ajustar a dose diária. Conforme Mourad et al o objetivo é manter a contagem de linfócitos totais menor que 200/mm³ e/ou T CD3⁺ abaixo de 20/mm³ (84). Assim é possível um maior controle da potência imunossupressora e da variação na resposta imunológica individual, limitando complicações infecciosas e neoplásicas relacionadas a imunossupressão excessiva mas também, por outro lado, reduzindo o risco de rejeição nos casos de subdoses (13,84).

No entanto, o monitoramento diário dos efeitos causados pelo anticorpo policlonal através de quantificação de linfócitos T CD3⁺ é caro e não está disponível em todos os centros (123). Dessa forma, torna-se relevante a validação da contagem dos linfócitos totais frente ao padrão-ouro de contagem de linfócitos T CD3⁺.

3. Marco Teórico

A globulina anti-timocitária tem sido amplamente utilizada no transplante renal como agente imunossupressor de indução e/ou de tratamento de rejeição celular aguda. O mecanismo de ação baseia-se em depleção de linfócitos T de maneira dose-dependente. Dessa forma, torna-se fundamental a monitoração do efeito biológico da droga através das contagens de células T CD3⁺ no sangue periférico, permitindo terapia eficaz e segura ao paciente.

4. Justificativa

A globulina anti-timocitária é um dos principais imunossupressores utilizados no arsenal terapêutico na área do transplante renal. O mecanismo de ação principal dessa droga é a depleção de linfócitos T de maneira dose-dependente. Dessa forma é fundamental que se tenha uma ferramenta custo-efetiva e amplamente disponível que permita otimizar o monitoramento dos seus efeitos biológicos evitando complicações desnecessárias.

5. Objetivos

5.1. Geral

Determinar a correlação e a concordância entre a contagem dos linfócitos totais no sangue periférico e de linfócitos T CD3⁺ em pacientes sob terapia com globulina anti-timocitária.

5.2. Específicos

- Avaliar os parâmetros diagnósticos resultantes da monitorização pela contagem dos linfócitos totais no sangue periférico;
- Avaliar as sobrevidas de pacientes e enxertos em receptores de transplante renal que receberam ATG com monitorização de linfócitos totais e células T CD3⁺;
- Avaliar a sobrevida dos enxertos conforme a indicação do uso de globulina anti-timocitária de acordo com a contagem de linfócitos totais e células T CD3⁺;
- Avaliar a função do enxerto após tratada rejeição aguda sob monitoramento das duas metodologias.

6. Referências bibliográficas da revisão

1. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med*. 2010 Oct 7;363(15):1451–62.
2. Peddi VR, Bryant M, Roy-Chaudhury P, Woodle ES, First MR. Safety, efficacy, and cost analysis of thymoglobulin induction therapy with intermittent dosing based on CD3+ lymphocyte counts in kidney and kidney-pancreas transplant recipients. *Transplantation*. 2002 May 15;73(9):1514–8.
3. Taylor DO, Kfoury AG, Pisani B, Hammond EH, Renlund DG. Antilymphocyte-antibody prophylaxis: review of the adult experience in heart transplantation. *Transplant Proc*. 1997 Dec;29(8A):13S–15S.
4. First MR. Immunologically high-risk recipient strategies. *Transplant Proc*. 1999 Mar;31(1–2):243–6.
5. Clesca P, Dirlando M, Park S-I, García R, Ferraz E, Pinheiro-Machado PG, et al. Thymoglobulin and Rate of Infectious Complications After Transplantation. *Transplant Proc*. 2007 Mar;39(2):463–4.
6. Gaber AO, Knight RJ, Patel S, Gaber LW. A Review of the Evidence for Use of Thymoglobulin Induction in Renal Transplantation. *Transplant Proc*. 2010 Jun;42(5):1395–400.
7. Djamali A, Turc-Baron C, Portales P, Levenson G, Chong G, Clot J, et al. Low dose antithymocyte globulins in renal transplantation: daily versus intermittent administration based on T-cell monitoring. *Transplantation*. 2000 Mar 15;69(5):799–805.
8. Thiagarajan UM, Ponnuswamy A, Bagul A. Thymoglobulin and its use in renal transplantation: a review. *Am J Nephrol*. 2013;37(6):586–601.
9. Alangaden GJ, Thyagarajan R, Gruber SA, Morawski K, Garnick J, El-Amm JM, et al. Infectious complications after kidney transplantation: current epidemiology and associated risk factors. *Clin Transplant*. 2006 Jul;20(4):401–9.
10. Kho MML, Bouvy AP, Cadogan M, Kraaijeveld R, Baan CC, Weimar W. The effect of low and ultra-low dosages Thymoglobulin on peripheral T, B and NK cells in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol*. 2012 Jun;26(4):186–90.
11. Yang J, Wang J, Men T, Zhang X, Li X, Shen B, et al. Comparison of clinical outcome of low-dose and high-dose rabbit antithymocyte globulin induction therapy in renal transplantation: a single-center experience. *Ann Transplant*. 2014;19:277–82.

12. Bishop G, Cosimi AB, Voynow NK, Whelchel JD, Wortis HH. Effect of immunosuppressive therapy for renal allografts on the number of circulating sheep red blood cells rosetting cells. *Transplantation*. 1975 Aug;20(2):123–9.
13. Wang CJ, Tuffaha A, Zhang D, Diederich DA, Wetmore JB. A CD3+ count-based thymoglobulin induction regimen permits delayed introduction of calcineurin inhibitors in kidney transplantation. *Clin Transplant*. 2012 Nov;26(6):900–9.
14. Abouna GM, al-Abdullah IH, Kelly-Sullivan D, Kumar MS, Loose J, Phillips K, et al. Randomized clinical trial of antithymocyte globulin induction in renal transplantation comparing a fixed daily dose with dose adjustment according to T cell monitoring. *Transplantation*. 1995 Jun 15;59(11):1564–8.
15. Buchler M, Thibault G, al Najjar A, Valentin JF, Guerraoui A, Nivet H, et al. Monitoring of ATG therapy by flow cytometry and lymphocyte counts in renal transplantation. *Transplant Proc*. 1996 Oct;28(5):2817–8.
16. Uber WE, Uber LA, VanBakel AB, Crumbley AJ, Pereira NL, Ikonomidis JS, et al. CD3 monitoring and thymoglobulin therapy in cardiac transplantation: Clinical outcomes and pharmacoeconomic implications. *Transplant Proc*. 2004 Dec;36(10):3245–9.
17. Krasinskas AM, Kreisel D, Acker MA, Bavaria JE, Pochettino A, Kotloff RM, et al. CD3 monitoring of antithymocyte globulin therapy in thoracic organ transplantation. *Transplantation*. 2002 Apr 27;73(8):1339–41.
18. Gorrie M, Thomson G, Lewis DM, Boyce M, Riad HN, Beaman M, et al. Dose titration during anti-thymocyte globulin therapy: monitoring by CD3 count or total lymphocyte count? *Clin Lab Haematol*. 1997 Mar;19(1):53–6.
19. Garcia GG, Harden P, Chapman J. The Global Role of Kidney Transplantation. *Kidney Blood Press Res*. 2012;35(5):299–304.
20. Evans RW, Manninen DL, Garrison LP, Hart LG, Blagg CR, Gutman RA, et al. The quality of life of patients with end-stage renal disease. *N Engl J Med*. 1985 Feb 28;312(9):553–9.
21. Pêgo-Fernandes PM, Garcia VD. Current status of transplantation in Brazil. *Sao Paulo Med J*. 2010 Jan;128(1):3–4.
22. Pondrom S. The AJT Report: News and issues that affect organ and tissue transplantation. *Am J Transplant*. 2011 Mar;11(3):415–6.
23. Peng A, Vo A, Jordan SC. Transplantation of the highly human leukocyte antigen-sensitized patient: long-term outcomes and future directions. *Transplant Rev*. 2006 Jul;20(3):146–56.
24. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LYC, et al. Comparison of Mortality in All Patients on Dialysis, Patients on Dialysis

- Awaiting Transplantation, and Recipients of a First Cadaveric Transplant. *N Engl J Med.* 1999 Dec 2;341(23):1725–30.
25. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Port FK, Arndorfer JA, Cibrik DM, Kaplan B. Survival improvement among patients with end-stage renal disease: trends over time for transplant recipients and wait-listed patients. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2001 Jun;12(6):1293–6.
 26. Oniscu GC. Impact of Cadaveric Renal Transplantation on Survival in Patients Listed for Transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Apr 27;16(6):1859–65.
 27. Registro Brasileiro de Transplantes. Available from: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2016/1sem-RBT2016%20leitura.pdf>
 28. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. *Imunologia de Kuby.* Porto Alegre (RS): ARTMED; 2008.
 29. Mackay IR, Rosen FS, Delves PJ, Roitt IM. The Immune System. *N Engl J Med.* 2000 Jul 6;343(1):37–49.
 30. Mackay IR, Rosen FS, Delves PJ, Roitt IM. The Immune System. *N Engl J Med.* 2000 Jul 13;343(2):108–17.
 31. Csencsits K, Wood S, Lu G, Magee J, Eichwald E, Chang C-H, et al. Graft rejection mediated by CD4+ T cells via indirect recognition of alloantigen is associated with a dominant Th2 response. *Eur J Immunol.* 2005 Mar;35(3):843–51.
 32. Mackay IR, Rosen FS, Klein J, Sato A. The HLA System. *N Engl J Med.* 2000 Sep 7;343(10):702–9.
 33. Epstein FH, Krensky AM, Weiss A, Crabtree G, Davis MM, Parham P. T-Lymphocyte-Antigen Interactions in Transplant Rejection. *N Engl J Med.* 1990 Feb 22;322(8):510–7.
 34. Epstein FH, Sayegh MH, Turka LA. The Role of T-Cell Costimulatory Activation Pathways in Transplant Rejection. *N Engl J Med.* 1998 Jun 18;338(25):1813–21.
 35. Verônica Coelho, Hernandez Moura Silva, Cristina Caldas, Jorge Kalil. *Manual de Transplante Renal.* 2ª edição. Editora Manole Ltda; 2014. 10;19.
 36. Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B, Alexander SI, Harmon W, Carpenter CB, et al. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation.* 1997 Sep 27;64(6):795–800.
 37. Gould DS, Auchincloss H. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today.* 1999 Feb;20(2):77–82.

38. Sayegh MH, Watschinger B, Carpenter CB. Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides. *Transplantation*. 1994 May 15;57(9):1295–302.
39. Liu Z, Sun YK, Xi YP, Maffei A, Reed E, Harris P, et al. Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity. *J Exp Med*. 1993 Jun 1;177(6):1643–50.
40. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995 Aug 1;182(2):459–65.
41. Sayegh MH, Akalin 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 May 1;181(5):1869–74.
42. Harris N, Peach R, Naemura J, Linsley PS, Le Gros G, Ronchese F. CD80 costimulation is essential for the induction of airway eosinophilia. *J Exp Med*. 1997 Jan 6;185(1):177–82.
43. Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, Phillips JH, Linsley PS, Okumura K, et al. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1995 Jan 1;154(1):97–105.
44. Stein PH, Fraser JD, Weiss A. The cytoplasmic domain of CD28 is both necessary and sufficient for costimulation of interleukin-2 secretion and association with phosphatidylinositol 3'-kinase. *Mol Cell Biol*. 1994 May;14(5):3392–402.
45. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011 Nov 7;17(11):1391–401.
46. Mason DW, Morris PJ. Effector mechanisms in allograft rejection. *Annu Rev Immunol*. 1986;4:119–45.
47. Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2008 Feb;3(1):189–220.
48. Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*. 1998 Jan 28;279(4):300–7.
49. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995 Jan;146(1):3–15.
50. HLA Matching in Renal Transplantation. *N Engl J Med*. 1995 Mar 16;332(11):752–3.
51. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 Classification of Renal Allograft Pathology: Updates and Future Directions. *Am J Transplant*. 2008 Apr;8(4):753–60.
52. Gwinner W. Renal transplant rejection markers. *World J Urol*. 2007 Sep 18;25(5):445–55.

53. Hricik DE. Transplant Immunology and Immunosuppression: Core Curriculum 2015. *Am J Kidney Dis.* 2015 Jun;65(6):956–66.
54. Cravedi P, Heeger PS. Complement as a multifaceted modulator of kidney transplant injury. *J Clin Invest.* 2014 Jun 2;124(6):2348–54.
55. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 Meeting Report: Inclusion of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection and Antibody-Associated Arterial Lesions: Banff 2013 Meeting Report. *Am J Transplant.* 2014 Feb;14(2):272–83.
56. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med.* 1994 Aug 11;331(6):365–76.
57. Meier-Kriesche H-U, Li S, Gruessner RWG, Fung JJ, Bustami RT, Barr ML, et al. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2006;6(5 Pt 2):1111–31.
58. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2009 Nov;9 Suppl 3:S1-155.
59. Opelz G. Relationship between maintenance dose of cyclosporine and long-term kidney graft survival. Collaborative Transplant Study. *Transplant Proc.* 1998 Aug;30(5):1716–7.
60. Denton MD, Magee CC, Sayegh MH. Immunosuppressive strategies in transplantation. *The Lancet.* 1999 Mar;353(9158):1083–91.
61. Kirk AD. Induction Immunosuppression: Transplantation. 2006 Sep;82(5):593–602.
62. Beiras-Fernandez A, Thein E, Hammer C. Induction of immunosuppression with polyclonal antithymocyte globulins: an overview. *Exp Clin Transplant Off J Middle East Soc Organ Transplant.* 2003 Dec;1(2):79–84.
63. Woodruff MF. Antilymphocyte serum: summary and further observations. *Transplantation.* 1967 Jul;5(4):Suppl:1127-1133.
64. Bourdage JS, Hamlin DM. Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. *Transplantation.* 1995 Apr 27;59(8):1194–200.
65. Burk ML, Matuszewski KA. Muromonab-CD3 and antithymocyte globulin in renal transplantation. *Ann Pharmacother.* 1997 Nov;31(11):1370–7.
66. Webster AC, Ruster LP, McGee R, Matheson SL, Higgins GY, Willis NS, et al. Interleukin 2 receptor antagonists for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;(1):CD003897.

67. Nashan B, Moore R, Amlot P, Schmidt AG, Abeywickrama K, Soullillou JP. Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. CHIB 201 International Study Group. *Lancet Lond Engl.* 1997 Oct 25;350(9086):1193–8.
68. 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. United States Simulect Renal Study Group. *Transplantation.* 1999 Jan 27;67(2):276–84.
69. Gomes AM, Pedroso S, Martins LS, Malheiro J, Viscayno JR, Santos J, et al. Diagnosis and treatment of acute humoral kidney allograft rejection. *Transplant Proc.* 2009 Apr;41(3):855–8.
70. Buttigieg J, Julie BM, Sharma A, Halawa A. Induction Immunosuppression in High-risk Kidney Transplant Recipients. *Exp Clin Transplant Off J Middle East Soc Organ Transplant.* 2016 Aug;14(4):367–76.
71. Vo AA, Choi J, Cisneros K, Reinsmoen N, Haas M, Ge S, et al. Benefits of Rituximab Combined With Intravenous Immunoglobulin for Desensitization in Kidney Transplant Recipients: *Transplantation.* 2014 Aug;98(3):312–9.
72. Kirk AD, Hale DA, Mannon RB, Kleiner DE, Hoffmann SC, Kampen RL, et al. Results from a human renal allograft tolerance trial evaluating the humanized CD52-specific monoclonal antibody alemtuzumab (CAMPATH-1H). *Transplantation.* 2003 Jul 15;76(1):120–9.
73. Tzakis AG, Tryphonopoulos P, Kato T, Nishida S, Levi DM, Madariaga JR, et al. Preliminary experience with alemtuzumab (Campath-1H) and low-dose tacrolimus immunosuppression in adult liver transplantation. *Transplantation.* 2004 Apr 27;77(8):1209–14.
74. Stegall MD, Gloor J, Winters JL, Moore SB, Degoey S. A comparison of plasmapheresis versus high-dose IVIG desensitization in renal allograft recipients with high levels of donor specific alloantibody. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2006 Feb;6(2):346–51.
75. Brennan DC, Flavin K, Lowell JA, Howard TK, Shenoy S, Burgess S, et al. A randomized, double-blinded comparison of Thymoglobulin versus Atgam for induction immunosuppressive therapy in adult renal transplant recipients. *Transplantation.* 1999 Apr 15;67(7):1011–8.
76. Pappenheimer AM. Experimental studies upon lymphocytes: The action of immune sera upon lymphocytes and small thymus cells. *J Exp Med.* 1917 Aug 1;26(2):163–79.
77. Woodruff MFA, Anderson NA. Effect of Lymphocyte Depletion by Thoracic Duct Fistula and Administration of Antilymphocytic Serum on the Survival of Skin Homografts in Rats. *Nature.* 1963 Nov 16;200(4907):702–702.

78. Taylor HE, Ackman CF, Horowitz I. Canadian clinical trial of antilymphocyte globulin in human cadaver renal transplantation. *Can Med Assoc J.* 1976 Dec 18;115(12):1205–8.
79. Kreis H, Mansouri R, Descamps JM, Dandavino R, N’Guyen AT, Bach JF, et al. Antithymocyte globulin in cadaver kidney transplantation: a randomized trial based on T-cell monitoring. *Kidney Int.* 1981 Mar;19(3):438–44.
80. Mueller TF. Mechanisms of Action of Thymoglobulin: Transplantation. 2007 Dec;84(Supplement):S5–10.
81. Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood.* 1998 Apr 1;91(7):2360–8.
82. Michallet M-C, Preville X, Flacher M, Fournel S, Genestier L, Revillard J-P. Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins1: Transplantation. 2003 Mar;75(5):657–62.
83. Préville X, Flacher M, LeMauff B, Beauchard S, Davelu P, Tiollier J, et al. Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation.* 2001 Feb 15;71(3):460–8.
84. Mourad G, Morelon E, Noël C, Glotz D, Lebranchu Y. The role of Thymoglobulin induction in kidney transplantation: an update. *Clin Transplant.* 2012 Oct;26(5):E450-464.
85. Bächler K, Amico P, Hönger G, Biemann D, Hopfer H, Mihatsch MJ, et al. Efficacy of induction therapy with ATG and intravenous immunoglobulins in patients with low-level donor-specific HLA-antibodies. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2010 May;10(5):1254–62.
86. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003 Mar;3(3):199–210.
87. Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol.* 2005 Aug;24(3–4):211–26.
88. Salama AD. Regulatory CD25+ T Cells in Human Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jun 1;14(6):1643–51.
89. Lopez M. A Novel Mechanism of Action for Anti-Thymocyte Globulin: Induction of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Sep 7;17(10):2844–53.
90. LaCorcia G, Swistak M, Lawendowski C, Duan S, Weeden T, Nahill S, et al. Polyclonal Rabbit Antithymocyte Globulin Exhibits Consistent Immunosuppressive Capabilities Beyond Cell Depletion: Transplantation. 2009 Apr;87(7):966–74.

91. Guttman RD, Caudrelier P, Alberici G, Touraine JL. Pharmacokinetics, foreign protein immune response, cytokine release, and lymphocyte subsets in patients receiving thymoglobuline and immunosuppression. *Transplant Proc.* 1997 Nov;29(7A):24S–26S.
92. Beiras-Fernandez A, Thein E, Chappel D, Gallego R, Fernandez-Roel D, Kemming G, et al. Polyclonal anti-thymocyte globulins influence apoptosis in reperfused tissues after ischaemia in a non-human primate model. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant.* 2004 Sep;17(8):453–7.
93. Lebranchu Y, Bridoux F, Büchler M, Le Meur Y, Etienne I, Toupance O, et al. Immunoprophylaxis with basiliximab compared with antithymocyte globulin in renal transplant patients receiving MMF-containing triple therapy. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2002 Jan;2(1):48–56.
94. Mourad G, Garrigue V, Squifflet JP, Besse T, Berthoux F, Alamartine E, et al. Induction versus noninduction in renal transplant recipients with tacrolimus-based immunosuppression. *Transplantation.* 2001 Sep 27;72(6):1050–5.
95. Issa NC, Fishman JA. Infectious complications of antilymphocyte therapies in solid organ transplantation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2009 Mar 15;48(6):772–86.
96. Ducloux D, Carron P-L, Motte G, Ab A, Rebibou J-M, Bresson-Vautrin C, et al. Lymphocyte subsets and assessment of cancer risk in renal transplant recipients. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant.* 2002 Sep;15(8):393–6.
97. Glowacki F, Al Morabiti M, Lionet A, Labalette M, Provot F, Noel C, et al. Long-term kinetics of a T-lymphocytes subset in kidney transplant recipients: relationship with posttransplant malignancies. *Transplant Proc.* 2009 Oct;41(8):3323–5.
98. Kew CE, Lopez-Ben R, Smith JK, Robbin ML, Cook WJ, Gaston RS, et al. Posttransplant lymphoproliferative disorder localized near the allograft in renal transplantation. *Transplantation.* 2000 Mar 15;69(5):809–14.
99. Winkelhorst JT, Brokelman WJ, Tiggeler RG, Wobbles T. Incidence and clinical course of de-novo malignancies in renal allograft recipients. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol.* 2001 Jun;27(4):409–13.
100. Ondrus D, Pribylincová V, Breza J, Bujdák P, Miklosi M, Rezníček J, et al. The incidence of tumours in renal transplant recipients with long-term immunosuppressive therapy. *Int Urol Nephrol.* 1999;31(4):417–22.
101. Jain AB, Yee LD, Nalesnik MA, Youk A, Marsh G, Reyes J, et al. Comparative incidence of de novo nonlymphoid malignancies after liver transplantation under tacrolimus using surveillance epidemiologic end result data. *Transplantation.* 1998 Nov 15;66(9):1193–200.

102. Penn I. Posttransplantation de novo tumors in liver allograft recipients. *Liver Transplant Surg Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 1996 Jan;2(1):52–9.
103. Mihalov ML, Gattuso P, Abraham K, Holmes EW, Reddy V. Incidence of post-transplant malignancy among 674 solid-organ-transplant recipients at a single center. *Clin Transplant.* 1996 Jun;10(3):248–55.
104. Barrett WL, First MR, Aron BS, Penn I. Clinical course of malignancies in renal transplant recipients. *Cancer.* 1993 Oct 1;72(7):2186–9.
105. Opelz G, Henderson R. Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients. *Lancet Lond Engl.* 1993 Dec 18;342(8886–8887):1514–6.
106. Winter P, Schoeneich G, Miersch WD, Klehr HU. Tumour induction as a consequence of immunosuppression after renal transplantation. *Int Urol Nephrol.* 1997;29(6):701–9.
107. Jamil B, Nicholls K, Becker GJ, Walker RG. Impact of acute rejection therapy on infections and malignancies in renal transplant recipients: *Transplantation.* 1999 Nov;68(10):1597–603.
108. Bustami RT, Ojo AO, Wolfe RA, Merion RM, Bennett WM, McDiarmid SV, et al. Immunosuppression and the risk of post-transplant malignancy among cadaveric first kidney transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2004 Jan;4(1):87–93.
109. Massberg S, Messmer K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc.* 1998 Dec;30(8):4217–23.
110. Rabb H, Daniels F, O'Donnell M, Haq M, Saba SR, Keane W, et al. Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Sep;279(3):F525–531.
111. Yokota N, Daniels F, Crosson J, Rabb H. Protective effect of T cell depletion in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation.* 2002 Sep 27;74(6):759–63.
112. De Greef KE, Ysebaert DK, Dauwe S, Persy V, Vercauteren SR, Mey D, et al. Anti-B7-1 blocks mononuclear cell adherence in vasa recta after ischemia. *Kidney Int.* 2001 Oct;60(4):1415–27.
113. Bogetti D, Sankary HN, Jarzembowski TM, Manzelli A, Knight PS, Thielke J, et al. Thymoglobulin induction protects liver allografts from ischemia/reperfusion injury. *Clin Transplant.* 2005 Aug;19(4):507–11.
114. Goggins WC, Pascual MA, Powelson JA, Magee C, Tolkoff-Rubin N, Farrell ML, et al. A prospective, randomized, clinical trial of intraoperative versus postoperative thymoglobulin in adult cadaveric renal transplant recipients: *Transplantation.* 2003 Sep;76(5):798–802.

115. Gjertson DW. Determinants of long-term survival of adult kidney transplants: a 1999 UNOS update. *Clin Transpl.* 1999;341–52.
116. Hariharan S. Long-term kidney transplant survival. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 2001 Dec;38(6 Suppl 6):S44-50.
117. Lindholm A, Ohlman S, Albrechtsen D, Tufveson G, Persson H, Persson NH. The impact of acute rejection episodes on long-term graft function and outcome in 1347 primary renal transplants treated by 3 cyclosporine regimens. *Transplantation.* 1993 Aug;56(2):307–15.
118. Kamel MH, Mohan P, Little DM, Awan A, Hickey DP. Rabbit antithymocyte globulin as induction immunotherapy for pediatric deceased donor kidney transplantation. *J Urol.* 2005 Aug;174(2):703–7.
119. Cosimi AB, Wortis HH, Delmonico FL, Russell PS. Randomized clinical trial of antithymocyte globulin in cadaver renal allograft recipients: importance of T cell monitoring. *Surgery.* 1976 Aug;80(2):155–63.
120. Padiyar A, Augustine JJ, Hricik DE. Induction Antibody Therapy in Kidney Transplantation. *Am J Kidney Dis.* 2009 Nov;54(5):935–44.
121. Clark KR, Forsythe JL, Shenton BK, Lennard TW, Proud G, Taylor RM. Administration of ATG according to the absolute T lymphocyte count during therapy for steroid-resistant rejection. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant.* 1993 Jan;6(1):18–21.
122. Grandtnerová B, Mociková H, Kohutová M. CD2+, CD3+, and CD19+ depletion after a course of antithymocyte globulin for a steroid-resistant rejection. *Transplant Proc.* 1997 Nov;29(7):2958–9.
123. Franco A, Álvarez L, Gimeno A, Sen ML, Muñoz C, Sánchez-Paya J, et al. Study of the correlation between two methods used to monitor thymoglobulin therapy in renal transplantation. *Transplant Proc.* 2003 Aug;35(5):1778–9.
124. Clark K. Monitoring antithymocyte globulin in renal transplantation. *Ann R Coll Surg Engl.* 1996 Nov;78(6):536–40.

7. Artigo

Monitoring therapy with polyclonal anti T lymphocyte antibodies in renal transplantation. CD3⁺ T cell and total lymphocyte counts in the peripheral blood.

Fabiani Palagi Machado MD^{1,2}

Alessandra Rosa Vicari RN¹

Fábio Spuldaro MD¹

João Batista Saldanha de Castro Filho MD¹

Roberto Ceratti Manfro MD, Ph.D^{1,2,3}

¹ Renal Transplant Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brazil.

² Medical Sciences Graduate Program. Federal University of Rio Grande do Sul, School of Medicine.

³ Corresponding author

Corresponding author

Roberto C. Manfro MD, PhD

Division of Nephrology, Renal Transplant Unit

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Federal University of Rio Grande do Sul

2350 Ramiro Barcelos Street, Room 2030

Porto Alegre, RS. Brazil. Zip code: 90035903

rmanfro@hcpa.edu.br

Authorship page:

Fabiani Palagi Machado, MD. Participated in study's design, data collection, analysis and writing

Alessandra R. Vicari, RN. Participated in data collection, analysis and writing

Fabio Spuldaro, MD. Participated in data collection and writing

João B. S. de Castro Filho, MD. Participated in data collection and writing

Roberto C. Manfro, MD, Ph.D. Participated in study's design, data analysis and writing

The authors declare no conflict of interest

No funding

Abbreviations:

APKD, adult polycystic kidney disease

ATG, anti-thymocyte globulin

CIT, cold ischemia time

CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

DGF, delayed graft function

DSA, donor specific antibodies

ECD, extended criteria donors

PRA, panel reactive antibodies

ROC, receiver operating characteristic

Monitoring therapy with polyclonal anti T lymphocyte antibodies in renal transplantation. CD3⁺ T cell and total lymphocyte counts in the peripheral blood.

Machado FP, Spuldaro F, Vicari AR, Filho JB, Manfro RC

Clin Transplant

Abstract

Background: Anti-thymocyte globulin (ATG) is largely utilized in organ transplantation. We evaluated the monitoring of this agent in renal transplant recipients by counting total lymphocytes and CD3⁺ T cells in the peripheral blood and evaluated the correlation between these measurements.

Methods: Single center, retrospective study evaluating 226 patients who received a kidney graft between 2008 and 2013 and where treated with ATG either for induction therapy or for treatment of cellular rejection. ATG doses were administered according to CD3⁺ T cells levels or number of total lymphocytes in the peripheral blood.

Results: A total of 664 paired samples were analyzed. The Spearman's correlation coefficient between the results was 0.416 (P <0.001) to all samples. The Kappa's concordance coefficient between samples was 0.267 (P<0.001) to all samples. The diagnostic parameters for the total lymphocyte counting were calculated using number of CD3⁺ T cells as the gold standard at the cut off at > 20 cells/mm³.

Conclusion: Based on these results it is not possible to reliably replace the counting of CD3⁺ T cells by lymphocytes in the peripheral blood in the monitoring of ATG administration.

Key words: Antithymocyte globulin, ATG, immunosuppression, T lymphocytes, CD3⁺ T lymphocytes, monitoring, kidney transplantation.

Introduction

Renal transplantation is currently the treatment of choice for adequately selected patients with end-stage kidney disease. Transplantation improves the quality of life and reduces mortality, as compared to chronic maintenance dialysis. In the last decades advances in immunosuppressive therapy, better diagnostic and therapeutic methods and better surgical techniques improved survival of patients and grafts as well as long-term graft function, turning transplantation into a cost-effective treatment (1). A better understanding of the immunological basis of the allograft response has made clear that T lymphocytes are a key component of the acute cellular rejection process (2). Currently immunosuppressive therapy is effective in controlling T cell response to the allograft and, at the initial course of the transplant, antibody depletion therapy is largely utilized particularly in patients with high immunological risk. Moreover, these agents are also utilized to treat patients with severe forms of acute rejection (3).

Anti thymocyte globulin (ATG) has been used in the last two decades for the prophylaxis and treatment of acute allograft rejection (4,5). Its use is associated with a significantly lower incidence of delayed graft function, better early allograft function and a reduction in length of hospital stay (6). ATG is a polyclonal anti-lymphocyte agent consisting of a wide variety of antibodies, specific for T-cell epitopes, that induces rapid and profound depletion of CD3⁺ T lymphocytes in the peripheral blood (7). Initially the widespread use of doses adjusted only by body weight and occurrence of side effects frequently led to states of over immunosuppression. Latter, strategies of monitoring were developed in order to minimize side effects and costs while maintaining efficacy. Currently, the proposed monitoring tool is to follow the number of peripheral blood lymphocytes which can be accomplished by simply counting total lymphocytes in the peripheral white blood cells or by counting CD3⁺ T cells in this

same compartment (8,9). The first strategy has the unequivocal advantage of being very simple and inexpensive while the second one has being proposed as more accurate (10). The present study was conceived in order to evaluate whether peripheral blood lymphocyte counting would be comparable to CD3⁺ T cell counting as a monitoring strategy for ATG dosing.

Patients and Methods

Patients

Six hundred and sixty-seven isolated kidney transplants in adult recipients were performed in our institution between January 2008 and December 2013. Among them 526 (78.9%) patients received organs from deceased donors and 141 (21.1%) from living donors. At least two doses of polyclonal T cell depleting antibodies were used in the induction regimen in 201 (30.1%) patients and 25 (3.7%) patients received this agent for treatment of severe acute rejection. We excluded from analysis patients who died within 24 hours after transplantation, those who used less than 2 doses of ATG and recipients younger than 18 years-old. Patients with high immunological risk received ATG induction consisting of four doses of 1.5 mg/kg. For the other indications ATG induction was given until the patient reached a 2.5 mg/dL serum creatinine or up to 4 doses, whichever came first. Tacrolimus was initiated in the day that the patient received the last ATG dose. The first ATG dose was given intra-operatively and subsequent doses were given according to the number of CD3⁺ T cells whenever their counts were > 20 cells/mm³. Treatment of rejection with ATG was made at a 1.5 mg/kg/dose and subsequent doses were given according to CD3⁺ T counts in order to cover a period of 7-14 days, depending on the severity of rejection and functional graft

response to treatment. Leukocytes and CD3⁺ T cells were counted daily. All recipients received corticosteroids, sodium mycophenolate and a calcineurin inhibitor, predominantly tacrolimus. Indications for ATG induction were: (a) immunological risk (calculated panel reactive antibodies [PRA] > 50), (b) presence of donor specific antibodies (DSA) by Luminex® platform, (c) donor acute renal failure with final serum creatinine \geq 2.0 mg/dL and (d) cold ischemia time (CIT) > 24 hours. Indications for therapeutic ATG were steroid-resistant rejection and acute cellular rejection \geq Banff 2A. Monitoring of ATG modulating effect was performed according to CD3⁺ T cell counts and/or total lymphocyte counts in the peripheral blood.

The study was approved by the hospital's research and ethics committee.

Methods

The absolute number of peripheral lymphocytes was made in white blood cell counts by an automated method (Sysmex XE-5000, Sysmex Corporation, Japan) according to manufacturer's instructions. Peripheral CD3⁺ T cells were accessed by flow cytometry (FACS Canto II, BD Bioscience, USA) by using anti CD45 monoclonal antibodies (anti-CD45 FITC-conjugated, BD Bioscience, Beckman Coulter, Exbio) and anti-CD3 monoclonal antibodies (anti-CD3 PE-conjugated, BD Bioscience, Beckman Coulter, Exbio). Shortly 4 mL of peripheral blood was drawn in EDTA containing tubes, cells were coated with the antibodies above, acquired in the cytometer up to 200.000 events and analyzed by the Infinicyt software (Cytognos SL, Spain). CD3⁺ T lymphocytes were identified by the CD45^{hi}/CD3⁺ phenotype. The percentage of CD3⁺ cells was calculated based on the measured number of leukocytes (CD45⁺ cells).

Statistical analyzes

Descriptive analyzes of frequency and demographics are presented as means \pm standard deviation, medians or percentages. Variables were analyzed by using the SAS (version 9.4) and SPSS (version 18) softwares. Data analysis was performed by Spearman's correlation coefficient and Kappa concordance coefficient. A receiver operator characteristics (ROC) curve was generated for the analysis of diagnostic parameters. Survival curves were obtained by the Kaplan Meier estimates method. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Demographic and transplant related characteristics are show in Table 1. ATG was given prophylactically to 201 patients and for treatment of acute rejection in another 25 recipients of kidney grafts. Recipients were middle aged, equally balanced between males and females, predominantly caucasians and the majority received grafts from deceased donors. The number of patients that received prophylactic ATG according to each indication was: (a) 158 patients (78.6%) for high immunologic risk patients (high PRA or presence of DSA or positive flow cytometry cross-match); (b) 40 patients (19.9%) with cold ischemia time > 24 hours and (c) 3 patients (1.5%) that received grafts from donors with acute renal failure. Therapeutic ATG was given for treatment of Banff $\geq 2A$ in 13 patients (52%) and for treatment of steroid resistant rejection in 12 patients (48%).

Mean prophylactic ATG cumulative dose administered was 5.6 ± 1.3 mg/kg and the mean therapeutic cumulative dose was 7.2 ± 3.4 mg/kg and the per patient cumulative dose, for all patients, was 5.8 ± 1.7 mg/kg. Seven patients (3.1%) received

two ATG doses, three doses were given to 52 patients (23%), 4 doses to 113 (50%) and 5 or more doses were given to 54 patients (23.9%).

Paired samples of total lymphocytes and CD3⁺ T cells were available in 664 samples drawn from 226 kidney transplant recipients that received ATG either for induction or for treatment of acute rejection. The correlation between total lymphocytes and CD3⁺ T cells is illustrated in Figure 1. The Spearman's correlation coefficient between the results was 0.41 ($P < 0.001$) for all samples, 0.43 ($P < 0.001$) for induction therapy samples and 0.28 ($P < 0.005$) for the samples from patients who received therapeutic ATG. The Kappa's concordance coefficient between samples was 0.27 ($P < 0.001$) for all samples, 0.28 ($P < 0.001$) for samples who received ATG as induction therapy, and 0.15 ($P = 0.081$) for who received therapeutic ATG. The best cut-off in number of lymphocytes obtained in the ROC curve was 256, with a sensibility of 66.8% and specificity of 66.9%, AUC: 0.71; 95% (95% CI: 0.67 - 0.75). Increased sensitivity and negative predictive values were obtained by reducing the number of peripheral lymphocytes that would correlate with a number of CD3⁺ T cells < 20 cells/mm³. However, this was associated with substantial drop of accuracy as shown in Table 3 for different cut-offs of peripheral lymphocytes numbers.

No patients were diagnosed with acute rejection during prophylactic ATG administration. After ending the ATG course acute rejection occurred in 39 patients (19.4%) who received it as induction therapy. There were 23 cellular rejections, 14 were antibody-mediated acute rejections and 2 were mixed rejections. Ten patients presented a second rejection episode and 2 patients rejected 3 times. In all patients with repeated rejections ATG was given for high immunological risk.

Overall patients and grafts survivals are shown in Figure 2. At one year after transplantation survivals were 98.7% and 97.8% and at 5 years 88.8% and 87.4%,

respectively for patients and grafts. Patient's survivals according to ATG indication are shown in Figure 3. At one year after transplantation patient's survivals were 98.5% and 100% and at 5 years 89.2% and 87.4%, respectively for induction and therapeutic indications of ATG. Graft survivals according to ATG indication are displayed in Figure 4. At one year after transplantation grafts survivals were 97.5% and 100 % and at 5 years 88.2% and 81.7%, respectively for induction and therapeutic indications of ATG. Functional graft parameters, according to ATG indication, at six and twelve months after transplantation are shown in Table 2. At both time points CKD-EPI estimated glomerular filtration rate (eGFR), for either indication of ATG, improved slightly. For patients with acute rejection median serum creatinine at ATG initiation was 2.9 mg/dl (P 25-75: 2.0 - 6.3), reached a peak of 3.4 mg/dl (P 25-75: 2.5 – 7.4) during treatment and dropped to 2.4 mg/dL (P 25-75: 1.7 – 4.0) at the end of the ATG course.

Discussion

In this retrospective uncontrolled cohort study in which the monitoring methods for anti-T cell polyclonal antibodies dosing were evaluated a poor correlation between the number of CD3⁺ T cells and total lymphocyte counts was observed, leading to the conclusion that, for such purpose, the flow cytometric assay is preferable to the lymphocyte counting in the peripheral blood.

Polyclonal anti-T cell antibodies have been used in transplant recipients for decades both as a part of induction regimens and for the treatment of acute rejection episodes (11,12). The goal of induction therapy is to suppress cellular and humoral responses preventing acute rejection episodes. Rabbit anti-thymocyte globulin, IL-2 receptor blockers, and anti-CD-52 monoclonal antibodies are the most commonly used antibodies for induction in organ transplant recipients. Currently around 80% of the

transplant centers in the United States practice antibody induction therapy predominantly with polyclonal anti-T cell antibodies (13). Basically, these are xeno proteins produced by the injection of human thymocytes, lymphoblasts or lymphocytes in animals, usually rabbits, from which purified immunoglobulins are obtained (14). These preparations can be used as a strategy for nearly all patients or be individualized for those with high immunological risk, prolonged cold ischemia time or in those recipients whose donors kidneys were acutely injured, avoiding early use of calcineurin inhibitors in this last cohort of patients (15,16). These agents are also used for the treatment of acute graft rejection, either as a primary treatment, or a rescue for steroid-resistant rejections (17). Important benefits may be obtained with ATG in renal transplantation including low rejection rates, better graft survival and function and possibly the facilitation of developing of CD4⁺/CD25⁺/FOXP3⁺ regulatory T cells which are implicated in suppression mechanisms and better graft acceptance (18,19). A large scale analysis has recently show that antibody induction appears to provide substantial advantages in both costs and outcomes after kidney transplantation and ATG seems to be the agent with the greatest benefit (20). By the other side the use of these preparations of antibodies may lead to states of excessive immunosuppression that can facilitate the occurrence of opportunistic infections and neoplastic disorders (21,22).

Considering ATG use and taking in consideration its biological effects strategies that, instead of using fixed doses, would pursue lower patient's exposure while keeping efficacy were developed. That lead to the use in variable dosing intervals, according to the biological effects on T cells (23–26). This strategy was first proposed decades ago by Cosimi et al to improve the efficacy of treatment and has being followed as a standard of care (27). Currently monitoring is based in counting CD3⁺ T cells in the peripheral blood which seems to be best accomplished by flow cytometric techniques

(28,29). However, this method is not available in many transplant centers, and the counting of peripheral blood lymphocytes has been used as an alternative monitoring tool of therapy with polyclonal anti T cell antibodies (30).

Previous studies aiming at evaluate the correlation between CD3⁺ T cells and total peripheral lymphocytes counts are available in the literature (31,32). The cut-offs of CD3⁺ T cells and total lymphocytes counts for studying the association were variable, although most used twenty CD3⁺ T cells cells/mm³ by flow cytometry and two hundred cells/mm³ peripheral lymphocytes (33).

Buchler et al performed a retrospective analysis of 302 patients to evaluate the occurrence of cellular graft rejection. They found that all 91 cases with rejection were associated with CD3⁺ T > 20 cells/mm³. In a small sample they found a high concordance level between peripheral blood lymphocytes < 200 cells/mm³ and CD3⁺ T < 20 cells/mm³ (34). Franco et al evaluated 298 samples from 24 kidney transplant recipients who received ATG either for induction or treatment of acute rejection. The cut-off values were 10 CD3⁺ T cells/mm³ and peripheral blood lymphocytes < 100 cells/mm³. They only found a significant correlation at days 5 and 15 of ATG administration. Therefore they report a significant discrepancy between the methods (35). Ata et al evaluated two groups of patients to monitor the use of ATG for induction in renal transplantation based on the quantification of total lymphocytes and CD3⁺ T cells. In the first group the authors found higher instability of immunomodulation reflecting the need for higher doses of ATG, implying in higher costs. There was no difference in the incidence of rejection or infection between the groups in the first three months post-transplantation. These authors argue that the ATG monitoring by CD3⁺ T cells count is cost-effective and that there is no correlation between total lymphocyte cells and CD3⁺ T cells (36).

In the present study, we reported on 226 kidney transplant recipients that received polyclonal anti-T cell antibodies either for prevention or treatment of rejection. In this cohort 664 paired samples were evaluated by flow cytometry and by lymphocyte counting in the peripheral blood. The correlation and concordance indexes resulted weak despite statistical significance. Most importantly, as maintaining the counts of CD3⁺ T cells below 20 cells/mm³ is the usual standard of care, the parameters obtained by the cut-off of 200 cells/mm³ in the peripheral blood were marked by a low specificity and positive predictive values, meaning that many patients would be misclassified in terms of modulation of CD3⁺ T cells. The best cut-off in the ROC curve reached parameters of sensitivity and specificity of 66%. Decreasing the lymphocyte cut-off value increases sensitivity and negative predictive value at a substantial loss of specificity and positive predictive value. With this increased false positive rate, increasing therapy to those who do not need, could possibly lead to a higher incidence of significant side effects.

These results indicate that monitoring efficacy of total peripheral lymphocyte depletion by ATG may not be adequate and that flow cytometric counting of CD3⁺ T cells, should be employed. When and where flow cytometry is not available clinicians must decide on how to tip the balance between infections and rejections, either risking giving ATG to patients that are modulated, by decreasing the lymphocyte cut-off or risking not given it to patients that are not modulated by increasing the lymphocyte cut-off.

The present work has weaknesses that include its retrospective design, single center, a low number of samples obtained in patients treating rejection and the absence of baseline measurements of CD3⁺ T cells, previous to anti-T cell antibody administration. However, we believe that our findings are relevant to clinical practice

and that CD3⁺ T cells measured by flow cytometry should be the method of preference for monitoring polyclonal anti-T cell antibody administration.

Finally, based upon our results, we believe it is not appropriate to replace flow cytometric CD3⁺ T cells counting by counting of lymphocytes in peripheral blood in the monitoring and interval dose guidance of anti-T cell polyclonal antibodies used for prevention or treatment of acute rejection of kidney allografts.

References

1. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N. Engl. J. Med* 2010; 363: 1451–1462.
2. Kirk, AD. Induction Immunosuppression. *Transplantation* 2006; 82: 593–602.
3. Halloran PF. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med* 2004; 351: 2715–2729.
4. Deeks ED, Keating GM. Rabbit Antithymocyte Globulin (Thymoglobulin®): A Review of its Use in the Prevention and Treatment of Acute Renal Allograft Rejection. *Drugs* 2009; 69: 1483–1512.
5. Mueller TF. Mechanisms of Action of Thymoglobulin. *Transplantation* 2007; 84: S5–S10.
6. Goggins WC, Pascual MA, Powelson JA, et al. A prospective, randomized, clinical trial of intraoperative versus postoperative thymoglobulin in adult cadaveric renal transplant recipients I. *Transplantation* 2003; 76: 798–802.
7. Naesens M, Berger S, Biancone L, et al. Lymphocyte-depleting induction and steroid minimization after kidney transplantation: A review. *Nefrol.* 2016; 36: 469-480.
8. Büchler M, Longuet H, Lemoine R, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of two different rabbit antithymocyte globulin dosing regimens: Results of a randomized trial. *Transpl. Immunol* 2013; 28: 120–126.
9. Müller TF, Grebe SO, Neumann MC, et al. Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies. *Transplantation* 1997; 64: 1432–1437.
10. Shenton BK, Manas D, Dark JH, et al. Immune monitoring of anti-thymocyte globulin (ATG) treatment in transplant patients. *Clin. Appl. Immunol. Rev* 2001; 1: 347–371.
11. Beiras-Fernandez A, Thein E, Hammer C. Induction of immunosuppression with polyclonal antithymocyte globulins: an overview. *Exp. Clin. Transplant.* 2003; 1: 79–84.
12. Meier-Kriesche H, Li S, Gruessner RW, et al. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. *Am. J. Transplant.* 2006; 6: 1111–1131.
13. Padiyar A, Augustine JJ, Hricik DE. Induction Antibody Therapy in Kidney Transplantation. *Am. J. Kidney Dis* 2009; 54: 935–944.

14. Bishop G, Cosimi AB, Voynow NK, et al Effect of immunosuppressive therapy for renal allografts on the number of circulating sheep red blood cells rosetting cells. *Transplantation* 1975; 20: 123–129.
15. Buttigieg J, Julie BM, Sharma A, Halawa A. Induction Immunosuppression in High-risk Kidney Transplant Recipients. *Exp. Clin. Transplant.* 2016; 14: 367–376.
16. Wang CJ, Tuffaha A, Zhang D, et al. A CD3+ count-based thymoglobulin induction regimen permits delayed introduction of calcineurin inhibitors in kidney transplantation. *Clin. Transplant* 2012; 26: 900–909.
17. Thomas F, Cunningham P, Thomas J, et al. Superior renal allograft survival and decreased rejection with early high-dose and sequential multi-species antilymphocyte globulin therapy. *Transplant. Proc* 1987; 19: 1874–1878.
18. Broady R, Yu J, Levings MK. ATG-induced expression of FOXP3 in human CD4+ T cells in vitro is associated with T-cell activation and not the induction of FOXP3+ T regulatory cells. *Blood* 2009; 114: 5003–5006.
19. Lopez MA. Novel Mechanism of Action for Anti-Thymocyte Globulin: Induction of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells. *J. Am. Soc. Nephrol* 2006; 17: 2844–2853.
20. Gharibi Z, Ayvaci MUS, Hahsler M, Giacoma T, Gaston RS, Tanriover B. Cost-Effectiveness of Antibody-Based Induction Therapy in Deceased Donor Kidney Transplantation in the United States: *Transplantation* 2017;101:1234–1241.
21. Alangaden GJ, Thyagarajan R. Gruber AS, et al. Infectious complications after kidney transplantation: current epidemiology and associated risk factors. *Clin. Transplant* 2006; 20: 401–409.
22. Doycheva I, Amer S, Watt KD. De Novo Malignancies After Transplantation: Risk and Surveillance Strategies. *Med. Clin. North Am* 2016; 100: 551–567.
23. Clark KR, Forsythe JL, Shenton BK, et al. Administration of ATG according to the absolute T lymphocyte count during therapy for steroid-resistant rejection. *Transpl.* 1993; 6: 18–21.
24. Abouna GM, al-Abdullah IH, Kelly-Sullivan D, et al. Randomized clinical trial of antithymocyte globulin induction in renal transplantation comparing a fixed daily dose with dose adjustment according to T cell monitoring. *Transplantation* 1995; 59: 1564–1568.
25. Clark KR, Forsythe JL, Shenton BK, et al. Flow-cytometric monitoring of ATG therapy for steroid-resistant rejection. *Transplant. Proc* 1992; 24: 315.
26. Krasinskas AM, Kreisel D, Acker MA, et al. CD3 monitoring of antithymocyte globulin therapy in thoracic organ transplantation. *Transplantation* 2002; 73: 1339–1341.

27. Cosimi AB, Wortis HH, Delmonico FL, Russell OS. Randomized clinical trial of antithymocyte globulin in cadaver renal allograft recipients: importance of T cell monitoring. *Surgery* 1976; 80: 155–163.
28. Peddi VR, Bryant M, Roy-Chaudhury P, Woodle ES, First MR. Safety, efficacy, and cost analysis of thymoglobulin induction therapy with intermittent dosing based on CD3+ lymphocyte counts in kidney and kidney-pancreas transplant recipients. *Transplantation* 2002; 73: 1514–1518.
29. Uber WE, Uber LA, VanBakel AB, et al. CD3 monitoring and thymoglobulin therapy in cardiac transplantation: Clinical outcomes and pharmacoeconomic implications. *Transplant. Proc* 2004; 36: 3245–3249.
30. Gorrie M, Thomson G, Lewis DM, et al. Dose titration during anti-thymocyte globulin therapy: monitoring by CD3 count or total lymphocyte count? *Clin. Lab. Haematol* 1997; 19: 53–56.
31. Djamali A, Turc-Baron C, Portales P, et al. Low dose antithymocyte globulins in renal transplantation: daily versus intermittent administration based on T-cell monitoring. *Transplantation* 2000; 69: 799–805.
32. Clark, K. Monitoring antithymocyte globulin in renal transplantation. *Ann. R. Coll. Surg. Engl* 1996; 78: 536–540.
33. Mourad G, Morelon E, Noël C, Glotz D, Lebranchu Y. The role of Thymoglobulin induction in kidney transplantation: an update. *Clin. Transplant* 2012; 26: E450-464.
34. Buchler M, Thibault G, al Najjar A, et al. Monitoring of ATG therapy by flow cytometry and lymphocyte counts in renal transplantation. *Transplant. Proc* 1996; 28: 2817–2818.
35. Franco A, Alvarez L, Gimeno A, et al. Study of the correlation between two methods used to monitor thymoglobulin therapy in renal transplantation. *Transplant. Proc* 2003; 35: 1778–1779.
36. Ata P, Kara M, Ozdemir E, et al. Monitoring of CD3+ T-Cell Count in Patients Receiving Antithymocyte Globulin Induction After Cadaveric Renal Transplantation. *Transplant. Proc* 2013; 45: 929–931.

Table 1. Demographic data of the recipients, donors and transplant variables

Recipients related variables	Results
Age (years, mean \pm SD)	46.3 \pm 13.5
Male gender (n, %)	115 (50.9)
Race	
White/not white (n, %)	179 (79.2) / 47 (20.8)
Primary kidney diseases (n, %)	
Hypertension	55 (24.3)
Diabetes mellitus	25 (11.1)
APKD	22 (9.8)
Glomerulonephritis	20 (8.9)
Obstructive uropathy and reflux	08 (3.5)
Others	08 (3.5)
Unknown	88 (38.9)
Donors related variables	
Donor (n, %)	
Deceased	192 (85)
Living	34 (15)
Donor age (years, mean \pm SD)	42.6 \pm 17.3
ECD (n, %)	83 (36.7)
HLA mismatches ABDR (mean \pm SD)	3.1 \pm 1.2
Transplant related variables	
Class I peak PRA (median P25-75)	23.5 (0 - 67)
Class II peak PRA (median P25-75)	18.5 (0 - 50.3)
Class I last PRA (median P25-75)	11.0 (0 - 55)
Class II last PRA (median P25-75)	5 (0 - 35.3)
Living donor compatibility (n, %)	
HLA identical	1 (2.9)
1 haplotype	29 (85.3)
0 haplotype	3 (8.9)
Unrelated (spouse)	1 (2.9)

APKD = adult polycystic kidney disease; ECD expanded criteria donors; PRA, panel reactive antibodies

Table 2. Renal graft function parameters according to ATG indication

Prophylactic use (N = 201)	Results	
	6 months	12 months
Serum creatinine (median P25 - 75)	1.4 (1.2 - 2.0)	1.4 (1.1 - 1.8)
Estimated CKD-EPI GFR (mean \pm SD)	49.7 \pm 23.7	54.3 \pm 24.6
PCR (median P25 - 75)	1.4 (1.2 - 2.0)	1.4 (1.1 - 1.8)

Therapeutic use (N=25)	Results	
	6 months	12 months
Serum creatinine (median P25 - 75)	1.6 (1.3 - 2.2)	1.6 (1.1 - 2.6)
Estimated CKD-EPI GFR (mean \pm SD)	45.4 \pm 17.4	47.4 \pm 21.3
PCR (median P25 - 75)	0.15 (0.1 - 0.5)	0.2 (0.1 - 0.5)

GFR, Glomerular Filtration Rate; CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration; PCR, protein-creatinine ratio

Table 3. Diagnostics parameters according to peripheral blood total lymphocyte counts.

LYMPHOCYTE CUT-OFF	SENSITIVITY	SPECIFICITY	PPV	NPV	ACCURACY
300	55.4%	73.4%	47.7%	79.0%	67.9%
256	66.8%	66.5%	46.6%	82.1%	66.6%
200	79.7%	53.5%	42.8%	85.8%	61.4%
150	89.6%	37.0%	38.3%	89.1%	53.0%
100	98.0%	19.7%	34.8%	95.8%	43.5%

PPV, positive predictive valor; NPV, negative predictive valor

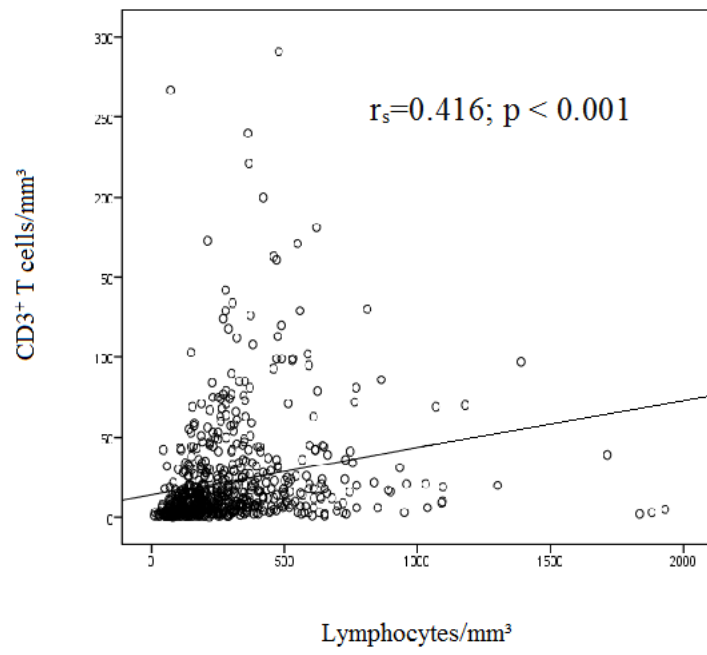
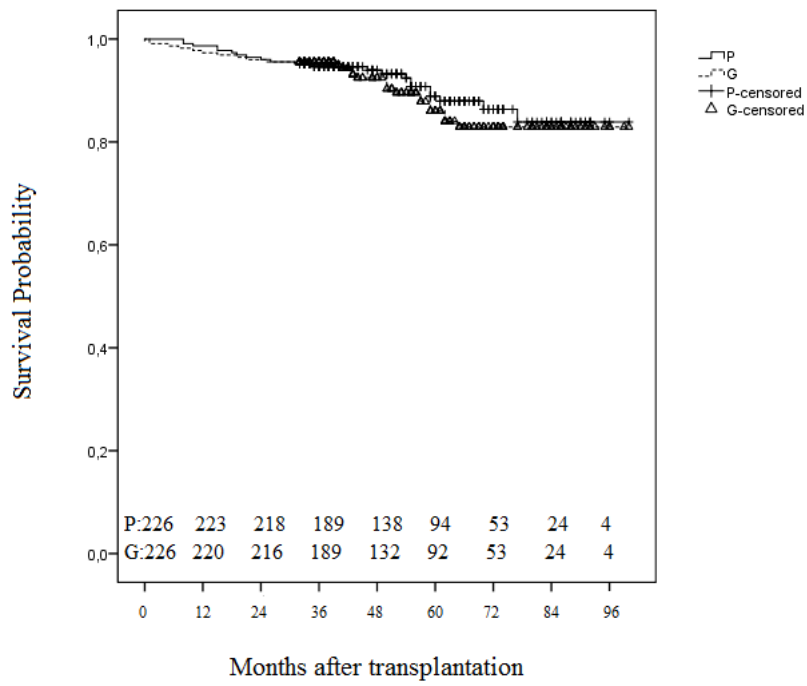
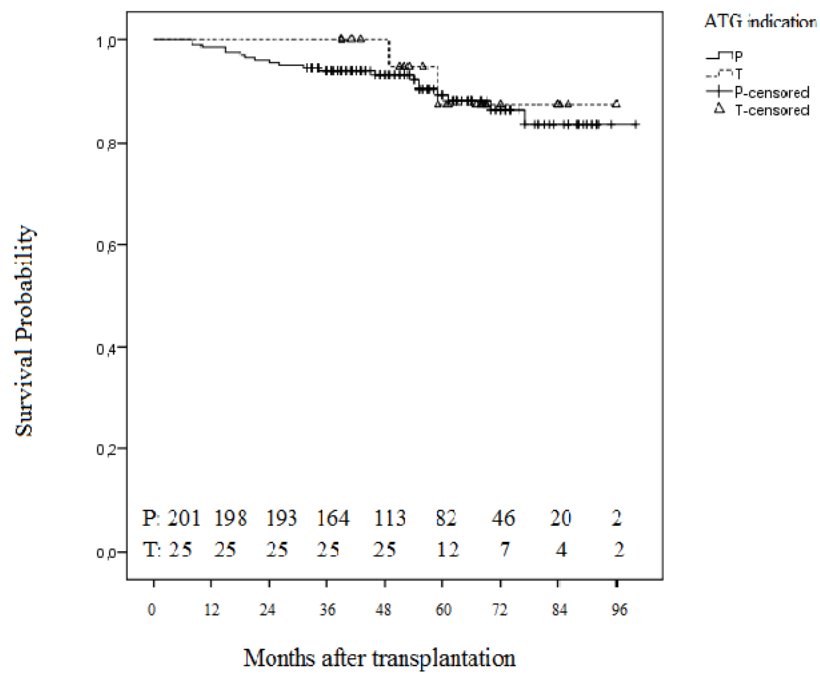
Figure 1

Figure 2



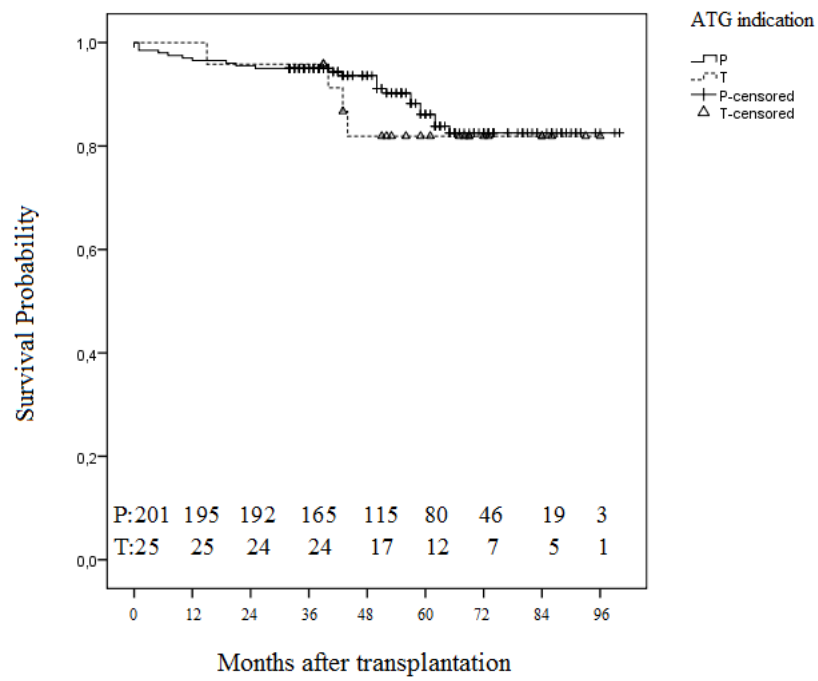
P, patient; G, graft

Figure 3



P, prophylactic; T, therapeutic

Figure 4



P, prophylactic; T, therapeutic

Legends to the figures

Figure 1. Correlation between CD3⁺ T cells and total lymphocyte cell counts.

Figure 2. Kaplan-Meier estimates of patient and graft survivals for all patients evaluated.

Figure 3. Kaplan-Meier estimates of patient survival according to ATG indication.

Figure 4. Kaplan-Meier estimates of graft survival according to ATG indication.