

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ITAMARA PEREIRA DANUCALOV

AVALIAÇÃO DE LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO ATRAVÉS DA
IMUNOHISTOQUÍMICA PARA CASPASE-3 EM ENXERTOS RENAIIS DE
DOADORES FALECIDOS

PORTO ALEGRE
2017

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

**AVALIAÇÃO DE LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO ATRAVÉS DA
IMUNOHISTOQUÍMICA PARA CASPASE-3 EM ENXERTOS RENAIIS DE
DOADORES FALECIDOS**

ITAMARA PEREIRA DANUCALOV

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

PORTO ALEGRE

2017

*“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas,
Que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos
Caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares
Fernando Pessoa*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente ao Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro por aceitar ser meu orientador nesse trabalho, pela disponibilidade e pela paciência.

Ao meu marido, Willian Ramos, pela paciência e por compreender a minha ausência em muitos momentos.

À minha querida amiga Danielle Mendes, que sempre me incentiva e me faz crer na minha capacidade.

À minha família, Mariângela Pereira, Margareth Costa, Iviamara Danucalov, Isamara Danucalov, por todo o apoio nessa jornada e confiança que tem em mim. A família Zanella dos Santos por me alegrar e pelo auxílio nas últimas tarefas.

À minha sogra, Carmen Ceccon, pela ajuda e por estar presente nesse processo.

Aos meus colegas Urologistas do Hospital Universitário Cajuru, pelo auxílio com a coleta de material.

Aos meus amigos Nefrologistas do Hospital Universitário Cajuru, por fazerem parte desse projeto comigo e por acreditarem em mim.

Aos amigos do Hospital do Idoso Zilda Arns por auxiliarem com as trocas de plantão e saídas para chegar em tempo no Aeroporto.

Aos amigos do Hospital de Clínicas por permitirem o meu afastamento para esse projeto.

Ao Cleber Rafael Vieira da Costa e à Fundação Pro Renal pelo processamento do material e imunohistoquímica.

À Pfizer por viabilizar as agulhas para realização das biópsias do projeto.

À toda equipe da Unidade 6 do Hospital Universitário Cajuru pelo empenho com que trabalham

E finalmente, aos pacientes, por aceitarem participar do estudo, afinal, sem eles não há motivos para estudar e se aprimorar.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lesão endotelial e tubular na lesão por isquemia-reperfusão.....12

Artigo

Figura 1. Cortes histológicos com imunohistoquímica para caspase-3.....34

Artigo em inglês

Figure 1. Histological section with immunohistochemistry for caspase-3.....55

LISTA DE TABELAS

Artigo

Tabela 1. Características demográficas e clínicas dos pacientes avaliados.....	33
Tabela 2. Marcação de Caspase-3 no tecido renal em biópsias pós-reperfusão.....	34
Tabela 3. Características demográficas e clínicas dos doadores.....	35
Tabela 4. Características dos doadores nos 4 grupos.....	36
Tabela 5. Características dos receptores nos 4 grupos.....	37

Artigo em inglês

Table 1. Demographic and clinic characteristics of patients evaluated.....	53
Table 2. Labeling of Caspase-3 in renal tissue in post-reperfusion biopsies.....	55
Table 3. Demographic and clinical characteristics of the donors.....	56
Table 4. Donors characteristics in 4 groups.....	57
Table 5. Recipient characteristics in 4 groups.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO – Associação Brasileira de Transplante de Órgãos e Tecidos

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

AMIB – Associação de Medicina Intensiva Brasileira

ATP – Adenosina Trifosfato

BCL 2 – B cell Lymphoma

CKD EPI – *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*

DGF – *delayed graf function* (função retardada do enxerto)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DRT – Doença Renal Terminal

HLA – Antígenos Leucocitários Humanos

HIF – Fator induzido por Hipóxia

ICAM – Molécula de adesão Intercelular

ICE – Enzima conversora da interleucina-1

IHQ – Imunohistoquímica

IRA – Insuficiência Renal Aguda

LIR – Lesão por Isquemia Reperfusão

ME – Morte Encefálica

MHC – Complexo Maior de Histocompatibilidade

MOMP – Permeabilização da membrana mitocondrial externa

PAM – Pressão Arterial Média

PaO₂ – Pressão Parcial de Oxigênio

PRA – Painel de Reatividade aos Anticorpos

RA – Rejeição aguda

RBT – Registro Brasileiro de Transplantes

ROS – *Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TIF – Tempo de Isquemia Fria

TLR – *Toll Like Receptor*

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TRS – Terapia Renal Substitutiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1 O transplante renal como Terapia Renal Substitutiva. Fatores importantes para o desfecho.....	10
2.2 Papel da integridade do endotélio na lesão de isquemia-reperfusão.....	10
2.3 Papel da imunidade inata e adaptativa na lesão de isquemia-reperfusão.....	11
2.4 O papel da ativação da via intrínseca da apoptose.....	13
2.5 Dos cuidados com o potencial doador.....	14
2.6 Imunohistoquímica.....	15
2.7 A disfunção Inicial do Enxerto Renal.....	16
3. MARCO CONCEITUAL ESQUEMÁTICO.....	18
4. JUSTIFICATIVA.....	19
5. OBJETIVOS.....	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
7. ARTIGO.....	25
8. ARTIGO EM INGLÊS.....	47
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68

1. INTRODUÇÃO

O transplante renal é o método de terapia renal substitutiva (TRS) considerado padrão ouro para pacientes com Doença Renal Terminal (DRT).¹ Os desfechos a curto, médio e longo prazo após o transplante renal dependem de uma série de fatores relacionados ao doador, receptor e à preservação do órgão. Em nosso meio existe uma desproporção entre pacientes portadores de DRT aguardando por um transplante e a demanda de órgãos ofertados, de forma que foram criadas diretrizes para cuidados com o potencial doador de órgãos. Após o diagnóstico de morte encefálica, há eventos fisiológicos que, se não manejados adequadamente, podem levar à perda do doador e da qualidade dos órgãos, fato que já foi demonstrado por estudos, tem impacto no desfecho do transplante renal.²

A lesão por isquemia reperfusão (LIR) é uma importante causa de *delayed graft function* – função retardada do enxerto (DGF) em pacientes submetidos a transplante renal, e resulta de um desequilíbrio entre oferta e demanda de oxigênio, ocasionando lesões endoteliais, ativação imune e dos mecanismos de apoptose celular.³ No contexto de apoptose, destacam-se as proteínas da família das caspases, responsáveis pela iniciação e execução desse processo. Estudos com doadores falecidos demonstraram ativação do gene da caspase-3 relacionada ao tempo de isquemia fria e evolução para DGF, bem como piora da função renal no primeiro ano pós transplante.⁴

Em nosso meio, não há estudos que correlacionem o cuidado com o potencial doador de órgãos e o tempo de isquemia fria (TIF) com LIR através da ativação da caspase-3 com desfechos do receptor a curto prazo, como DGF e função renal no primeiro ano pós transplante.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O transplante renal como Terapia Renal Substitutiva. Fatores importantes para o desfecho

O transplante renal é considerado tratamento padrão ouro entre os métodos de Terapia Renal Substitutiva para os pacientes com doença renal terminal. Fatores dependentes do doador e dependentes do enxerto interferem no sucesso do transplante a curto, médio e longo prazo. Entre os fatores dependentes do doador, destacam-se idade, *status* hemodinâmico, causa do óbito, sexo, tempo em terapia intensiva, entre outros. Já entre os fatores dependentes do enxerto figuram variáveis relacionadas com a preservação do órgão, como o tempo de isquemia fria (TIF), tipo de solução de perfusão e método de preservação do órgão. E existem, ainda, fatores próprios do receptor, como “mismatches” do sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA), painel de reatividade aos anticorpos (PRA), idade, doença de base e protocolos de imunossupressão. Esses fatores são relacionados ao desenvolvimento de função retardada do enxerto, que é caracterizada pela necessidade de hemodiálise na primeira semana após o transplante renal e é considerada um preditor independente da perda do enxerto, com risco relativo de 2,9 quando comparado a rins com função imediata. Na presença de rejeição, o impacto da DGF é mais importante e a meia vida do enxerto cai de 9,4 para 6,8 anos.⁵ Uma causa importante de DGF em receptores de rim de doador falecido é a lesão por isquemia-reperfusão (LIR). Há um desequilíbrio entre demanda e fornecimento de oxigênio e acúmulo de metabólitos e espécies reativas de oxigênio (“reactive oxygen species” - ROS)⁶. Como consequência, encontra-se lesão do epitélio tubular, morte por apoptose e necrose, levando à insuficiência renal aguda (IRA), traduzida nesses pacientes como DGF.

2.2 Papel da integridade do endotélio na lesão de isquemia-reperfusão

A maior lesão ao órgão isquêmico ocorre durante a fase de reperfusão. A reperfusão é associada à geração de radicais livres, que levam à peroxidação lipídica, despolimerização de sacarídeos e degradação de desoxirribonucleotídeos. Três fatores são importantes na fisiopatologia da lesão por isquemia-reperfusão: a) A privação de oxigênio decorrente da isquemia induz depleção de adenosina trifosfato

(ATP), o que interrompe as bombas de transporte dependentes de ATP e causa edema mitocondrial, levando a ruptura da membrana externa, com liberação de proteínas mitocondriais internas, como as enzimas indutoras da apoptose da família das caspases. A Caspase 1 ou Enzima conversora da Interleucina-1(IL1) (ICE) cliva a IL1 b, que é uma citocina pro inflamatória; b) Fatores induzidos por hipóxia (HIF 1, HIF2, HIF 3) levam à ativação de genes e citocinas; c) Radicais livres de oxigênio induzem liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).⁵

Outros elementos contribuem decisivamente na fisiopatologia da lesão. As células endoteliais são determinantes importantes do tônus vascular, função leucocitária e responsividade do tônus das células musculares lisas. Após lesão endotelial, ocorre vasoconstrição arteriolar de maior intensidade do que a observada em rins intactos, em resposta ao aumento tissular de endotelina, angiotensina, tromboxano, prostaglandina e leucotrieno, além da própria estimulação simpática. Há ainda diminuição da vasodilatação em resposta à acetilcolina, bradicinina e óxido nítrico. Também a ativação leucocitária gera produção de outras citocinas, que contribuem para a vasoconstrição. A vasoconstrição, associada à oclusão dos vasos por leucócitos, e à ativação da cascata de coagulação resultam em comprometimento da microcirculação e isquemia especialmente da medula renal. O *feedback* tubuloglomerular contribui com vasoconstrição pré-glomerular, resultante do sensor da mácula densa de maior quantidade de soluto no néfron distal. Isto resulta da disfunção tubular, que leva à incapacidade de reabsorção de sódio. Ainda, há aumento da interação endotélio-leucocitária, pelo aumento da expressão de moléculas de adesão, como a molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1) nas células endoteliais danificadas e ativação leucocitária. Finalmente, o endotélio sofre perda do glicocálix, lesão do citoesqueleto, alteração das interações celulares normais e consequente aumento da permeabilidade vascular, com perda de fluido para o interstício.⁷

2.3 Papel da imunidade inata e adaptativa na lesão de isquemia-reperusão

As respostas imunológicas inata e adaptativa contribuem na etiopatogenia da lesão isquêmica. As células tubulares participam ativamente do processo inflamatório, com a produção de citocinas quimioatrativas e inflamatórias, expressão de receptores similares ao “toll” (“toll-like receptor” - TLR) e receptores de complemento. Durante a

isquemia, as células tubulares renais expressam grande quantidade de TLR 2 e 4, que modulam o grau de lesão. Durante o insulto, as células tubulares também expressam moléculas da classe II do complexo principal de histocompatibilidade (“major histocompatibility complex” - MHC) e podem apresentar antígenos para células T e expressar moléculas coestimuladoras. Tais fatos justificam o maior risco de Rejeição Aguda (RA) nos casos de DGF.

Neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células T também são importantes contribuintes para lesão por isquemia e reparo renal. Ocorre ativação do complemento, e esta é uma via importante de inflamação após IRI, pela ativação exclusiva da via alternativa. Células dendríticas fixam covalentemente C3 derivados de macrófagos, o que causa maturação dessas células e ativa respostas das células T.8

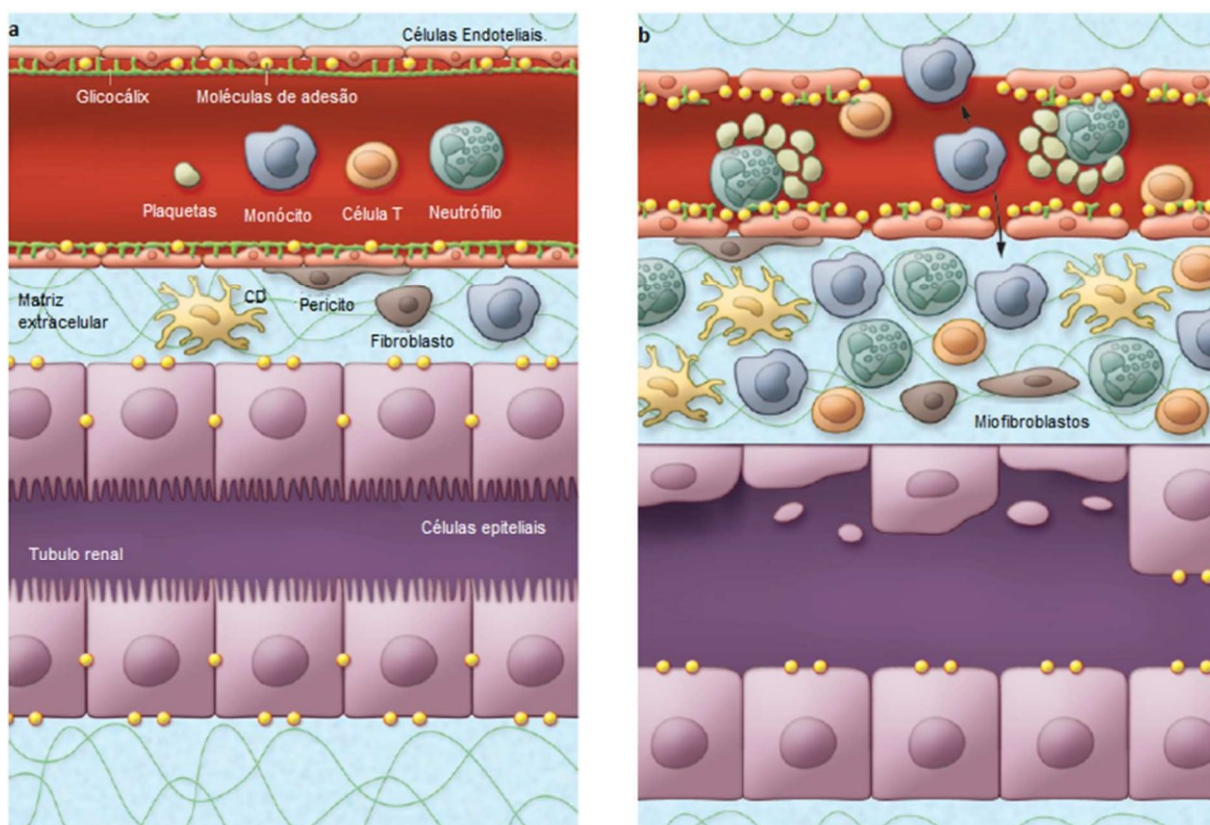


Figura 1. Lesão endotelial e tubular na lesão por isquemia-reperfusão.

Adaptado da referência 7.

a -Figura representando endotélio e células tubulares renais em condições normais. b – após a lesão ocorre aumento de permeabilidade endotelial e expressão de moléculas de adesão, com interação leucócito-endotélio. Ocorre a formação de micro trombos e migração de leucócitos para o compartimento intersticial, com formação de edema.

2.4 O papel da ativação da via intrínseca da apoptose

As lesões ao órgão culminam na ativação de mecanismos de apoptose celular. A via intrínseca da apoptose é um processo de morte celular centrado na mitocôndria e mediado por permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP), que pode ser levado a efeito pelo “stress” intracelular e pela retirada dos fatores de crescimento. A iniciação e execução desses processos são regulados pela proteína de células B do linfoma 2 (BCL-2) e por proteínas da família das caspases. As caspases desempenham papel crucial na transdução de sinais na apoptose. As caspases 2,8,9,10,11 e 12 são ditas iniciadoras e as caspases 3,6,7 são ditas efetoras. O processo de apoptose pela via intrínseca exige a ativação das caspases iniciadoras, as quais ativarão as caspases efetoras por clivagem proteolítica. A ativação de proteínas da família BCL-2 resulta em MOMP e liberação de proteínas pró-apoptóticas (citocromo c), as quais resultam na ativação da caspase 9 que, uma vez ativada, apode diretamente clivar e ativar as caspases 3 e 7.⁹

As caspases efetoras são responsáveis por executar os processos de apoptose, incluindo fragmentação do ácido desoxirribonucléico (DNA), encolhimento da célula e lesão da membrana, além de remodelamento mitocondrial, produção de ROS e clivagem de uma série de proteínas. A função de cada subtipo de caspase nesse processo ainda não é bem compreendido, apesar de sua ativação pelo citocromo c ser bem descrito. A caspase 9 é importante na ativação das caspases efetoras (3 e 7) e do domínio de morte Bid, levando ao remodelamento mitocondrial e aumento da produção de ROS. O Bid inicia a apoptose por ligação a sítios reguladores em proteínas de sobrevivência da família BCL2, neutralizando sua função. A morte celular é mais eficiente na presença da caspase-3, considerada a principal executora da apoptose. A caspase 7, por outro lado, pode causar acúmulo de ROS e separação das células da matriz extra celular. Estudos experimentais correlacionaram a caspase-3 com o desenvolvimento de fibrose renal.¹⁰

A apoptose em tecido renal foi descrita pela primeira vez em 1987, em um paciente com IRA obstrutiva¹¹ mas já foi identificada em pacientes com nefrite lúpica¹² e doença da membrana basal.¹³ Estudos já validaram a utilização de imunohistoquímica (IHQ) para caspase-3 como marcador de apoptose.^{11,14}

Estudos em transplante com doador falecido demonstraram ativação do gene da caspase-3 relacionada com o tempo de isquemia fria, além de outros genes e

proteínas. O grau de apoptose tem relação com o tempo de isquemia fria. A ativação desses genes e do TIF tem correlação com DGF e função renal no primeiro ano pós transplante.⁴

A localização *in situ* das caspases ativadas é considerada mais favorável para a marcação de células apoptóticas do que o método utilizado anteriormente, denominado TUNEL (TdT-mediated dUTP-TMR Nick End Labeling), que identifica através da polimerização de desoxirribonucleotídeos nas zonas 3' em cadeias únicas ou duplas, ou seja, detecta DNA fragmentado, que pode ocorrer em outras situações além da apoptose.¹⁵

2.5 Dos cuidados com o potencial doador

Após a morte encefálica (ME) há eventos fisiopatológicos catastróficos, causados pelo aumento da pressão intracraniana, com consequente isquemia cerebral e uma “tempestade autonômica” caracterizada por hipertensão, taquicardia e intensa vasoconstrição periférica. Há liberação de catecolaminas e disfunção miocárdica secundária ao consumo de oxigênio, o que pode gerar arritmias. Após essa fase inicial hipertensiva pode ocorrer hipotensão secundária à destruição dos núcleos vasomotores, depleção de catecolaminas, vasodilatação periférica, hipovolemia, alterações endocrinológicas e hidroeletrolíticas. Dentre as alterações endocrinológicas mais frequentes estão o Diabetes Insipidus por lesão do eixo hipotálamo-hipofisário e diminuição da função tireoidiana, além de níveis baixos de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), que é uma das causas da diminuição dos níveis de cortisol.

Considerando o transplante renal como a Terapia Renal Substitutiva “padrão ouro” e o número de pacientes aguardando por um transplante, medidas para melhorar a quantidade e qualidade dos órgãos ofertados devem ser obtidas. A Associação de Medicina Intensiva Brasileira (AMIB) e a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos e Tecidos (ABTO) têm diretrizes com metas de cuidados com o potencial doador para com objetivo de reduzir a perda dos doadores e aumentar a qualidade e efetivação dos transplantes.

As principais metas das diretrizes são: a) agilizar a retirada de órgãos para transplante no prazo de 12 a 24 horas a partir do diagnóstico de ME; b) manter temperatura central > 35°; c) manter pressão arterial média (PAM) entre 65 e

95mmHg; d) manter pressão parcial de oxigênio (PaO_2) > 60 e/ou Sao_2 > 90%; e) manter glicemia capilar < 180mg/dL; f) manter débito urinário entre 0,5 e 4ml/Kg/min; g) manter sódio sérico entre 130/150 mEq/L; h) manter pH acima de 7,2; i) reposição de corticóide na forma de metilprednisolona 15mg/kg e levotiroxina.¹⁶

Estudos já demonstraram a correlação dos cuidados com o doador com a evolução do receptor no pós transplante¹⁷, porém o estudo de Malinoski *et al* conseguiu comprovar de forma objetiva que o sucesso nas metas do cuidado com o doador tem impacto no desfecho do receptor. Nesse estudo, obter as metas antes da definição da doação de órgãos teve uma diminuição significativa nas taxas de DGF.²

2.6 Imunohistoquímica

O procedimento da imunohistoquímica teve início há cerca de 6 décadas e permitiu a marcação de diversas proteínas em tecidos fixados por formalina através de anticorpos específicos.¹⁸ Essa técnica possibilita detecção de moléculas importantes no funcionamento celular e caracterização de lesões. Tem sido extensivamente utilizada no diagnóstico de neoplasias.

Porém, a variação no tempo de isquemia e o tempo de fixação na formalina podem levar a variação nos resultados deste processo. Vários estudos tentaram ajustar protocolos para procedimentos de imunohistoquímica para reduzir a variação que pode ocorrer com os métodos em uso atualmente.¹⁹ Existem diferenças entre as técnicas e sua sensibilidade e especificidade para diagnóstico, além de sensibilidade e especificidade do próprio anticorpo em uso.²⁰

A automação tem sido extensivamente utilizada na imunohistoquímica e suas principais vantagens consistem em possibilidade de protocolos para coloração e recuperação de moléculas, além de facilitar o processo e detecção de erros como temperaturas inapropriadas e volumes inadequados de reagentes.²¹

Na área da nefrologia a imunohistoquímica tem diversas utilidades. Há estudos em rins fetais e recém nascidos detectando enzimas e proteínas específicas de cada período e sua importância no desenvolvimento renal.²² Nas glomerulopatias, marcadores para anticorpos relacionados com determinados processos inflamatórios.

No transplante renal o principal marcador avaliado por imunohistoquímica é a presença do C4d, que indica ativação local do complemento e rejeição causada por anticorpos assim como a detecção do antígeno SV40 do vírus polioma.

2.7 A disfunção Inicial do Enxerto Renal

Há várias definições de DGF atualmente na literatura e provavelmente nenhuma delas ideal. A mais utilizada é a necessidade de hemodiálise na primeira semana após o transplante. Embora prática e fácil de reportar, outros fatores que não apenas a disfunção do enxerto podem ser causas de necessidade de diálise no pós-operatório, como sobrecarga de volume, hipercalemia, e a decisão de diálise depende da avaliação clínica dos receptores. Esses fatores de confusão podem explicar a variação tão ampla da incidência de DGF entre os serviços de transplante.²³ Definições que utilizam débito urinário, marcadores séricos ou urinários também apresentam viés associados à função renal residual.

Para o desenvolvimento da DGF, há fatores de risco relacionados ao doador, ao receptor e ao cuidado com o órgão. Os doadores de critério expandido (doadores acima de 60 anos, ou aqueles entre 50 e 59 anos com dois entre três fatores: acidente vascular encefálico, histórico de hipertensão arterial e creatinina sérica acima de 1,5mg/dL antes da captação)²⁴ apresentam maior risco para o desenvolvimento de DGF, relacionados à dano renal preexistente que aumenta a sensibilidade à hipóxia e isquemia. Ademais, doadores com necessidade de suporte inotrópico e a doação após parada cardíaca também estão relacionadas à DGF. A duração do TIF é um fator importante e modificável, e estudos já demonstraram que o TIF prolongado é um fator de risco independente para a DGF. Os principais fatores relacionados ao receptor são o sexo masculino, idade acima de 55 anos, afro descendentes, obesidade, diabetes, anticorpos anti HLA, e necessidade de diálise pré transplante. Em uma coorte americana, pacientes em diálise peritoneal apresentaram menores taxas de DGF.²⁵ A hipovolemia e uma baixa pressão arterial diastólica durante o procedimento cirúrgico do transplante aumenta o risco de disfunção do enxerto, a pressão arterial diastólica baixa e alguns estudos sugerem que a manutenção da pressão venosa central (PVC) acima de 8 mmHg podem ter um efeito protetor.²⁶ A perfusão dinâmica do órgão com máquinas de perfusão também teve efeito protetor em alguns estudos.²⁶

A incidência na literatura é muito variável, e relatada entre 2 a 50%. No Brasil, essa incidência é maior, chegando até 70% em alguns estudos.²⁷ A DGF tem consequências para o receptor do transplante como o aumento da morbidade, aumento do tempo de hospitalização e pior desfecho a curto e longo prazo. Um estudo nacional, em um único centro demonstrou que os pacientes com DGF prolongada

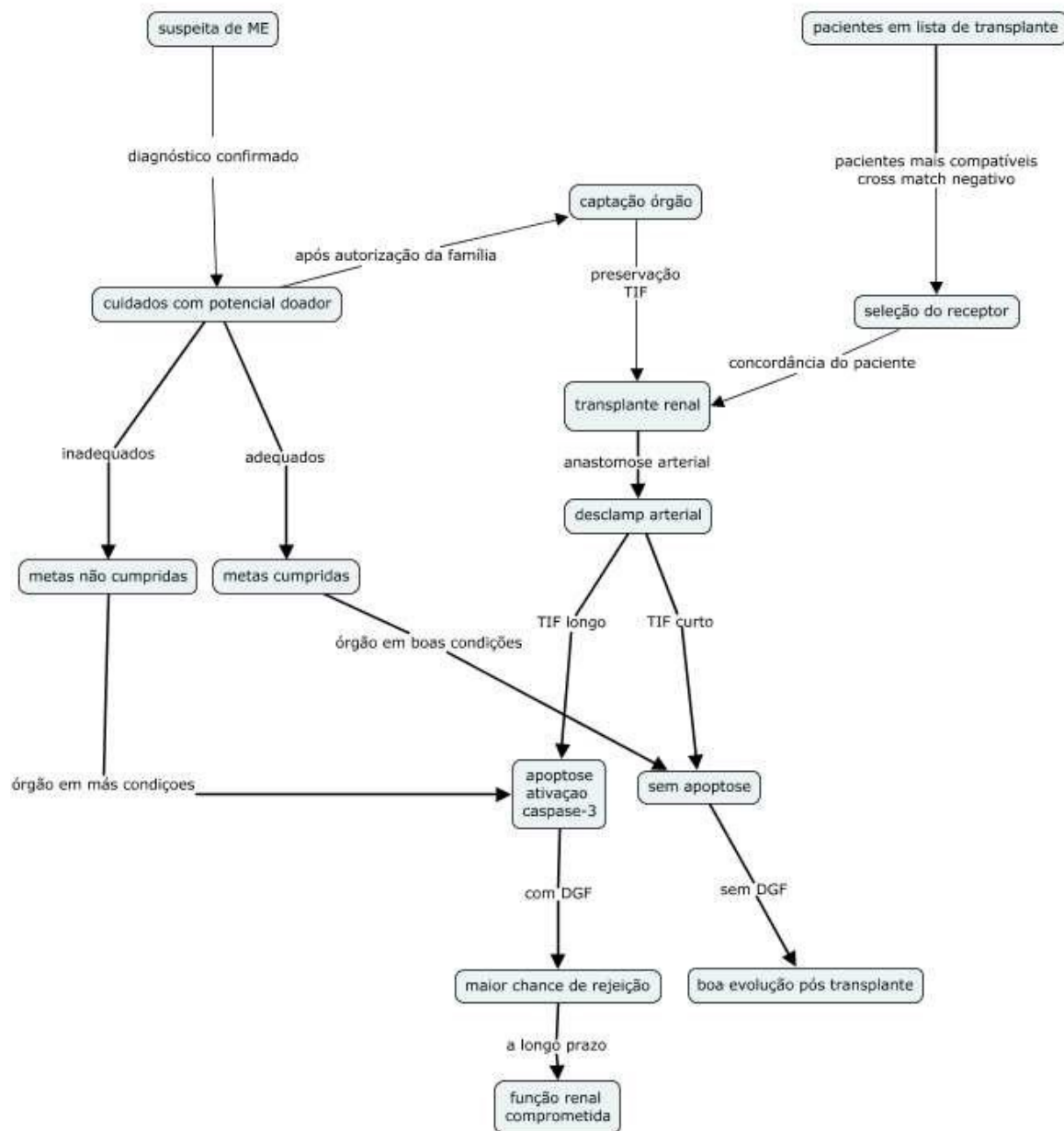
(acima de 15 dias) apresentaram TGF mais baixa no final do primeiro mês, o que se manteve pelo primeiro ano pós transplante²⁸, outros estudos haviam feito essa correlação com DGF acima de 30 dias. A longo prazo, a DGF é uma fator independente para perda do enxerto com um RR de 2,9 quando comparado a rins com função imediata.²⁵

Publicações recentes têm relacionado a IRA à DRC^{29,30,31} e isso também ocorre no enxerto renal. O epitélio tubular renal tem a capacidade de recuperação completa após danos estruturais e funcionais. A lesão por isquemia-reperfusão promove a diferenciação de células tronco através de fatores de crescimento em células tubulares renais, mas também pode levar à diferenciação em fibroblastos, com consequente fibrose intersticial. A hipóxia por si só é capaz de induzir a produção de colágeno I por fibroblastos.²⁹ Estudos experimentais demonstraram que tanto o transplante quanto a nefrectomia unilateral podem levar à fibrose intersticial, que pode ainda reduzir o número de néfrons definitivamente e piorar a lesão glomerular. Assim, um episódio único de IRA pode levar à perda irreversível de néfrons e prejudicar a função renal a longo prazo.

O manejo da DGF consiste na realização de hemodiálise conforme a necessidade do receptor. Deve-se evitar drogas nefrotóxicas e instabilidade hemodinâmica, pode-se também alterar o regime de imunossupressão. O uso de agentes depletors de linfócitos, como a Thymoglobulina como substituição inicial dos inibidores de calcineurina demonstrou associação com redução da DGF, melhor função renal no primeiro ano e menor tempo de hospitalização.³² Regimes contendo sirulimus (um inibidor de mtor – *mammalian target of rapamicin*) não demonstraram bons resultados e essa droga não é o agente ideal nos casos de DGF.

Há possíveis tratamentos para lesão por isquemia-reperfusão em estudo com objetivo de reduzir a incidência de DGF. Dentre eles encontram-se o condicionamento pré isquêmico do órgão³³, agentes vasodilatadores para o receptor, anti oxidantes, anti inflamatórios, terapias de indução, fatores de crescimento, mas ainda nenhuma dessas disponível para uso clínico.^{34,35,36,37,38,39,40}

3. MARCO CONCEITUAL ESQUEMÁTICO



4. JUSTIFICATIVA

A lesão por isquemia-reperfusão é uma das principais causas de DGF em enxertos renais de doadores falecidos e é relacionada com pior desfecho a longo prazo. A compreensão de mecanismos desse tipo de lesão e sua correlação com dados clínicos e histológicos é importante no desenvolvimento de terapias para inibir a cascata de reações que culminam com a disfunção renal e menor sobrevida do enxerto.

5. OBJETIVOS

Objetivos primários:

Avaliar, através de imunohistoquímica para caspase-3, a presença de lesão por isquemia-reperfusão em tecido fixado em formalina e embebido em parafina obtido de rins de doadores falecidos após sua reperfusão.

Objetivos secundários:

Correlacionar a demonstração de apoptose com DGF, rejeição aguda, alterações histológicas no enxerto e função renal nos primeiros meses após o transplante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. **New England Journal of Medicine**. 1999; 341:1725.
2. Malinoski DJ, Patel MS, Ahmed O et al. The Impact of Meeting Donor Management Goals on the Development of Delayed Graft Function in Kidney Transplant Recipients. **American Journal of Transplantation**. 2013; 13: 993-1000.
3. De Rosa S, Antonelli M, Ronco C. Hypothermia and kidney: a focus on ischaemia-reperfusion injury. **Nephrology Dialysis Transplantation**. 2017; 32: 241-247.
4. Wszola M, Kwiatkowski A, Domagala P et al. Preservation of kidneys by machine perfusion influences gene expression and may limit ischemia/reperfusion injury. **Progress in Transplantation**. 2014; 1: 1-26.
5. Bueno, V. The Impact of Ischemia and Reperfusion Injury in Kidney Allograft Outcome, Kidney Transplantation – New Perspectives, Dr Magdalena Trzcinska (Ed.), ISBN: 78-953-307-684-3, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/kidney-transplantation-new-perspectives/the-impact-of-ischemia-and-reperfusion-injury-in-kidney-allograft-outcome>.
6. Domanski L, Kloda K, Ciechanowski K. Ischemia-Reperfusion Injury in the Transplanted Kidney Bases on Purine Metabolism Markers and Activity of the Antioxidant System. Organ Donation and Transplantation – Public Policy and Clinical Perspectives, Dr Gurch Randhawa (Ed.), ISBN: 978-953-51-003-3.
7. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **The Journal of Clinical Investigation**. 2011; 121 (11): 4210-4221.
8. Kezic A, Stajic N, Thaiss F. Innate Immune response in Kidney Ischemia/reperfusion injury: potential target for therapy. **Journal of Immunology research**. 2017; 1-10.
9. Brentnall M, Rodrigues Menocal L, De Guevara RL et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. **BMC Cell Biology** 2013, 14:32.
10. Yang B, El Nahas M, Thomas GL et al. Caspase-3 and apoptosis in experimental chronic renal scarring. **Kidney International**. 2001; 60: 1765-1776.

11. Hughes J, Gobe Glenda. Identification and quantification of apoptosis in the kidney using morphology, biochemical and molecular markers. **Nephrology**. 2007; 12: 452-458.

12. Jeruc J, Vizjak A, Rozman B et al. Immunohistochemical Expression of Activated Caspase-3 as a Marker of Apoptosis in Glomeruli of Human Lupus Nephritis. **American Journal of Kidney Diseases**. 2006; 48: 410-418.

13. Yang B, Johnson TS, Thomas GL et al. Apoptosis and Caspase-3 in Experimental Anti-GLomerular Basement Membrane Nephritis. **Journal of American Society of Nephrology**. 2001; 12: 485-495.

14. Bressenot A, Marchal S, Bezdetrnaya L et al. Assessment of Apoptosis by Immunohistochemistry to Active Caspase-3, Active Caspase-7, or Cleaved PARP in Monolayer Cells and Spheroid and Subcutaneous Xenografts of Human Carcinoma. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. 2009; 57(4): 289-300.

15. Gobe G. Identification of Apoptosis in Kidney Tissue Sections. In: Becker G, Hewitson T (eds) *Kidney Research.. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 466. Humana Press.

16. Westphal GA, Caldeira Filho M, Vieira KD *et al*. Diretrizes para manutenção de múltiplos órgãos no potencial doador adulto falecido. Parte I. Aspectos gerais e suporte hemodinâmico. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. 2011; 23(3): 255-268.

17. Baptista APM, Silva Jr HT, Pestana JOM, Influência da manutenção hemodinâmica do doador falecido na função renal do receptor de transplante renal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. 2013; 35(4): 289-298.

18. Ramos-Vara JA (2011). Principles and Methods of Immunohistochemistry. In: Gautier JC (eds) *Drug Safety Evaluation (Methods and Protocols)*, vol 691. Humana Press.

19. Kap M, Lam KH, Ewing-Graham P et al. A reference image-based method for optimization of clinical immunohistochemistry. **Histopathology**. 2015; 67: 193-205.

20. Torlakovic EE, Nielsen S, Vyberg M et al. Getting controls under control: the time is now for immunohistochemistry. **Journal of Clinical Pathology**. 2015; 68: 879-882.

21. Prichard JW. Overview of automated immunohistochemistry. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**. 2014; 138:1578-1582.

- 22.Faa G, Gerosa C, Fanni D et al. The role of immunohistochemistry in the study of the newborn kidney. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**. 2012; 25(S4): 135-138.
- 23.Schröppel B, Legendre C. Delayed kidney graft function: from mechanism to translation. **Kidney International**. 2014; 86: 251-258.
- 24.Mota LS, Oliveira CMC, Pinheiro Junior FML et al. Estudo comparativo entre transplantes renais com doador falecido critério expandido e critério padrão em um único centro no Brasil. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. 2016; 38(3): 333-343.
- 25.Perico N, Cattaneo Dm Sayegh M, et al. Delayed graft function in kidney transplantation. **The Lancet**. 2004; 13: 1814-1827.
- 26.Siedlecki A, Irish W, Brennan D. Delayed Graft Function in the Kidney Transplant. **American Journal of Transplantation**. 2011; 11(11): 2279-2296.
- 27.Helfer MS, Vicari AR, Spuldaro F et al. Incidence, Risk Factors, and Outcomes of Delayed Graft Function in Deceased Donor Kidney Transplantation in a Brazilian Center. **Transplantation Proceedings**. 2014; 46: 1727-1729.
- 28.Santes-Freitas TV, Felipe CR, Aguiar WF et al. Prolonged Delayed Graft Function is Associated with Inferior Patient and Kidney Allograft Survivals. **PLoS ONE** 10(12):e0144188. doi:10.1371/journal.pone.0144188.
- 29.Tanaka T. A mechanistic link between renal ischemia and fibrosis. **Medical Molecular Morphology**. 2017; 50: 1-8.
- 30.Liu J, Kumar S, Dolzhenko E *et al*. Molecular characterization of the transition from acute to chronic kidney injury following ischemia/reperfusion. **Journal of Clinical Investigation Insight**. 2017; 2(18): 1-18.
- 31.Chawla LK, Eggers PW, Star R, et al. Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease as Interconnected Syndromes. **New England Journal of Medicine**. 2014; 371:58-66.
- 32.Goggins WC, Pascual MA, Powelson JA, et al. A prospective, randomized, clinical trial of intraoperative versus postoperative thymoglobulin in adult cadaveric renal transplant recipients. **Transplantation**. 2003; 76: 798-02.
- 33.Veighey K and MacAllister R. Ischemic Conditioning in Kidney Transplantation. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**. 2017; 22(4):330-336.

- 34.Chang M, Chen C, Chen Y *et al.* Sitagliptin protects rat kidneys from acute ischemia-reperfusion injury via upregulation of GLP-1 and GLP-1 receptors. **Acta Pharmacologia Sinica**. 2015; 36:11-130.
- 35.Jani A, Ljubanovic D, Faubel S *et al.* Caspase Inhibition Prevents the Increase in Caspase-3,-2, -8 and -9 Activity and Apoptosis in the Cold Ischemia Mouse Kidney. **American Journal of Transplantation**. 2004; 4: 1246-1254.
- 36.Nakagawa K, Koo DDH, Davies DR *et al.* Lecithinized superoxide dismutase reduces cold ischemia-induced chronic allograft dysfunction. **Kidney International**. 2002; 61: 1160-1169.
- 37.Jain S, Keys D, Nydam T. Inhibition of autophagy increases apoptosis during rewarming after cold storage in renal tubular epithelial cells. **Transplant International**. 2015; 28:214-223.
- 38.Lau A, Wang S, Jiang J *et al.* RIPK3-Mediated necroptosis promotes donor kidney inflammatory injury and reduces allograft survival. **American Journal of Transplantation**. 2013; 13:2805-2818.
- 39.Du C, Wang S, Diao H *et al.* Increasing resistance of tubular epithelial cells to apoptosis by shRNA therapy ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Transplantation**. 2006; 6: 2256-2267.
- 40.Kassimatis T, Qasem A, Douiri A *et al.* A double-blind randomized controlled investigation into the efficacy of Mirococept (APT070) for preventing ischaemia reperfusion injury in the kidney allograft (EMPIRIKAL): study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**. 2017, 18:255.

Avaliação de Lesão por Isquemia-Reperusão através da Imunohistoquímica para Caspase-3 em enxertos renais de doadores falecidos.

Itamara Pereira Danucalov¹

Silvia Regina Hokazono²

Alexandre Tortoza Bignelli²

Roberto Ceratti Manfro³

¹- Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

²-Serviço de Transplante Renal, Hospital Universitário Cajuru, Curitiba, PR, Brasil

³-Serviço de Nefrologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

Autor para correspondência

Dr. Roberto Ceratti Manfro

Serviço de Nefrologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos, 2350, sala 2030

90035-003 – Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone: (51) 2101-8295 Fax (51) 21018001

E-mail:manfro@hcpa.ufrgs.br

Título Resumido: Imunohistoquímica para Caspase-3 em enxertos renais de doadores falecidos

RESUMO

Em nosso meio, há uma desproporção entre o número de pacientes aguardando por um transplante renal e a oferta de órgãos. Há uma série de fatores que alteram o desfecho do transplante renal a curto, médio e longo prazo, como a lesão por isquemia-reperfusão (LIR), relacionada ao tempo de isquemia fria (TIF) e a reperfusão do órgão transplantado. Tal lesão pode ser avaliada através da identificação de apoptose no enxerto. As proteínas da família das caspases são ativadas no processo de apoptose, e estudos já validaram a identificação de caspase-3 por imunohistoquímica. Nesse estudo procuramos relacionar o cuidado com o potencial doador com lesão por isquemia reperfusão e desfechos em curto prazo no receptor de transplante renal, como disfunção inicial do enxerto (*delayed graft function* - DGF) e função renal nos primeiros meses pós transplante. Vinte e oito enxertos renais de doadores falecidos foram submetidos a biópsia após desclameamento da artéria renal e reperfusão para análise através da imunohistoquímica para caspase-3. A positividade para tal marcador foi quantificada e correlacionada com parâmetros clínicos e laboratoriais do doador, do receptor e com dados do transplante como TIF (tempo de isquemia fria) e DGF. Houve positividade na imunohistoquímica para caspase-3 em 23 enxertos (82,14%). Os pacientes foram divididos em 4 grupos de acordo com a área positiva para caspase: grupo 1 – imunohistoquímica negativa, grupo 2 – imunohistoquímica positiva em uma área entre 0 e 1% do tecido, grupo 3 – entre 1-5% do tecido, grupo 4 – maior que 5%. Não houve diferença entre esses grupos com relação aos parâmetros do doador. No grupo 1 os receptores foram mais jovens e apresentaram creatinina sérica mais alta após 180 dias, efeito não observado na taxa de filtração glomerular (TGF) estimada pela equação CKD-EPI. Os achados histopatológicos também não apresentaram diferença entre os grupos e não houve diferença na incidência de rejeição. O método de imunohistoquímica para caspase-3 mostrou-se confiável para identificação de apoptose em enxertos renais de doadores falecidos.

Palavras-chave: transplante renal. Lesão por isquemia-reperfusão.

Imunohistoquímica. Caspase-3

ABSTRACT

The number of patients waiting for a kidney transplant and the organs offered are disproportional. Some factors can alter the outcome of a kidney transplant in short and long term, as the ischemia reperfusion lesion (IRL), associated with the cold ischemia time (CIT) and the reperfusion of the transplanted organ. This lesion can be diagnosed by the identification of apoptosis on the graft. The caspase family of proteins are activated in the process of apoptosis and its identification by immunohistochemistry has been validated by other studies. In this project, we aim to correlate the cares with the potential organ donor with ischemia reperfusion lesion and short terms outcomes in the kidney graft recipient, as delayed graft function (DGF) and renal function on the first year post transplant. 28 kidney grafts from deceased donor were submitted to biopsy after artery unclamp and organ reperfusion to analysis by caspase-3 immunohistochemistry. This marker presence was quantified and correlated to clinical and laboratory donor and receptor parameters and transplant data as CIT and DGF. 82.14% of the grafts presented with positive immunohistochemistry for caspase-3. The patients were enrolled in four different groups according to the positive caspase area: group 1 – negative immunohistochemistry, group 2 – positive immunohistochemistry between 0 and 1% of kidney tissue, group 3 – between 1 and 5%, group 4 – area higher than 5%. There was no difference between these groups regarding to donor parameters. Group 1 had the younger recipients with higher creatinine after 180 days, which was not observed in glomerular filtration rate (GFR) estimated by CKD-EPI equation. The histopathologic findings were not different and neither the rejection rate. The caspase-3 immunohistochemistry is a reliable manner to identification of apoptosis in deceased donors kidney grafts.

Key words: kidney transplant. Ischemia reperfusion injury. Immunohistochemistry. Caspase-3

Introdução

O transplante renal é considerado o tratamento padrão ouro da Doença Renal Crônica Terminal (DRT)¹. Seu desfecho a curto, médio e longo prazo é correlacionado com uma série de variáveis tanto do receptor quanto do doador e da preservação do órgão. Com relação ao doador, os principais fatores são a idade, status hemodinâmico, causa do óbito, sexo, tempo em terapia intensiva, entre outros. Quando se trata do receptor, destaca-se o painel de reatividade aos anticorpos (PRA), idade, doença de base, protocolos de imunossupressão, número de *mismatches* do sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA). A preservação do órgão, o tempo de isquemia fria (TIF), tipo de solução de preservação e método de preservação são os fatores relacionados ao enxerto. Esses fatores todos são relacionados ao desenvolvimento da função retardada do enxerto (*delayed graft function – DGF*), que é caracterizada pela necessidade de hemodiálise na primeira semana após o transplante e que tem impacto direto na sobrevida do enxerto.²

Uma das principais causas de DGF em receptores de rim de doador falecido é a lesão por isquemia-reperfusão que ocorre quando há um desequilíbrio entre demanda e fornecimento de oxigênio e glicose, seguida de reperfusão do órgão. A isquemia força as células a manterem um metabolismo anaeróbico para produção de adenosina trifosfato (ATP), o que causa acidose celular. A depleção de ATP é seguida por eventos que alteram toda a homeostase tubular como a sobrecarga citoplasmática de cálcio, com ativação de proteases, fosfolipases e caspases, com acúmulo de hipoxantina e espécies reativas de oxigênio (ROS).³ Em nível mitocondrial, a depleção de ATP causa a interrupção do transporte de íons por bombas ATP dependentes, levando a edema mitocondrial e rotura da membrana externa, com liberação de proteínas intermembranas, que causa uma cascata de secreção de quimiocinas pró inflamatórias. Uma manifestação inicial é a perda de polaridade das células tubulares, com diminuição da reabsorção tubular de sódio e água, que ativa o *feedback* túbulo glomerular, induzindo a vasoconstrição da arteríola aferente.⁴ A vasoconstrição, associada à oclusão dos vasos por leucócitos, e à ativação da cascata de coagulação resultam em comprometimento da microcirculação e isquemia especialmente da medula renal. A reperfusão do órgão isquêmico resulta em inflamação e dano oxidativo⁵. No início da reperfusão, a circulação cortical é estabelecida, mas na porção mais distal da medula a hipoperfusão persiste e é caracterizada pela congestão de

capilares peritubulares, que tem aumento da permeabilidade e aumento da expressão de moléculas de adesão, quimiocinas, expressão de *toll like receptors* (TLR) e receptores do complemento. Esses eventos culminam em resposta inflamatória e justificam o aumento do risco de rejeição na presença de lesão por isquemia reperusão.

As lesões ao órgão culminam na ativação de mecanismos de apoptose celular. A iniciação e execução desses processos são regulados pela proteína de células B do linfoma 2 (BCL-2) e por proteínas da família das caspases. As caspases desempenham papel crucial na transdução de sinais na apoptose. As caspases 2,8,9,10,11 e 12 são ditas iniciadoras e as caspases 3,6,7 são ditas efetoras. As caspases efetoras são responsáveis por executar os processos de apoptose, com fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA), encolhimento da célula e lesão da membrana, além de remodelamento mitocondrial, produção de ROS e clivagem protéica. A caspase-3 é considerada a principal executora da apoptose.⁶ A localização *in situ* das caspases ativadas é considerada mais favorável para a marcação de células apoptóticas do que o método utilizado anteriormente, denominado TUNEL (TdT-mediated dUTP-TMR Nick End Labeling), que identifica através da polimerização de desoxirribonucleotídeos nas zonas 3' em cadeias únicas ou duplas, ou seja, detecta DNA fragmentado, que pode ocorrer em outras situações além da apoptose⁷. Estudos em transplante com doador falecido demonstraram ativação do gene da caspase 3 relacionada com o tempo de isquemia fria, além de outros genes e proteínas. O grau de apoptose tem relação com o tempo de isquemia fria. A ativação desses genes e do TIF tem correlação com DGF e função renal no primeiro ano pós transplante.⁸

Considerando o transplante renal como a Terapia Renal Substitutiva “padrão ouro” e o número de pacientes aguardando por um transplante, medidas para melhorar a quantidade e qualidade dos órgãos ofertados devem ser obtidas. A Associação de Medicina Intensiva Brasileira (AMIB) e a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos e Tecidos (ABTO) tem diretrizes com metas de cuidados com o potencial doador para com objetivo de reduzir a perda dos doadores e aumentar a qualidade e efetivação dos transplantes.⁹ Estudos já demonstraram a correlação dos cuidados com o doador com a evolução do receptor no pós transplante¹⁰, porém o estudo de Malinoski *et al* conseguiu comprovar de forma objetiva que o sucesso nas metas do cuidado com o doador tem impacto no desfecho do receptor.¹¹

A principal definição de DGF encontrada na literatura é a necessidade de hemodiálise na primeira semana após o transplante renal.¹² A incidência na literatura é muito variável, e relatada entre 2 a 50%. No Brasil, essa incidência é maior, chegando até 70% em alguns estudos.¹³ Para o desenvolvimento da DGF, há fatores de risco relacionados ao doador, ao receptor e ao cuidado com o órgão. Um estudo nacional, em um único centro demonstrou que os pacientes com DGF prolongada (acima de 15 dias) apresentaram TGF mais baixa no final do primeiro mês, o que se manteve pelo primeiro ano pós transplante.¹⁴ A longo prazo, a DGF é uma fator independente para perda do enxerto com um RR de 2,9 quando comparado a rins com função imediata.¹⁵

Materiais e métodos

Pacientes

No período entre janeiro de 2016 e abril de 2017, vinte e oito enxertos renais de doadores falecidos foram submetidos a biópsia renal no tempo zero. Os pacientes que receberam tais enxertos foram acompanhados por um períodos de 6 meses após o transplante renal.

Os critérios de exclusão do estudo foram: idade menor de 18 anos, não concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e rins provenientes do mesmo doador.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, vinculado ao sistema CEP/CONEP, diretamente ligado ao Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Biópsia do enxerto

Os enxertos de doadores falecidos foram submetidos a biópsia entre três e trinta minutos após o desclameamento da artéria renal e reperusão do órgão. A agulha utilizada foi a Trucore II da Ecomed de 16 gauges. Os fragmentos foram fixados em solução tamponada de formaldeído 10% e submetido a processamento histológico de rotina, seguindo-se as etapas padrão de desidratação, diafanização e embebimento em parafina. Foram executados cortes histológicos com 3µm de espessura, e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina.

Imunohistoquímica

Após processamento histológico descrito anteriormente, cortes de 3µm foram depositados em lâminas carregadas positivamente. Posteriormente os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados e processados para imunohistoquímica. Na imunohistoquímica os cortes reidratados foram incubados com 3% H₂O₂ em metanol para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada em tampão Citrato de Sódio 10 mM, pH 6.0, à 95° C, por 40 minutos. Possíveis ligações não específicas, bem como radicais aldeídicos livres foram bloqueados pela incubação de 5 minutos com PBS contendo 1% de BSA e por PBS contendo 0,1M de Glicina, respectivamente. Posteriormente, os cortes foram incubados por 12 horas à 4°C com o anticorpo primário Caspase-3 (Biocare Medical CP229,IgG de Coelho, diluído 1:100).

Após o término do tempo de incubação, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários específicos. (Os anticorpos secundários utilizados foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente, sendo eles: anticorpo secundário biotilado de coelho contra IgG de coelho (Vector Laboratories, BA-1400, diluído 1:200), após a incubação com o anticorpo secundário foi realizada a incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase por 30 minutos. A revelação da ligação dos anticorpos primários foram realizadas com DAB (“3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride”) (DAB substrate Kit, BD Pharmigen). A seguir, os cortes foram desidratados em bateria crescente de etanol. Após incubação em xilol, as lâminas permanentes foram montadas com Entellan (Merck®).

Para quantificação de marcação por DAB, utilizou-se o software imageJ (NIH), utilizando lâminas marcadas ou imunomarcadas e reveladas com DAB, onde foi separada a marcação por DAB (marrom) da hematoxilina(azul) e quantificada a porcentagem da área marcada.

Avaliação clínica

Foram analisados os prontuários dos receptores dos 28 enxertos renais com relação a idade, diagnóstico de IRC, tempo de Terapia Renal Substitutiva (TRS), método de TRS e PRA.

Foram avaliados os seguintes parâmetros clínicos no pós transplante – número de MM do sistema HLA, presença de DGF, rejeição, função renal (através da dosagem sérica de creatinina – em mg/dL) e estimativa da taxa de filtração glomerular (TGF)

através da fórmula *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) nos meses 1,3 e 6 meses pós transplante.

Doadores

Foram realizadas análises dos dados dos doadores falecidos fornecidos através da Central Estadual de Transplante do Estado do Paraná com ênfase nos parâmetros de cuidados com o possível doador de órgãos estipulados pela AMIB e ABTO no momento pré captação: pressão arterial média, Saturação Arterial de Oxigênio, pressão parcial de Oxigênio, débito urinário, pH sérico, glicemia capilar, uso de droga vasoativa, Sódio sérico.

Análise Estatística

Os dados foram processados e analisados através do Software SPSS da IBM versão 25. As análises descritivas das variáveis contínuas foram expressadas em médias com desvio padrão e medianas, e das variáveis categóricas em frequência absoluta. Para comparação de variáveis contínuas foram utilizados os testes de Wilcoxon-Mann-Whitney e Kruskal Wallis seguido de testes de comparações múltiplas. As variáveis categóricas foram comparadas pelo qui quadrado. O nível de significância estatístico foi considerado $p < 0,05$.

Resultados

No total, foram realizadas análises em 28 enxertos de rim de doadores falecidos neste estudo. Um receptor apresentou trombose venosa do enxerto no segundo pós operatório e foi submetido a enxertectomia. Um paciente evoluiu a óbito no pós operatório por complicações decorrentes de um Infarto Agudo do Miocárdio.

As análises referentes à características do doador e imunohistoquímica para caspase3 foram realizadas nos 28 casos. As análises de desfecho clínico foram realizadas em 26 casos.

Características dos receptores do transplante renal

As características dos receptores de rim estão descritas na tabela 1

Tabela 1. Características demográficas e clínicas dos pacientes avaliados

N Total	28
Sexo (masculino/feminino)	15(53,7%)/13 (46,4%)
Idade ao transplante (anos)	51,39 ±2,40
Método dialítico	
HD	19 (67,8%)
PD	9(32,14%)
Diagnóstico da doença de base	
HAS	13(46,2%)
GNC	5(17,8%)
DM	4(14,2%)
DRPA	4 (14,2%)
Outros	2(0,07%)
Tempo em TRS (meses)	28,6±4,71

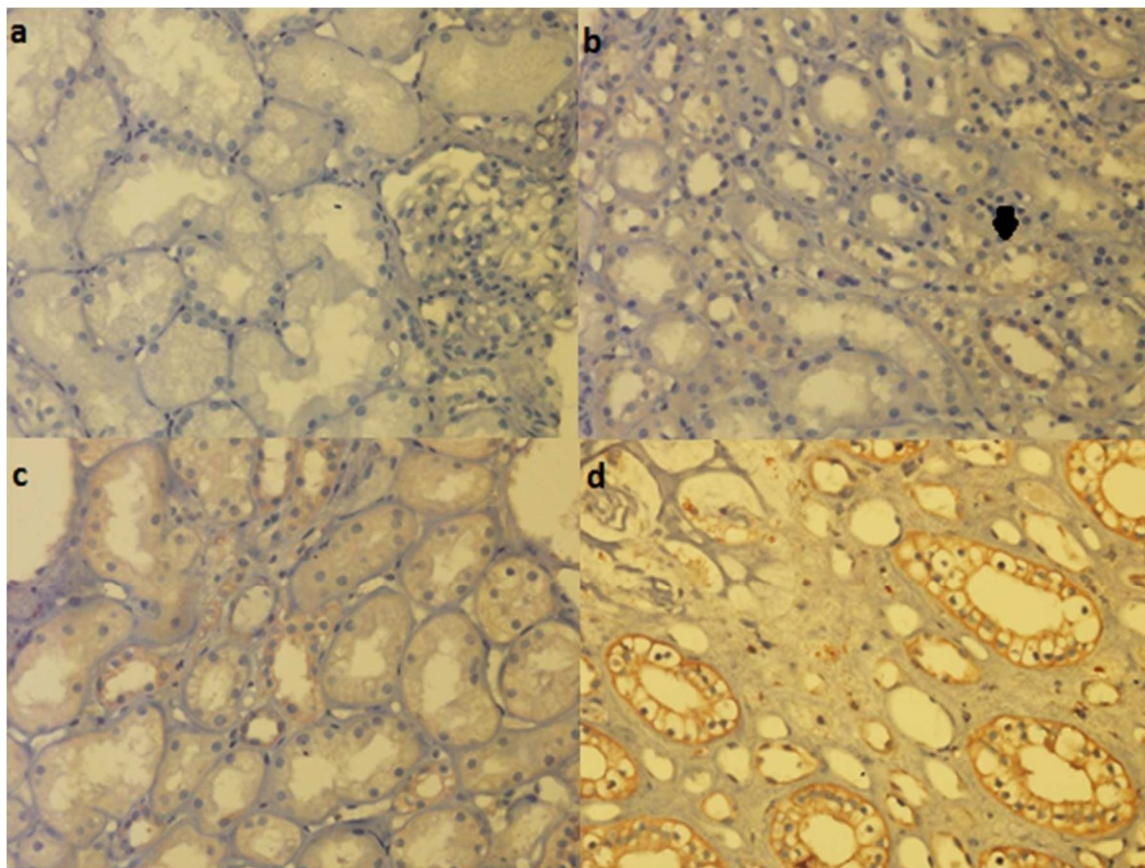
Abreviações: HD: Hemodiálise; PD: Diálise Peritoneal; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; GNC: Glomerulonefrite Crônica; DM: Diabetes Mellitus; DRPA: Doença Renal Policística do Adulto; TRS: Terapia Renal Substitutiva.

Com relação ao transplante, a mediana do TIF foi de 18 horas e 33 minutos, variando entre 12 horas e 14 minutos e 23 horas e 48 minutos. A mediana do número de MM do sistema HLA foi de 4, 14 pacientes apresentaram DGF (50%) e entre esses a mediana do número de sessões de hemodiálise foi de 5,5. A mediana do dia da alta hospitalar foi de 13,5 dias, com mediana da creatinina na alta de 2,29 mg/dL.

Imunohistoquímica

A análise da caspase-3 pela imunohistoquímica foi realizada em 28 enxertos. Os resultados da imunohistoquímica estão apresentados na Tabela 2. A amostra foi dividida em quatro grupos de acordo com a porcentagem do tecido renal positivo para caspase-3 na imunohistoquímica. Na Figura 1 estão demonstradas imunohistoquímicas representativas de cada grupo de acordo com a marcação.

Figura 1. Cortes histológicos com imunohistoquímica para caspase-3



Aumento de 200 vezes. **a-** grupo 1: amostra negativa para caspase-3, observa-se apenas a coloração azulada, resultante da marcação por hematoxilina. **b-** grupo 2: amostra positiva em área entre 0-1% para caspase-3, com mínimas áreas com coloração marrom (flecha). **c-** grupo 3: amostra positiva em área entre 1-5% para caspase-3, as células tubulares apresentam coloração marrom. **d-** grupo 4: amostra positiva em uma área >5%, as células tubulares apresentam coloração marrom intensa.

Tabela 2. Marcação de Caspase-3 no tecido renal em biópsias pós-reperfusão.

Grupo Caspase	1	2	3	4
% do tecido renal marcado	0	>0 e < 1%	1-5%	> 5%
Número de casos e %	5 (17,8)	11 (39,2)	8 (28,5)	4 (14,2)

Dados relacionados aos doadores

As características dos doadores encontram-se na tabela 3

Tabela 3. Características demográficas e clínicas dos doadores

N total	28
Idade (anos)	44,45±2,22
Sexo (masculino/feminino)	21(75%) / 7 (25%)
Etnia (caucasiana/não caucasiana)	20 (71,4%)/8(28,57%)
Causa da ME	
TCE	14 (50%)
AVC	12 (42,85%)
outra	2 (0,07%)
PCR	5 (17,85%)

Abreviações: ME: Morte Encefálica; TCE: Traumatismo Crânio-Encefálico; PCR: Parada Cardiorrespiratória.

Sete doadores (25%) tinham diagnóstico prévio de HAS e apenas um (3,5%) de Diabetes Mellitus.

Com relação aos cuidados do doador pré captação de órgãos, a PAM média foi de 98,39mmHg (DP 3,48) e apenas um paciente (3%) tinha PAM menor do que 65mmHg, fora do alvo determinado. A Saturação Arterial de Oxigênio foi em média de 96,92%. O débito urinário era menor do que 0,05ml/Kg/hora em dois doadores (7,1%), sendo que dezenove (67%) apresentavam poliúria. Vinte e cinco doadores (89,2%) estavam em uso de drogas vasoativas, a maioria (57%) com norepinefrina na dose entre 0,05 e 0,9 mcg/kg/min.

A concentração de hemoglobina foi em média 10,94g/dL (DP 0,42), porém com dez doadores (35%) apresentando valores abaixo do ideal de 10g/dL. Quanto à glicemia, vinte (71,5%) tinham valores fora da faixa recomendada entre 140 e 180mg/mL e apenas oito (28,5%) com valores nessa faixa. O sódio sérico teve média de 150,6 ± 1,54 mg/mL com dezoito indivíduos (64,2%) apresentando valores acima do recomendado de 145mg/mL. O pH sérico teve média de 7,35 ± 0,02), com cinco indivíduos (17,8%) apresentando valores menores do que 7,30, e o pCO₂ teve média de 40,2 ± 2,7. A creatinina sérica na captação foi de 1,2 ± 0.1 mg/dL. Quatro doadores (14%) foram classificados como doadores de critério expandido.

Avaliação da expressão da Caspase 3 com doadores, receptores e desfechos.

Os 28 enxertos foram divididos em 4 grupos de acordo com a porcentagem do tecido renal positivo na imunohistoquímica para caspase-3 (Tabela 2). Esses grupos

foram analisados quanto às características dos doadores, receptores e desfechos em curto prazo.

Expressão da Caspase-3 relacionada aos dados dos doadores

As variáveis relacionadas aos doadores foram avaliadas nos 4 grupos de expressão da Caspase 3 e estão demonstradas na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4. Características dos doadores nos 4 grupos

Características do doador	grupo 1	grupo 2	grupo 3	grupo 4	p valor
idade (anos)	46	45	49	40	0,854
Sexo (masculino/feminino) (%)	60	72	100	50	0,215
Etnia (caucasiana/não caucasiana)	20/80	72/27	87,5/12,5	100/0	0,032
Morbidades					
HAS	40	9	37,5	25	0,448
DM	0	0	12,5	0	0,475
Causa da Morte Encefálica					
AVC (%)	40	45	50	25	0,871
TCE (%)	60	45	50	50	0,964
outro (%)	0	27	12,5	20	0,411
PCR	0	27	12	25	0,578
Bioquímica					
Creatinina na captação (mg/dL)	1,1	1,07	1,34	1,24	0,657
Hemoglobina (g/dL)	10,4	12,4	10,85	9,4	0,717
Glicemia (mg/dL)	177	173	239	213	0,598
Sódio sérico (mg/dL)	159	149	149,5	150	0,295
pH	7,35	7,31	7,38	7,3	0,835
pO ₂	160	102	150	158	0,17
Saturação arterial de O ₂	97	98	99	94	0,859
PAM doador (mmHg)	97	92	115,5	94	0,389
DU					
<0,5ml/Kg/h (%)	20	0	12,5	0	0,449
0,5-1ml/Kg/h (%)	0	0	50	75	0,005
>2500ml/24h (%)	75	100	37,5	25	0,008
Uso de droga vasopressora					
Norepinefrina					
<0,05mcg/Kg/min (%)	40	9	12,5	25	0,484
0,05-0,9 mcg/Kg/min (%)	40	72	62,5	75	0,675
1-2 mcg/Kg/min (%)	0	0	20	0	0,158
Vasopressina (%)	20	18	25	0	0,836
Critério expandido (%)	0	0	37,5	25	0,097

Abreviações: HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; DM: Diabetes Mellitus; AVC: Acidente Vascular Cerebral, TCE: Traumatismo Crânio Encefálico, PCR: Parada cardiorrespiratória; pO₂: Pressão Parcial de Oxigênio; PAM: pressão Arterial Média; DU: débito urinário

Os órgãos foram preservados de forma estática em dois tipos diferentes de soluções, Eurocollins e Custodiol®. Não houve diferença significativamente estatística entre a solução de perfusão e os grupos (p valor 0,369).

Expressão da Caspase-3 relacionada aos dados dos receptores

As variáveis relacionadas aos doadores foram avaliadas nos 4 grupos de expressão da Caspase 3 e estão demonstradas na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5 Características dos receptores nos 4 grupos

Variáveis	grupo 1	grupo 2	grupo 3	grupo 4	p valor
Idade (anos)	43	58	57,5	53	0,05
Sexo (masculino) (%)	60	63	25	50	0,227
Etnia caucasiano (%)	20	72	87,5	50	0,086
Doença de base					
HAS (%)	0	36	40	50	0,638
DM (%)	0	27	12	0	0,403
GNC (%)	60	0	0	50	0,006
DRPA (%)	20	27	0	0	0,318
outro (%)	20	9	25	0	0,158
método TRS					
HD (%)	80	63	37,5	100	0,166
PD (%)	20	36	62,5	0	0,1666
Tempo em TRS (meses)	15	22	20	17,5	0,825
Transplante					
TIF (horas)	18,71	18,75	17,94	17,68	0,983
DGF (%)	60	45	37,5	75	0,631
Número de sessões de HD	1	0	0	4	0,697
PRA	0	0	28,5	0	0,145
MM	3	4	4	4	0,926
Alta hospitalar (dias)	10	12	22	16	0,197
Creatinina da alta (mg/dL)	2,55	2,29	1,93	2,48	0,425
Creatinina 30 dias (mg/dL)	2,1	1,58	1,11	1,5	0,266
Creatinina 90 dias (mg/dL)	2,3	1,15	1,29	1,27	0,098
Creatinina 180 dias (mg/dL)	2	1,15	1,22	1,33	0,184
TGF- CKD EPI 180 dias	30	66	62	54	0,46

Abreviações: HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; DM: Diabetes Mellitus; GNC: Glomerulonefrite crônica; DRPA: Doença Renal Policística do Adulto; TRS: Terapia Renal Substitutiva; HD: Hemodiálise; PD: Diálise Peritoneal; TIF: Tempo de Isquemia Fria; DGF: *delayed graft function*; PRA: Painel de Reatividade à Anticorpos; MM: *mismatches* do sistema HLA (antígenos leucocitários humanos).

Todos os receptores receberam uma dose de Tacrolimus antes do procedimento cirúrgico.

Rejeição

Entre os 26 pacientes analisados, houve quatro episódios de rejeição comprovadas por biópsia (15%) duas no grupo 2 e duas no grupo 3. Os pacientes do grupo 2 apresentaram diagnóstico de Rejeição Aguda Celular com Classificação de Banff tipo IA, uma delas com diagnóstico no 45° pós operatório e outra com diagnóstico no 180° pós operatório. No grupo 3 houve um diagnóstico de Rejeição Humoral Banff IIB no 13° pós operatório e um diagnóstico de Rejeição Celular Banff IIA no 16° pós operatório. Não houve diferença significativamente estatística na incidência de rejeição entre os 4 grupos nem no tempo para o diagnóstico da rejeição.

Biópsias

Não houve relação entre a positividade para caspase-3 nas biópsias em tempo zero com achados anátomo-patológicos destas mesmas biópsias. Foram analisados: presença de IFTA, Lesão por Isquemia-Reperfusão e presença de Arterioesclerose. Nenhuma biópsia apresentou características de Necrose Tubular Aguda (NTA).

Discussão

No presente estudo, 28 enxertos renais de doadores falecidos foram avaliados quanto à presença do marcador imunohistoquímico para caspase-3 nas biópsias em tempo zero, após desclameamento arterial.

As características dos receptores de rim refletem parcialmente os pacientes em Terapia Renal Substitutiva no Brasil. A maioria tinha como método de TRS a Hemodiálise (67,8%), conforme o Censo Brasileiro de Diálise Crônica 2016, 90% dos pacientes dialíticos no Brasil fazem Hemodiálise e apenas 7,9% fazem Diálise

Peritoneal, em nosso estudo, 32% dos receptores faziam esse método dialítico. A maioria (57%) dos pacientes em TRS no Brasil são do sexo masculino, em nossa amostra, essa porcentagem é de 53%. O diagnóstico prevalente de DRC Terminal conforme o censo é a HAS, com 34%, seguido por DM (30%), GNC (9%) e APKD (4%).^{16,17,18} Nesse estudo, o principal diagnóstico de IRC também foi a HAS, presente em 46,4% dos receptores, porém a segunda morbidade mais prevalente foi a GNC, em 17,8% dos pacientes e o DM e APKD foram o causador de IRC em 14,2%.

O TIF nesses transplantes não diferiu das médias encontradas na literatura. Em uma coorte francesa de 4777 pacientes, o TIF médio foi de 20,6h, com a maioria dos casos apresentando intervalo entre 16 e 24 horas.¹⁹ Nessa análise, o risco de DGF foi diretamente proporcional à TIF, com 40% de DGF nos casos com TIF acima de 24h e o aumento da TIF a cada hora também teve correlação com a mortalidade do receptor. Em nossos dados, a DGF ocorreu em 50% dos pacientes, porém não houve relação com o TIF.

Os doadores deste estudo apresentam características semelhantes aos doadores do Brasil e do estado do Paraná em 2016, conforme dados da ABTO, com predomínio do sexo masculino e maior prevalência da idade entre 50 e 64 anos de idade.²⁰ Nesse estudo a etnia caucasiana foi predominante, o que provavelmente reflete as características raciais e históricas do estado. A causa de morte porém, difere das características nacionais e locais, houve nesse estudo um predomínio do TCE (50%) sobre o AVC (42%), mas sem diferença significativamente estatística.

Os cuidados com os doadores mostraram-se regulares quando comparados aos critérios estabelecidos pela AMIB⁹. No quesito PAM, apenas um paciente (3%) apresentou valores menores do que o determinado. Com relação à concentração da Hemoglobina, 35% apresentavam níveis abaixo dos ideais de 10g/dL, que poderiam facilmente ser corrigidos com a transfusão sanguínea. A característica mais preocupante foi a da glicemia sérica, com 71% dos doadores com faixas fora daquelas preconizadas pela AMIB, entre 140 e 180 mg/dL, a qual também apresenta facilidade para correção dentro de um ambiente de terapia intensiva, como o uso de Insulina endovenosa.

A maioria dos doadores também apresentou natremias elevadas com valores acima dos preconizados de 145mg/dL, provavelmente refletindo o estado de poliúria desses pacientes, já que 67% apresentavam débito urinário acima de 2500 mL em 24horas. Não há critérios suficientes para o diagnóstico de Diabetes insipidus, mas

essa é a principal hipótese para poliúria e hipernatremia em casos de morte encefálica, e o tratamento é possível com desmopressina (DDAVP) ou vasopressina, uma vez que a causa central e não nefrogênica é a principal nesses casos.

Chama atenção ainda a presença de acidose em 17,8% dos doadores, que apresentavam pH sérico menor do que 7,30. A recomendação da AMIB é a de que o pH dos potenciais doadores deve ser mantido acima da faixa de 7,20, o que não ocorreu em dois doadores (7%).

Nenhum dos doadores apresentou todos os parâmetros hemodinâmicos ou bioquímicos fora dos alvos definidos pela AMIB. Malinoski *et al* demonstraram em um estudo dos parâmetros de doadores, que naqueles em que as metas foram atingidas (sete de nove itens hemodinâmicos e bioquímicos), a DGF foi menos frequente (17% x 30%).¹¹

Nesse grupo estudado, 14% dos doadores foram classificados como Doadores de critérios expandidos pelo critério UNOS. Em um estudo nacional recentemente publicado apresentou-se a prevalência de 9,4% de doadores com critérios expandidos, sem diferença na DGF,²¹ da mesma forma em nossa análise não houve diferença nesse quesito.

Dos 28 enxertos estudados, 23 (82,14%) apresentaram positividade na imunohistoquímica para o marcador de apoptose caspase-3, em diferentes proporções do tecido renal, demonstrando ativação dessas vias. Estudos experimentais já demonstraram a ativação da via da caspase em isquemia fria através da análise da expressão da caspase-3 por Western Blot.²² Em 2003, Castaneda *et al* demonstraram, através da imunohistoquímica, positividade para marcadores pré apoptóticos em enxertos renais de doadores falecidos²³. Em 2006, Oberbauer *et al*, demonstraram novamente células apoptóticas em enxertos renais e que o número dessas células pode ser preditivo de desfechos a curto prazo nos pacientes.²⁴ Seu principal resultado foi mostrar que os pacientes com DGF e sem sinais de rejeição tiveram uma taxa de células apoptóticas maior quando comparado àqueles com função imediata do enxerto ou rejeição precoce.

Em nosso estudo, os pacientes foram divididos em quatro grupos. Ao se cotejar os grupos com as características dos receptores observou-se uma diferença significativa na idade dos receptores, sendo o que não apresentou marcação com a Caspase-3 o de idade mais jovem. Estudos prévios demonstraram que o processo de apoptose aumenta em alguns tecidos com o envelhecimento. O stress oxidativo

aumenta com a idade e pode exacerbar o dano celular²⁵, além disso, há aumento na produção de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) que também são implicados na indução da apoptose. Alternativamente sugere-se que o acúmulo de radicais livres leve à dano do DNA mitocondrial, e que isso possa desencadear o processo de apoptose com maior facilidade.²⁶ Foi também previamente comprovado que o processo de envelhecimento é relacionado com aumento da apoptose nos linfócitos, no tecido músculo esquelético e nos miócitos.^{25,26}

As alterações celulares do envelhecimento também ocorrem no tecido renal levando ao desbalanço entre reparo celular e proliferação *versus* apoptose e morte celular.²⁷ Esses mecanismos porém, podem não ocorrer apenas com o envelhecimento, mas também podem estar relacionados à agressões e as células senescentes são mais suscetíveis à apoptose. Esse mecanismo talvez possa explicar a ocorrência de apoptose nos órgãos de doadores, porém, no presente estudo, a diferença observada não alcançou significância estatística, talvez pelo tamanho da amostra.

Por outro lado, considerando a lesão por isquemia reperfusão um quadro de IRA, sabe-se que os pacientes idosos são mais suscetíveis ao desenvolvimento de IRA.²⁸ No contexto do transplante renal, alguns fatores devem ser considerados no que diz respeito à idade e fatores de risco para a IRA. Sabe-se ainda que há maior risco de idosos não recuperarem a função renal após um episódio de IRA.²⁹ Comorbidades como aterosclerose e insuficiência cardíaca podem ter impacto durante o procedimento cirúrgico do transplante renal, com alterações na hemodinâmica e perfusão do órgão transplantado. A aterosclerose e a HAS impedem a capacidade de autorregulação da perfusão durante um episódio hipotensivo, assim, quedas modestas na PAM podem estar associadas à danos isquêmicos significativos do enxerto. Esses fatores hemodinâmicos podem ser uma explicação para a ativação da caspase-3 ser significativamente maior em indivíduos mais velhos.

Nesse estudo, o TIF não teve relação com a imunohistoquímica para caspase3. Outros estudos já demonstraram a ativação da caspase com a isquemia fria. Experimentalmente Turkmen et al mostraram ativação da caspase-3 em rins de ratos submetidos a isquemia fria, comparado a controles sem essa exposição.²² Já Scucisnksy et al em um estudo com porcos, mostraram que há diferença na ativação da caspase-3 com tempo de isquemia fria, principalmente acima de 48 horas.³⁰ Não há estudos clínicos que correlacionem a imunohistoquímica para caspase-3 com o

tempo de isquemia fria, principalmente acima de 48 horas, porém nosso resultado é condizente com os achados dos estudos experimentais, que não demonstram correlação com a atividade da caspase-3 quando a isquemia fria é menor do que 48 horas.

No presente estudo não foi observada uma correlação entre a positividade para caspase e os achados anátomo-patológicos de lesão por isquemia e reperfusão. A positividade para marcadores bioquímicos nem sempre está associados a alterações patológicas à microscopia ótica já que pode ocorrer a ativação da caspase sem qualquer indicação de apoptose na avaliação morfológica. Estudos com outras etiologias de IRA também não encontraram essa correlação. Langenberg et al em um estudo com ovelhas sépticas não conseguiram demonstrar associação entre mudanças histopatológicas (com marcadores de apoptose em medula renal), bioquímicas em animais com insuficiência renal aguda.³¹ Uma metanálise do mesmo grupo mostrou que os achados histopatológicos não específicos são os mais comuns em IRA associada à sepse e que também ocorre ativação das vias da apoptose nesse subtipo de IRA.³²

Todos os órgãos avaliados neste estudo foram submetidos à preservação estática, sendo assim, não foi possível avaliar se há diferença na ativação dos mecanismos de apoptose entre os órgãos mantidos sob preservação estática ou dinâmica com máquinas de perfusão. Wszola et al fizeram tal avaliação e determinaram que na perfusão estática há maior ativação de genes relacionados à hipóxia, associados à piores desfechos histológicos a longo prazo, como atrofia tubular e fibrose intersticial.⁸ As soluções de perfusão são utilizadas com o objetivo de reduzir a velocidade das reações da lesão por isquemia-reperfusão. Duas soluções de perfusão foram utilizadas, a Euro-collins e Custodiol, e não houve diferença na ativação da caspase-3 entre as duas. Outras soluções já foram analisadas quanto à ativação da caspase-3 em estudos experimentais e o Biolasol® Plus reduziu de forma significativa a ativação dessa enzima tanto no córtex quanto na medula de rins porcinos.³⁰

Um outro fator importante para o desfecho a curto prazo do transplante renal pode ser considerado o *status* hemodinâmico do receptor durante o procedimento cirúrgico. Um estudo com receptores pediátricos determinou o valor ideal de pressão arterial média durante a cirurgia. Houve forte correlação entre o *clearance* de creatinina no primeiro pós operatório com a PAM 10 minutos após a reperfusão. A

perfusão do enxerto é diretamente dependente do débito cardíaco do receptor.³³ Considerando os receptores adultos portadores de comorbidades que podem alterar o débito cardíaco e a própria vasodilatação decorrente dos anestésicos, é concebível que ocorra uma redução significativa no fluxo renal, como já descrito anteriormente.

Os fatores hemodinâmicos dos receptores não foram avaliados nesse estudo e podem ter relação com a ativação da caspase-3 nessa população estudada.

O principal fator de limitação do presente estudo é o n limitado para análise. O objetivo inicial era avaliar se o marcador imunohistoquímico para caspase-3 é positivo em enxertos renais de doadores falecidos e tal objetivo foi alcançado. Há muitas variáveis para análise e fatores de confusão entre parâmetros de doador, preservação do órgão, características da cirurgia e do receptor do órgão. Ampliar o número de pacientes pode facilitar a comprovação de diferença na ativação das vias de apoptose em subpopulações.

Através deste estudo, demonstrou-se a ativação da enzima caspase-3 em enxertos renais de doadores falecidos, positiva em mais de 80% da amostra avaliada, comprovando que a lesão por isquemia-reperfusão ocorre na maioria dos receptores de rim em graus diferentes. A ausência de correlação com os achados histopatológicos e as variáveis clínicas dos receptores sugere que os desfechos nesses pacientes são multifatoriais, condicionados pela interrelação dos múltiplos parâmetros doador-órgão-receptor, que é única em cada caso.

REFERÊNCIAS

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *New England Journal of Medicine*. 1999; 341:1725.
2. Schröppel B, Legendre C. Delayed kidney graft function: from mechanism to translation. *Kidney International*. 2014; 86: 251-258.
3. Kezic A, Stajic N, Thaiss F. Innate Immune response in Kidney Ischemia/reperfusion injury: potential target for therapy. *Journal of Immunology research*. 2017; 1-10.
4. De Rosa S, Antonelli M, Ronco C. Hypothermia and kidney: a focus on ischaemiareperfusion injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2017; 32: 241-247
5. Ponticelli CE. The impact of cold ischemia time on renal transplant outcome. *Kidney International*. 2015; 87:272-275.
6. Brentnall M, Rodrigues Menocal L, De Guevara RL *et al*. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology* 2013, 14:32.
7. Gobe G. Identification of Apoptosis in Kidney Tissue. *Methods in Molecular Biology*. 2007; 466: 175-192.
8. Wszola M, Kwiatkowski A, Domagala P *et al*. Preservation of kidneys by machine perfusion influences gene expression and may limit ischemia/reperfusion injury. *Progress in Transplantation*. 2014; 1: 1-26.
9. Westphal GA, Caldeira Filho M, Vieira KD *et al*. Diretrizes para manutenção de múltiplos órgãos no potencial doador adulto falecido. Parte I. Aspectos gerais e suporte hemodinâmico. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2011; 23(3): 255-268
10. Baptista APM, Silva Jr HT, Pestana JOM, Influência da manutenção hemodinâmica do doador falecido na função renal do receptor de transplante renal. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2013; 35(4): 289-298.
11. Malinoski DJ, Patel MS, Ahmed O *et al*. The Impact of Meeting Donor Management Goals on the Development of Delayed Graft Function in Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation* 2013; 13: 3-1000.
12. Schröppel B, Legendre C. Delayed kidney graft function: from mechanism to translation. *Kidney International*. 2014; 86: 251-258.

- 13.Helfer MS, Vicari AR, Spuldaro F et al. Incidente, Risk Factors, and Outcomes of Delayed Graft Function in Deceased Donor Kidney Transplantation in a Brazilian Center. *Transplantation Proceedings*. 2014; 46: 1727-1729.
- 14.Santes-Freitas TV, Felipe CR, Aguiar WF et al. Prolonged Delayed Graft Function is Associated with Inferior Patient and Kidney Allograft Survivals. *PLoS ONE* 10(12):e0144188. doi:10.1371/journal.pone.0144188.
- 15.Perico N, Cattaneo Dm Sayegh M, et al, Delayed graft function in kidney transplantation. *The Lancet*. 2004; 13: 1814-1827.
- 16.Sociedade Brasileira de Nefrologia. Censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia 2016. Disponível em: <censo-sbn.org.br/censosAnteriores> Acesso em: 25 de julho de 2017.
- 17.Fernandes NMS, Chaoubah A, Bastos K et al. Geografia da dialise peritoneal no Brasil: análise de uma coorte de 5819 pacientes (BRAPD). *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2010; 32(3): 268-274.
- 18.DeMoraes TP, Figueiredo AE, Campos LG et al. Characterization of the BRAZPD II cohort and description of trends in peritoneal dialysis outcome across time periods. *Peritoneal Dialysis International*. 2014; 34: 714-723.
- 19.Debout A, Foucher Y, Trébern-Launay et al. Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney International*, 2015; 87: 343-349.
- 20.Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Registro Brasileiro de Transplante 2016. São Paulo, 2016.
- 21.Mota LS, Oliveira CMC, Pinheiro Junior FML et al. Estudo comparativo entre transplantes renais com doador falecido critério expandido e critério padrão em um único centro no Brasil. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2016; 38(3): 333-343.
- 22.Turkmen K, Martin J, Akcay A et al. Apoptosis and Autophagy in Cold Preservation Ischemia. *Transplantation*. 2011; 91(11): 1192-1197.
- 23.Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM et al. Activation of Mitochondrial Apoptotic Pathways in Human Renal Allografts after ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 2003; 76: 50-54.
- 24.Oberbauer R, Rohrmoser M, Regele H et al. Apoptosis of Tubular Epithelial Cells in Donor Kidney Biopsies Predicts Early Renal Allograft Function. *Journal of American Society of Nephrology*. 1999; 10: 2006-2013.

- 25.Schindowski K, Leutner S, Müller W *et al.* Age-related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes. *Neurobiology of Aging*. 2000; 21:661-670.
- 26.Pollack M and Leeuwenburgh. Apoptosis and aging: Role of Mitochondria. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*. 2001; 56A:B475-B482.
- 27.Yang H and Fogo A. Cell Senescence in the Aging Kidney. *Journal of American Society of Nephrology*. 2010; 21:1436-1439.
- 28.Rosner MH. Acute Kidney Injury in the Elderly. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2013; 29:565-578.
- 29.Kusaka J, Koga H, Hagiwara S *et al.* Age-dependent responses to renal ischemiareperfusion injury. *Journal of Surgical Research*. 2012; 172(153-158).
- 30.Skucinski J, Dabrowska M, Starek M *et al.* Application of analytical techniques to monitoring of kidney viability before transplantation during storage in ViaSpan® and Biolasol® Plus preservation solutions. *Analithical Methods*. 2014; 6:9093-9100.
- 31.Langenberg C, Gobe G, Hood S *et al.* Renal Histopathology During Experimental Septic Acute kidney injury and recovery. 2013; 42(1):58-67.
- 32.Kosaka J, Lankadeva YR, May CN *et al.* Histopathology of septic acute kidney injury: a systematic review of experimental data. *Critical Care Medicine*. 2016; 1-10.
- 33.Michelet D, Brasher C, Marsac L. Intraoperative hemodynamic factors predicting early postoperative renal function in pediatric kidney transplantation. *Pediatric Anesthesia*. 2017; 27:927-934.

Evaluation of Ischemia-Reperfusion Injury through Immunohistochemistry for Caspase-3 in renal grafts from deceased donors

Itamara Pereira Danucalov¹

Silvia Regina Hokazono²

Alexandre Tortoza Bignelli²

Roberto Ceratti Manfro³

1. Medical Science Post Graduation Program, Federal University of Rio Grande do Sul.

1,2. Renal Transplant, Cajuru University Hospital, Curitiba, PR, Brazil

³Nephrology, Clinical Hospital of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence

Dr. Roberto Ceratti Manfro

Nephrology

Clinical Hospital os Porto Alegre

Ramiro Barcelos, 2350, room 2030

90035-003 – Porto Alegre, RS, Brazil

Telephone: +55512101-8295 Fax (51) 21018001

E-mail:manfro@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

The number of patients waiting for a kidney transplant and the organs offered are disproportional. Some factors can alter the outcome of a kidney transplant in short and long term, as the ischemia reperfusion lesion (IRL), associated with the cold ischemia time (CIT) and the reperfusion of the transplanted organ. This lesion is diagnosed by the identification of apoptosis on the graft. The caspase family of proteins are activated in the process of apoptosis and its identification by immunohistochemistry has been validated by other studies. In this project, we aim to correlate the cares with the potential organ donor with ischemia reperfusion lesion and short terms outcomes in the kidney graft recipient, as delayed graft function (DGF) and renal function on the first year post transplant. Twenty-eight kidney grafts from deceased donor were submitted to biopsy after artery unclamp and organ reperfusion to analysis by caspase-3 immunohistochemistry. This marker presence was quantified and correlated to clinical and laboratory donor and receptor parameters and transplant data as CIT and DGF. 82.14% of the grafts presented with positive immunohistochemistry for caspase-3. The patients were enrolled in four different groups according to the positive caspase area: group 1 – negative immunohistochemistry, group 2 – positive immunohistochemistry between 0 and 1% of kidney tissue, group 3 – between 1 and 5%, group 4 – area higher than 5%. There was no difference between these groups regarding to donor parameters. Group 1 had the younger recipients with higher creatinine after 180 days, which was not observed in glomerular filtration rate (GFR) estimated by CKD-EPI equation. The histopathologic findings were not different and neither the rejection rate. The caspase-3 immunohistochemistry is a reliable manner to identification of apoptosis in deceased donors kidney grafts.

Key words: kidney transplant. Ischemia reperfusion injury. Immunohistochemistry. Caspase-3

Introduction

Kidney transplant is the gold standard treatment for Terminal Chronic Kidney Disease (TCKD)¹. The short, medium and long-term outcomes are correlated to receptor, organ preservation and donor variables. The donor main factors are age, hemodynamic status, death cause, sex, time in intensive care. Related to the recipient, it is important the Panel reactive antibody (PRA), age, primary kidney disease, immunosuppression protocols, mismatches of Human Leukocyte antigen (HLA). The organ preservation, cold ischemia time (CIT), types of preservation solution e preservation methods are the factors related to the graft. All these factors are associated to the development of delayed graft function (DGF), which is characterized by the need of hemodialysis in the first week after the transplant and has direct impact on the graft survival.²

One of the main causes of DGF in deceased donor kidney receptor is the ischemia-reperfusion injury that occurs when there is an imbalance between the demand and the offer of oxygen and glucose, followed by the organ reperfusion. The ischemia forces the cells to maintain anaerobic metabolism for the production of triphosphate adenosine (ATP), which causes cellular acidosis. The ATP depletion is followed by events that alter all the tubular homeostasis as cytoplasmatic calcium overload, with activation of proteases, fosfolipases and caspases, with accumulation of hypoxanthine and oxygen reactive species (ORS).³ In mitochondrial level, ATP depletion causes interruption of ATP dependent ions pumps transport, leading to mitochondrial edema and rupture of outer membrane, which causes secretion of pro inflammatory chemokines. One of the initial manifestations is the loss of tubular cells polarity, with impaired water and sodium uptake, which activates the tubuloglomerular feedback, inducing vasoconstriction of afferent arteriole.⁴ The vasoconstriction, associated to leukocyte blood vessels obstruction and coagulation cascade compromises the microcirculation and creates ischemia of the renal medulla. The ischemic organ reperfusion results in inflammation and oxidative damage.⁵ By the beginning of reperfusion, the cortical circulation is established, but in the distal portion of medulla, the hypoperfusion persists and it's characterized by congestion of peritubular capillaries with secondary permeability increase and expression of adhesion molecules, chemokines and toll like receptors (TLR) and complement

receptors. These events culminate in inflammatory responses and justify the risk of rejection in the presence of ischemia-reperfusion injury.

The lesions to the organ culminate in the activation of cellular apoptosis mechanisms. The initiation and execution of this process are regulated by protein BCL-2 (B cell lymphoma) and by proteins of the caspase family. The caspases play a crucial role in the apoptosis signal transduction. The 2,8,9,10 and 12 are called initiators caspases and 3,6 and 7 are called the effectors. The effectors caspases are responsible for the execution of the apoptosis process with fragmentation of DNA, cell shrinkage and membrane disrupter, besides mitochondrial remodeling, production of ROS and protein cleavage. The caspase-3 is considered the leading executor of apoptosis.⁶ The in situ localization of activated caspases is considered more favorable to marking apoptotic cells than the previous method, called TUNEL (TdT-mediated dUTP-TMR Nick End Labeling), which identifies through deoxyribonucleotides polymerization in 3' zones in single or double chains, in other words, detect fragmented DNA, but this can found in situations other than apoptosis.⁷ Studies in transplant with deceased donor have demonstrated caspase-3 gene activation related to CIT, besides other genes and proteins. It seems that the apoptosis degree correlates to Cold Ischemia Time. Those genes activation are correlated also with DGF and renal function in the first year after transplant.⁸

Considering the kidney transplant the gold standard Renal Replacement Therapy and the number of patients waiting for a transplant, measures to improve the quantity and quality of the organs offered should be obtained. The Brazillian Intensive Care Association (AMIB) and the Brazilian Organ and Tissue Transplant Association (ABTO) have guidelines with goals for the care of the potential donor with the aim to reduce the donor losses and increase the quality and effectiveness of transplants.⁹ Some studies have demonstrated the correlation to donor care with the receptor post-transplant evolution,¹⁰ but a study by Malinoski et al was able to objectively prove that the success in the goals of donor care has an impact on the recipient outcomes.¹¹

The main definition of DGF in the literature is the need of dialysis in the first week after kidney transplant.¹² It's incidence is variable, related between 2 to 50%. In Brazil, this incidence is higher, up to 70% in some studies.¹³ For the development of the DGF, there are risk factors related to the donor, the recipient and the care with the organ. A national single-center study showed that patients with prolonged DGF (greater than 15 days) had lower GFR at the end of first month, which was maintained

for the first year after transplantation.¹⁴ In the long term, DGF is an independent factor for graft loss with a RR of 2,9 when compared to immediate function kidneys.¹⁵

Material and methods

Patients

In the period between January 2016 and April 2017, twenty-eight renal grafts from deceased donors underwent renal biopsy at time zero. Patients who received those grafts were followed for 6 months after kidney transplantation.

The exclusion criteria were age less than 18 years, non-compliance and signing of the Informed Consent Form (ICF) and kidneys from the same donor.

The study was approved by the Medical Ethics Committee of Pontific Catholic University of Paraná, linked to the CEP/CONEPE system, directly linked to the National Health Council (CNS).

Graft biopsy

The grafts from deceased donor were submitted to biopsy between three and thirty minutes after renal artery unclamping and organ reperfusion. The needle used was Ecomed's Trucore II of 16 gauges. The fragments were fixed in 10% formaldehyde buffer solution and subjected to routine histological processing, followed by standard dehydration, diaphanization and paraffin embedment steps. Histological sections with 3µm thickness were stained with Hematoxylin and Eosine.

Immunohistochemistry

After histological processing described previously, 3µm slices were deposited on positively charged slides. Subsequently the sections were dewaxed in xylol, rehydrated and processed for immunohistochemistry. In immunohistochemistry, the rehydrated sections were incubated with 3% H₂O₂ in methanol to block the endogenous peroxidase. Antigen retrieval was performed in 10mM Sodium Citrate buffer pH 6.0 at 95°C for 40 minutes. Possible non-specific binding as well as free aldehyde radicals were blocked by incubating 5 minutes with PBS containing 1% BSA and PBS containing 0,1M Glycine, respectively. Subsequently, the cuts were incubated for 12 hours at 4°C with the Caspase-3 primary antibody (Biocare Medical CP229, Rabbit IgG, diluted 1:100).

After the incubation time, slides were incubated with specific secondary antibodies. The secondary antibodies used were incubated for 30 minutes at room temperature, as follows: rabbit biotinylated secondary antibody against rabbit IgG (Vector Laboratories, BA-1400, diluted 1:200), after incubation with the secondary antibody, incubation with streptavidin conjugated to peroxidase for 30 minutes. Revealing binding of the primary antibodies were performed with DAB (“3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride”) (DAB substrate Kit, BD Pharmigen). Then, the cuts were dehydrated in a growing battery of ethanol. After incubation in xylene, the standing slides were assembled with Entellan (Merck®).

For quantification of DAB marking, image J software (NIH) was used, using labeled or immunoblotted and DAB-labeled blades, where DAB (brown) labeling of hematoxylin (blue) was separated and the percentage of the labeled area quantified.

Clinical evaluation

The records of 28 kidney grafts recipients were analyzed with respect to age, CKD diagnosis, Renal Replacement Therapy (RRT) time, method, and PRA.

The following clinical parameters were evaluated in the post-transplant period—number of HLA MM, presence of DGF, rejection, kidney function (through serum creatinine dosage) and the estimation of glomerular filtration rate through CKD EPI formula in the 1, 3 and 6 months post-transplant.

Donors

Data analysis of deceased donors provided through the Transplant Center of the State of Paraná was carried out with emphasis on the parameters of care with the possible organ donor stipulated by AMIB and ABTO at the pre capture time: Mean Arterial Pressure, Arterial Oxygen Saturation, Oxygen Partial Tension, Urinary output, blood pH, blood glucose levels, vasoactive drugs, serum Sodium.

Statistical analysis

The data were processed and analyzed using IBM software SPSS, version 25. The descriptive analyzes of the continuous variables were expressed as means with standard deviation and medians, and categorical variables with absolute frequency. Wilcoxon-Mann-Whitney and Kruskal Wallis test were used to compare continuous

variables, followed by multiple comparison tests. Categorical variable were compared by chi-squared. The level of statistical significance was considered $p < 0.05$.

Results

In total, analyzes were performed on 28 kidney grafts from deceased donors in this study. One recipient presented venous thrombosis of the graft in the second postoperative period and underwent transplantectomy. One patient have died for complications of a Acute Myocardial Infarction. Analyzes of donor characteristics and immunohistochemistry for caspase-3 were performed in 28 cases. Clinical outcomes analysis were performed in 26 cases.

Characteristics of kidney transplant recipients

The characteristics of kidney transplant recipients are in Table 1.

Table 1. Demographic and clinic characteristics of patients evaluated

N Total	28
Sex (male/female)	15(53.7%)/13(46.4%)
Age at transplant (years)	51.39 ±2.40
Dialysis method	
HD	19 (67.8%)
PD	9(32.14%)
Primary kidney disease	
SAH	13(46.2%)
CGN	5(17.8%)
DM	4(14.2%)
APKD	4 (14.2%)
Others	2(0.07%)
Time in RRT (month)	28.6±4.71

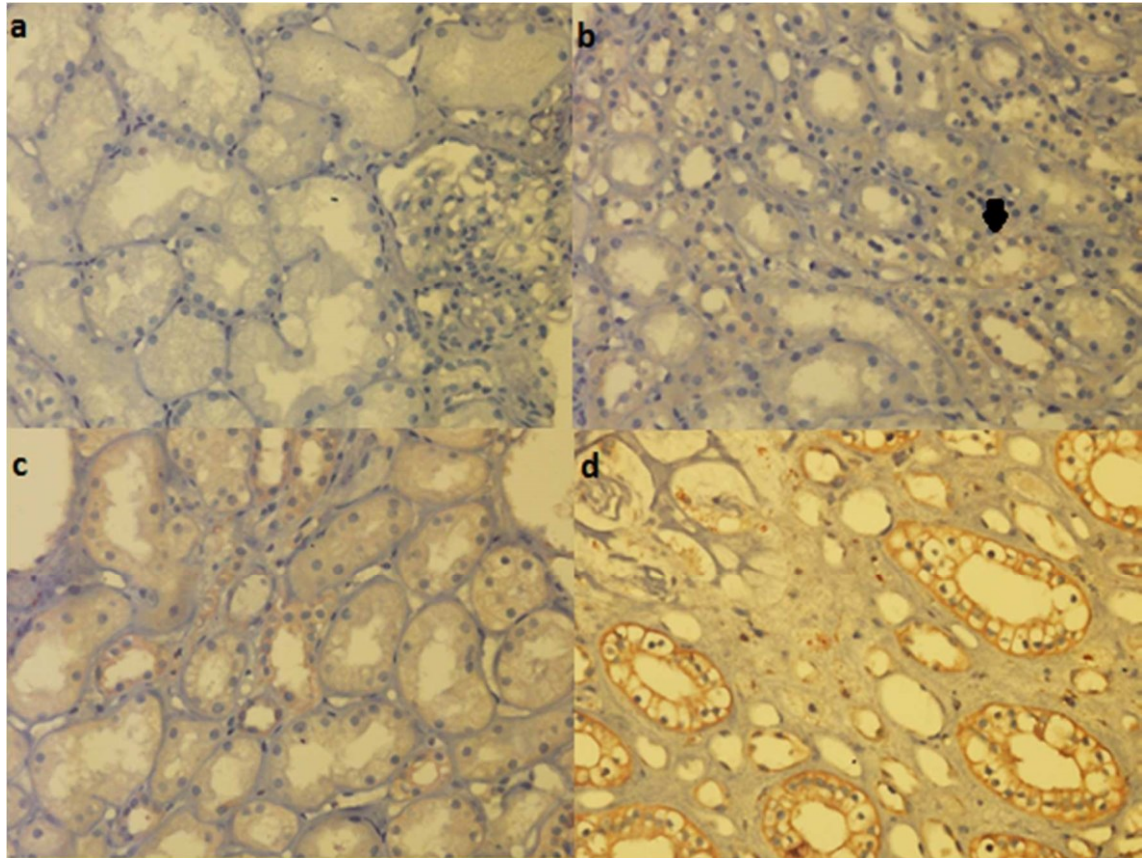
Abbreviations: HD: Hemodialysis; PD: Peritoneal Dialysis; SAH: Systemic Arterial Hypertension; CGN: Chronic Glomerulonephritis; DM: Diabetes Mellitus; APKD: Autosomal Polycystic Kidney Disease; RRT: Renal Replacement Therapy

Regarding to the transplant, the CIT median was 18 hours and 33 minutes, varying between 12 hours and 14 minutes and 23 hours and 48 minutes. The median of HLA MM was 4, 14 patients presented DGF (50%) and among them the median number of hemodialysis sessions was 5.5. The median day of hospital discharge was 13.5, with a median creatinine level of 2.29mg/dL.

Immunohistochemistry

Analysis of caspase-3 by immunohistochemistry was performed in 28 grafts. The results of immunohistochemistry are presented in Table 2. The sample was divided into four groups according to the percentage of the kidney tissue positive for caspase-3 immunohistochemistry. In Figure 1 representative immunohistochemistry of each group are shown according to the labeling.

Figure 1. Histological section with immunohistochemistry for caspase-3



200-fold increase. **a-** group 1 – sample negative to caspase-3, only the bluish coloration resulting from hematoxylin labeling is observed, **b-** group 2 – positive sample in area between 0-1% for caspase-3, with minimal areas with brown color (arrow), **c –** group 3 – positive sample in area between 1-5% for caspase-3, tubular cells show brown coloration, **d –** group 4 – positive sample in an area > 5%, tubular cells show intense brown coloration.

Table 2. Labeling of Caspase-3 in renal tissue in post-reperfusion biopsies

Caspase Group	1	2	3	4
% of labeled renal tissue	0	>0 e < 1%	1-5%	> 5%
Number of cases and %	5 (17,8)	11 (39,2)	8 (28,5)	4 (14,2)

Data related to donors

The characteristics of the donors are in table 3.

Table 3. Demographic and clinical characteristics of the donors

N total	28
Age (years)	44.45±2.22
Sex (male/female)	21(75%) / 7 (25%)
Ethnicity (caucasian/not caucasian)	20 (71.4%)/8(28.57%)
Cause of BD	
CET	14 (50%)
CVA	12 (42.85%)
other	2 (0.07%)
CA	5 (17.85%)

Abbreviations: BE: Brain death; CET: Cranioencephalic trauma; CA: Cardiac arrest.

Seven donors (25%) had previous diagnosis of Systemic Arterial Hypertension and only one (3,5%) of Diabetes Mellitus.

Regarding the donor care before organ removal, mean MAP was 98.39mmHg (SD 3.48) e only one patient (3%) had AMP less than 65mmHg, outside the target range. Arterial oxygen averaged 96.92%. Urinary Output was less than 0.05ml/Kg/hour in two donors (7.1%), and nineteen (67%) had polyuria. Twenty-five donors (89.2%) were in vasoactive drugs, the majority (57%) with norepinephrine at a dose between 0.05 and 0.09 mcg/Kg/min.

Hemoglobin concentration averaged 10.94 g/dL (SD 0.42), but with ten donors (35%) presenting values below the ideal of 10 g/dL. Regarding glucose levels, twenty (71.5%) had values outside the recommended range between 140 and 180 mg/dL and only eight (28.5%) with values in this range. Serum sodium had a mean of 150.6 mg/mL (SD 1.54). Blood pH had a mean of 7.35 (SD 0.02), with five individuals (17.8%) presenting values lower than 7.30, and Arterial Carbon Dioxide Tension had an average of 40.2 mmHg (SD 2.7). Serum creatinine prior to organ removing was 1.2 mg/dL (SD 0.1). Four donors (14%) were classified as Expanded Criteria donors.

Evaluation of Caspase-3 expression with donors, recipients and outcomes

The 28 grafts were divided into 4 groups according to the percentage of renal tissue positive in immunohistochemistry for caspase-3 (Table 2). These groups were analyzed for characteristics of donors, recipient's short term outcomes.

Caspase-3 expression related to donor data

Donor related variables were evaluated in the 4 Caspase-3 Expression groups and are shown in Table 4

Table 4. Donors characteristics in 4 groups

Donor characteristics (n total = 28)	Group 1 (n 5)	Group 2 (n 11)	Group 3 (n 8)	Group 4 (n 4)	p value
Age (years)	46	45	49	40	0.854
Sex (male/female) (%)	60/40	72/28	100/0	50/50	0.215
Ethnicity (caucasian/not caucasian)	20/80	72/27	87.5/12.5	100/0	0.032
Morbidities					
SAH	40	9	37.5	25	0.448
DM	0	0	12.5	0	0.475
Cause of Brain Death					
CVA (%)	40	45	50	25	0.871
CET (%)	60	45	50	50	0.964
other (%)	0	27	12,5	20	0.411
CA	0	27	12	25	0.578
Biochemistry					
Creatinine before organ removal (mg/dL)	1.1	1.07	1.34	1.24	0.657
Hemoglobin (g/dL)	10.4	12.4	10.85	9.4	0.717
Glucose (mg/dL)	177	173	239	213	0.598
Seric sodium (mg/dL)	159	149	149,5	150	0.295
pH	7.35	7.31	7.38	7.3	0.835
paO ₂	160	102	150	158	0.17
SaO ₂	97	98	99	94	0.859
Donor AMP (mmHg)	97	92	115.5	94	0.389
UO					
<0.5ml/Kg/h (%)	20	0	12.5	0	0.449
0.5-1ml/Kg/h (%)	0	0	50	75	0.005
>2500ml/24h (%)	75	100	37,5	25	0.008
Vasoactive drugs(%)	75	81	100	100	0.486
Norepinephrine					
<0,05mcg/Kg/min (%)	40	9	12.5	25	0.484
0.05-0.09 mcg/Kg/min (%)	40	72	62.5	75	0.675
1-2 mcg/Kg/min (%)	0	0	20	0	0.158
Vasopressin (%)	20	18	25	0	0.836
Expanded criteria (%)	0	0	37.5	25	0,097

Abbreviation: SAH: Systemic Arterial Hypertension; DM: Diabetes Mellitus; CVA: Cerebralvascular accident, CET: Cranioencephalic Trauma, CA: Cardiac arrest; paO₂: Arterial Oxyten tension; MAP: mean Arterial Pressure; UO: Urine output.

The organs were preserved in a statically in two different types of solutions, Eurocollins and Custodiol®. There was no statistically significant difference between the perfusion solution and the groups (p value 0.369).

Caspase-3 expression related to recipient data

Recipient related variables were evaluated in the 4 Caspase-3 Expression groups and are shown in Table 5.

Table 5. Recipient characteristics in 4 groups

Variables (N total = 28)	Group 1 (n 5)	Group 2 (n 11)	Group 3 (n 8)	Group 4 (n 4)	p value
Age (years)	43	58	57.5	53	0.05
Sex (male/female) (%)	60/40	63/37	25/75	50/50	0.227
Ethnicity (caucasian) (%)	20	72	87.5	50	0.086
Primary disease					
SAH (%)	0	36	40	50	0.638
DM (%)	0	27	12	0	0.403
CGN (%)	60	0	0	50	0.006
APKD (%)	20	27	0	0	0.318
other (%)	20	9	25	0	0.158
RRT method					
HD (%)	80	63	37.5	100	0.166
PD (%)	20	36	62.5	0	0.166
Time in RRT (month)	15	22	20	17.5	0.825
Transplant					
CIT (hours)	18.71	18.75	17.94	17.68	0.983
DGF (%)	60	45	37.5	75	0.631
Number of HD sessions	1	0	0	4	0.697
PRA (%)	0	0	28.5	0	0.145
PRA > 30% (%)	0	9	50	25	0.110
MM	3	4	4	4	0.926
Induction Therapy (%)	40	44	75	50	0.380
Hospital discharge (days)	10	12	22	16	0.197
Discharge creatinine (mg/dL)	2.55	2.29	1.93	2.48	0.425
30-days Creatinine (mg/dL)	2.1	1.58	1.11	1.5	0.266

90-days Creatinine (mg/dL)	2.3	1.15	1.29	1.27	0.098
180-days Creatinine (mg/dL)	2	1.15	1.22	1.33	0.184
180 days CKD EPI (mL/min)	30	66	62	54	0.46

Abbreviations: SAH: Systemic Arterial Hypertension; DM: Diabetes Mellitus; CGN: Chronic Glomerulonephritis; APKD: Autosomal Polycystic Kidney Disease; RRT: Renal Replacement Therapy; HD: Hemodialysis; PD: Peritoneal Dialysis; CIT: Cold Ischemia time; DGF: *delayed graft function*; PRA: Panel of Reactive Antibodies; MM: HLA mismatches, CKD EPI: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration.

All the recipients received a Tacrolimus dose prior to the surgical procedure.

Rejection

Among the 26 patients analyzed, there were four episodes of biopsy proven acute rejection (15%), two in the group 2 and two in the group 3. The patients in the group 2 had de diagnosis the Cellular Acute Rejection, Banff IA, one of them in the 45th postoperative period and other in the 180th period. In group 3 there was a diagnosis of Humoral Acute Rejection Banff IIB in the 13th postoperative period and another Cellular Acute Rejection Banff IIA in the 16th period. There was not statistically significant difference in the incidence of rejection among the 4 groups nor in the time for the diagnosis of rejection.

Biopsy

There was no correlation between caspase-3 positivity in time zero biopsies with anatomopathological findings of these same biopsies. We analyzed the presence of Tubular atrophy and interstitial fibrosis, Ischemia-reperfusion Injury and Arteriosclerosis. None of the biopsies presented with Acute Tubular Necrosis features (ATN).

Discussion

In this study, renal grafts from 28 deceased donors were evaluated for the presence of the immunohistochemistry marker for caspase-3 in biopsies in time zero, after arterial unclamp.

The characteristics of kidney recipients reflect partially the Renal Replacement Therapy (RRT) patients in Brazil. Most had as a method of RRT hemodialysis (67.8%), according to the Brazilian Census of Chronic Dialysis 2016, 90% of dialysis patients in Brazil are on Hemodialysis and only 7.9% are on Peritoneal Dialysis, in our study, 32% of the recipients had this dialysis method.

The majority (57%) of patients in RRT in Brazil are male and in our sample, this percentage is 53%. The prevalent primary kidney disease as the census is SAH, with 34%, followed by DM (30%), CGN (9%) and APKD (4%).^{16, 17, 18} In this study, the main diagnosis was also the SAH present in 46.4% of recipients, but the second most prevalent morbidity was the GNC in 17.8% of patients and the DM and APKD were the cause of CKD in 14.2%.

The CIT in these transplants did not differ of the averages found in the literature. In a French cohort of 4777 patients, mean CIT was 20.6 hours with the majority of cases showing interval between 16 and 24 hours.¹⁹ In this analysis, the risk of DGF was directly proportional to the CIT, with 40% of DGF in the cases with CIT above 24 hours and each extra cold ischemia hour had increased mortality. In our data, DGF occurred in 50% of patients, but there was no relation with the CIT.

Donors of this study present similar characteristics to donors in Brazil and in the State of Paraná in 2016, according to Brazilian ABTO data, with a predominance of males and higher prevalence of an age interval between 50 and 64 years.²⁰ In this study the Caucasian ethnicity was prevalent, which probably reflects the racial and historical features of the State. The cause of death, however, differs from national and local characteristics; there was in this study a predominance of CET (50%) above the VCA (42%), but without a significant statistical difference.

Caring for donors proved to be regular when compared to the criteria established by AMIB⁹. In terms of MAP, only one patient (3%) presented lower values than the one determined. With respect to the concentration of hemoglobin, 35% had levels below 10 g/dL, which could be easily corrected with blood transfusion. The most worrying feature was the serum glucose, with 71% of donors with ranges outside those recommended by AMIB, between 140 and 180 mg/dL, which is amenable to correction within an intensive care setting, such as the use of intravenous insulin. Most of the donors also showed high natremias with values above those recommended for 145mg/dL, probably reflecting the state of polyuria, since 67% had urine output above 2500 mL in 24 hours. There are insufficient criteria for the diagnosis of Diabetes

insipidus, but this is the main hypothesis for polyuria and hypernatremia in cases of brain death, and the treatment is possible with DDAVP or vasopressin, since the central cause is the principal in these cases.

It is also noticeable the presence of acidosis in 17.8% of donors, who had blood pH lower than 7.30. The AMIB recommendation is that the pH of potential donors should be maintained above the 7.20 range, which did not occur in two donors (7%). None of the donors presented all hemodynamic parameters or biochemical out of targets defined by AMIB. Malinoski et al. showed in a study of donors parameters, that in those in which the goals were reached (seven of hemodynamic and biochemical items), DGF was less frequent (17% x 30%).¹¹

In this group studied, 14% of the donors classifies as expanded criteria donors by UNOS. In a recently published national study, the prevalence of 9.4% of expanded criteria donors was shown, with no difference in the DGF,²¹ similarly in our analysis there was no difference in this regard.

Of the 28 grafts studied, 23 (82.14%) presented positivity in Immunohistochemistry for the marker of apoptosis, caspase-3, in different proportions of renal tissue, demonstrating activation of these pathways. Experimental studies have demonstrated activation of caspase pathway in cold ischemia through the analysis of the of caspase-3 expression by Western Blot.²² In 2003, Castaneda et al demonstrated through immunohistochemistry, positivity for pre-apoptotic markers in deceased donor grafts.²³ In 2006, Oberbauer et al., demonstrated again in kidney grafts apoptotic cells and that the number of these cells can be predictive of short-term outcomes in patients.²⁴ Their main result was to show that patients with DGF and without signs of rejection had a rate of apoptotic cells increased when compared to those with immediate graft function or early rejection.

In our study, we divided patients into four groups. When comparing the groups with the characteristics of the recipients, a significant difference could be observed in the age of the recipients, being the one that did not present labeling with Caspase3 the one of younger age. Previous studies have shown that the process of apoptosis increases in some tissues with aging. Oxidative stress increases with age and can exacerbate the cellular damage,²⁵ in addition, there is an increase in the production of advanced glycation end products (AGEs) who are also implicated in the induction of apoptosis. Alternatively, it has been suggested that the accumulation of free radicals leads to damage of mitochondrial DNA, and this may trigger the process of apoptosis.

²⁶ It was also previously established that the aging process is related to increased apoptosis in lymphocytes, in the skeletal muscle tissue and myocytes.^{25,26}

Cellular aging changes also occur in the renal tissue leading to an imbalance between cellular proliferation and repair versus apoptosis and cell death.²⁷ However, these mechanisms may not only occur with aging, but can also be related to aggression and senescent cells are more susceptible to apoptosis. This mechanism might explain the occurrence of apoptosis in donor organs, however, in the present study, the difference did not reach statistical significance, perhaps due to the sample size.

On the other hand, considering the ischemia reperfusion injury as ARF, it is known that the elderly patients are more susceptible to development of ARF.²⁸ In the context of renal transplantation, some factors should be considered with regard to age and risk factors for ARF. It is also known that there is a higher risk of elderly people not recovering kidney function after an episode of ARF.²⁹ Comorbidities as atherosclerosis and heart failure can have an impact during the surgical procedure of kidney transplant, with changes in hemodynamics and perfusion of the transplanted organ. Atherosclerosis and SAH impair the ability to self-regulate perfusion during a hypotensive episode, so modest falls in MAP may be associated with significant ischemic damage of the graft. These hemodynamic factors may be an explanation for the activation of caspase-3 be significantly greater in older individuals. In this study, the CIT had no relationship with Immunohistochemistry for caspase-3. Other studies have demonstrated the caspase activation with cold ischemia. Experimentally Turkmen et al. showed activation of caspase-3 in kidneys of rats submitted to cold ischemia, compared to controls without this exposure.²² Scucisnksy et al. also showed, in a study with pigs, that there is difference in activation of caspase-3 with cold ischemia time mainly over 48 hours.³⁰ There are no clinical studies that correlate the Immunohistochemistry for caspase-3 with cold ischemia time, especially over 48 hours, but our result are consistent with the findings from experimental studies that do not demonstrate correlation with the activity of caspase-3 when cold ischemia is less than 48 hours.

In the present study, a correlation between the caspase positivity and anatomopathological findings of ischemia and reperfusion injury was not observed. Positivity for biochemical markers is not always associated with pathological changes to optical microscopy since caspase activation may occur without any indication of

apoptosis in morphological evaluation. Studies with other etiologies of ARF also found no such correlation. Langenberg et al. in a study with septic sheep failed to demonstrate an association between histopathological changes (with apoptosis markers in renal medulla) and biochemical in animals with acute renal failure.³¹ A meta analysis of the same group showed that the non-specific histopathological findings are the most common in ARF associated with sepsis, and activation of apoptosis pathways in this subtype of ARF also occurs.³²

All the organs evaluated in this study were submitted to static preservation, thus, it has not been possible to assess whether there is a difference in activation of apoptosis between the organs maintained under static or dynamic preservation with perfusion machines. Wszola et al made this evaluation and determined that in static perfusion there is greater activation of genes related to hypoxia associated with worse long-term histological outcomes such as tubular atrophy and interstitial fibrosis.⁸ The perfusion solutions are used to reduce the speed of the reactions of ischemia reperfusion injury. Two infusion solutions were used, the Euro-collins and Custodiol, and there was no difference in activation of caspase-3 between the two. Other solutions have been analyzed as to the activation of caspase-3 in experimental studies and the Biolasol® Plus significantly reduced the activation of this enzyme in both the cortex and Medulla of the porcine kidney.³⁰

Another important factor for the short-term outcome of renal transplantation may be the hemodynamic status of the recipient during the surgical procedure. A study with pediatric recipients determined the optimal value of mean arterial pressure during surgery. There was a strong correlation between creatinine clearance in the first postoperative with MAP 10 minutes after reperfusion. Graft perfusion is directly dependent on cardiac output of the recipient.³³ Considering the adults recipients with comorbidities that may alter the cardiac output and the vasodilation caused by anesthetics, it is conceivable that a reduction significant renal flow, as previously described. The hemodynamic factors of receptors were not evaluated in this study and may be related to the activation of caspase-3 in this population studied.

The main limiting factor of the present study is the limited n for analysis. The initial goal was to assess whether the immunohistochemistry marker for caspase-3 is positive in deceased donor kidney grafts and such goal has been achieved. There are many variables and confounding factors between donor parameters, organ preservation, characteristics of the surgery and the organ recipient. Expanding the

number of patients may facilitate the confirmation of difference in activation of apoptosis pathways in subpopulations.

Through this study, the activation of caspase-3 enzyme in renal donors from deceased donors was demonstrated, positive in more than 80% of the sample evaluated, proving that the ischemia-reperfusion injury occurs in most kidney receptors in different degrees. The absence of correlation with histopathological findings and clinical variables of recipients suggests that the outcomes in these patients are multifactorial, conditioned by the interrelation of the multiple organ-donor-recipient parameters, which is unique in each case.

References

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *New England Journal of Medicine*. 1999; 341:1725.
2. Schröppel B, Legendre C. Delayed kidney graft function: from mechanism to translation. *Kidney International*. 2014; 86: 251-258.
3. Kezic A, Stajic N, Thaiss F. Innate Immune response in Kidney Ischemia/reperfusion injury: potential target for therapy. *Journal of Immunology research*. 2017; 1-10.
4. De Rosa S, Antonelli M, Ronco C. Hypothermia and kidney: a focus on ischaemiareperfusion injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2017; 32: 241-247
5. Ponticelli CE. The impact of cold ischemia time on renal transplant outcome. *Kidney International*. 2015; 87:272-275.
6. Brentnall M, Rodrigues Menocal L, De Guevara RL *et al*. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology* 2013, 14:32.
7. Gobe G. Identification of Apoptosis in Kidney Tissue. *Methods in Molecular Biology*. 2007; 466: 175-192.
8. Wszola M, Kwiatkowski A, Domagala P *et al*. Preservation of kidneys by machine perfusion influences gene expression and may limit ischemia/reperfusion injury. *Progress in Transplantation*. 2014; 1: 1-26.
9. Westphal GA, Caldeira Filho M, Vieira KD *et al*. Diretrizes para manutenção de múltiplos órgãos no potencial doador adulto falecido. Parte I. Aspectos gerais e suporte hemodinâmico. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2011; 23(3): 255-268
10. Baptista APM, Silva Jr HT, Pestana JOM, Influência da manutenção hemodinâmica do doador falecido na função renal do receptor de transplante renal. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2013; 35(4): 289-298.
11. Malinoski DJ, Patel MS, Ahmed O *et al*. The Impact of Meeting Donor Management Goals on the Development of Delayed Graft Function in Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation* 2013; 13: 3-1000.
12. Schröppel B, Legendre C. Delayed kidney graft function: from mechanism to translation. *Kidney International*. 2014; 86: 251-258.

- 13.Helfer MS, Vicari AR, Spuldaro F et al. Incidente, Risk Factors, and Outcomes of Delayed Graft Function in Deceased Donor Kidney Transplantation in a Brazilian Center. *Transplantation Proceedings*. 2014; 46: 1727-1729.
- 14.Santes-Freitas TV, Felipe CR, Aguiar WF et al. Prolonged Delayed Graft Function is Associated with Inferior Patient and Kidney Allograft Survivals. *PLoS ONE* 10(12):e0144188. doi:10.1371/journal.pone.0144188.
- 15.Perico N, Cattaneo Dm Sayegh M, et al, Delayed graft function in kidney transplantation. *The Lancet*. 2004; 13: 1814-1827.
- 16.Sociedade Brasileira de Nefrologia. Censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia 2016. Disponível em: <censo-sbn.org.br/censosAnteriores> Acesso em: 25 de julho de 2017.
- 17.Fernandes NMS, Chaoubah A, Bastos K et al. Geografia da dialise peritoneal no Brasil: análise de uma coorte de 5819 pacientes (BRAPD). *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2010; 32(3): 268-274.
- 18.DeMoraes TP, Figueiredo AE, Campos LG et al. Characterization of the BRAZPD II cohort and description of trends in peritoneal dialysis outcome across time periods. *Peritoneal Dialysis International*. 2014; 34: 714-723.
- 19.Debout A, Foucher Y, Trébern-Launay et al. Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney International*, 2015; 87: 343-349.
- 20.Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Registro Brasileiro de Transplante 2016. São Paulo, 2016.
- 21.Mota LS, Oliveira CMC, Pinheiro Junior FML et al. Estudo comparativo entre transplantes renais com doador falecido critério expandido e critério padrão em um único centro no Brasil. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2016; 38(3): 333-343.
- 22.Turkmen K, Martin J, Akcay A et al. Apoptosis and Autophagy in Cold Preservation Ischemia. *Transplantation*. 2011; 91(11): 1192-1197.
- 23.Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM et al. Activation of Mitochondrial Apoptotic Pathways in Human Renal Allografts after ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 2003; 76: 50-54.
- 24.Oberbauer R, Rohrmoser M, Regele H et al. Apoptosis of Tubular Epithelial Cells in Donor Kidney Biopsies Predicts Early Renal Allograft Function. *Journal of American Society of Nephrology*. 1999; 10: 2006-2013.

- 25.Schindowski K, Leutner S, Müller W *et al.* Age-related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes. *Neurobiology of Aging*. 2000; 21:661-670.
- 26.Pollack M and Leeuwenburgh. Apoptosis and aging: Role of Mitochondria. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*. 2001; 56A:B475-B482.
- 27.Yang H and Fogo A. Cell Senescence in the Aging Kidney. *Journal of American Society of Nephrology*. 2010; 21:1436-1439.
- 28.Rosner MH. Acute Kidney Injury in the Elderly. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2013; 29:565-578.
- 29.Kusaka J, Koga H, Hagiwara S *et al.* Age-dependent responses to renal ischemiareperfusion injury. *Journal of Surgical Research*. 2012; 172(153-158).
- 30.Skucinski J, Dabrowska M, Starek M *et al.* Application of analytical techniques to monitoring of kidney viability before transplantation during storage in ViaSpan® and Biolasol® Plus preservation solutions. *Analithical Methods*. 2014; 6:9093-9100.
- 31.Langenberg C, Gobe G, Hood S *et al.* Renal Histopathology During Experimental Septic Acute kidney injury and recovery. 2013; 42(1):58-67.
- 32.Kosaka J, Lankadeva YR, May CN *et al.* Histopathology of septic acute kidney injury: a systematic review of experimental data. *Critical Care Medicine*. 2016; 1-10.
- 33.Michelet D, Brasher C, Marsac L. Intraoperative hemodynamic factors predicting early postoperative renal function in pediatric kidney transplantation. *Pediatric Anesthesia*. 2017; 27:927-934.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O transplante renal é considerado o tratamento padrão ouro para a DRT e seus desfechos a curto, médio e a longo prazo dependem de variáveis do doador, da preservação do órgão e de características da cirurgia e dos receptores

A LIR é uma das principais causas de DGF, que tem impacto direto na sobrevida do enxerto. Sua fisiopatologia é parcialmente conhecida, porém busca-se marcadores para melhor avaliação de sua existência e de inibidores de etapas dessa cascata com o objetivo de evitar a DGF e aumentar a sobrevida do órgão.

A cascata da LIR culmina na ativação das vias de apoptose através da família de proteínas caspase, sendo a Caspase-3 a proteína efetora da via de morte celular programada. A pesquisa dessa molécula indica a ativação dessas vias localmente. A imunohistoquímica para caspase-3 já foi demonstrada como um bom método para identificação de apoptose.

Em nosso estudo, 82,14% dos enxertos analisados apresentaram imunohistoquímica positiva para a caspase-3, indicando ativação das vias de apoptose e LIR, apesar da correlação negativa com as alterações histológicas de LRI, que podem ser inespecíficas e não ocorrer de forma precoce.

O grupo com imunohistoquímica negativa para caspase era significativamente mais jovem do que os demais, sugerindo fatores de apoptose exacerbados, relacionados à senescência, ou pior perfusão do órgão e suscetibilidade à IRA em pacientes mais idosos.

Não foi avaliado o *status* hemodinâmico dos receptores durante o procedimento cirúrgico do transplante, fato que pode ser um viés na interpretação da imunohistoquímica para caspase-3 nessa população.

Por fim, elementos que levem a um melhor entendimento da fisiopatologia da DGF podem potencialmente propiciar medidas preventivas dessa importante complicação pós-operatória do transplante renal.