

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

**UTILIDADE DAS BIÓPSIAS DE VIGILÂNCIA EM TRANSPLANTADOS RENAIIS NA
VIGÊNCIA DE DISFUNÇÃO INICIAL DO ENXERTO**

JOÃO BATISTA SALDANHA DE CASTRO FILHO

Porto Alegre

2019

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

**UTILIDADE DAS BIÓPSIAS DE VIGILÂNCIA EM TRANSPLANTADOS RENAIIS NA
VIGÊNCIA DE DISFUNÇÃO INICIAL DO ENXERTO**

JOÃO BATISTA SALDANHA DE CASTRO FILHO

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

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Castro Filho, João Batista Saldanha de
Utilidade das biópsias de vigilância em
transplantados renais na vigência de disfunção inicial
do enxerto / João Batista Saldanha de Castro Filho. --
2019.
58 f.
Orientador: Roberto Ceratti Manfro.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2019.

1. Transplante renal. 2. Biópsia. 3. Função
retardada do enxerto. I. Manfro, Roberto Ceratti,
orient. II. Título.

Para Augusto Pacheco de Castro

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro, orientador desse trabalho pela oportunidade, orientação e supervisão na concretização desse trabalho.

Aos professores da residência médica em Medicina Interna Dr. Péricles Sarturi e Dra. Fabiana Piovesan, pelo estímulo à escolha da especialidade e à formação acadêmica.

Aos professores e médicos contratados do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelos ensinamentos fundamentais para a minha formação como especialista em Nefrologia.

À minha família, especialmente aos meus pais, Josiane e João Castro e a minha esposa, Renata Finger, pelo apoio e compreensão durante a realização do trabalho.

RESUMO

Base teórica. As diretrizes assistenciais recomendam biópsias de vigilância na DGF, no entanto, tais diretrizes são de uma época em que a efetividade dos regimes imunossupressores, em prevenir rejeição aguda, era consideravelmente menor. A elevada incidência de disfunção inicial do enxerto (DGF) observada no Brasil determina que biópsias de vigilância sejam realizadas com considerável frequência em pacientes transplantados renais.

Objetivo. O objetivo do estudo é avaliar a utilidade presente dessas biópsias e as características clínico-laboratoriais associadas aos desfechos do enxerto renal.

Métodos. Coorte retrospectiva de pacientes transplantados renais com órgãos de doadores falecidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre Janeiro de 2006 e Julho de 2019 com DGF submetidos à biópsia de vigilância.

Resultados. Realizadas 356 biópsias, maioria dos pacientes masculinos (61,2%), caucasóides (74,9%), sendo 51,7% sem sensibilização HLA. O tempo de isquemia fria foi $25,6 \pm 5,6$ horas. Em 89,1% dos casos houve indução da imunossupressão com anticorpos. Em média as biópsias foram realizadas no dia $14,7 \pm 8,2$ de pós-operatório. Na análise histológica foram identificadas 6 (1,7%) biópsias normais, 142 (39,9%) biópsias com necrose tubular aguda isolada, 90 (25,3%) alterações *borderline*, 87 (24,4%) casos de rejeição aguda celular, 5 (1,4%) rejeições agudas mediadas por anticorpos, 23 (6,5%) necroses de coagulação, 1 (0,3%) microangiopatia trombótica e 2 (0,6%) pielonefrites. Não houve correlação entre idade do doador, raça, sensibilização e doador limítrofe com rejeição aguda. Em análise multivariada foram significativas as correlações da rejeição aguda com o tempo de DGF, idade do receptor e tipo da terapia de indução.

Conclusão. A elevada incidência de rejeição aguda nesse grupo de pacientes, mesmo sob terapia imunossupressora contemporânea, faz com que as biópsias de vigilância permaneçam um recurso diagnóstico essencial em pacientes transplantados renais com órgãos de doador falecido que apresentem DGF.

Palavras chave: transplante renal, disfunção inicial do enxerto, biópsia de vigilância, rejeição aguda.

ABSTRACT

Background. The high incidence of delayed graft dysfunction (DGF) observed in Brazil determines that surveillance biopsies are performed with considerable frequency in kidney transplant recipients. The still current guidelines were written in an era in which the effectiveness of immunosuppressive therapy was substantially lower in preventing acute rejection.

Objective. To evaluate the usefulness of surveillance biopsies and the clinical-laboratory characteristics associated with renal graft outcomes in particular acute graft rejection.

Methods. Retrospective cohort of kidney transplant patients at the Hospital de Clínicas of Porto Alegre between January 2006 and July 2017 who underwent a surveillance graft biopsy during the DGF period.

Results. Three hundred and fifty-six biopsies were performed in 335 patients who were predominantly males (61.2%), Caucasoid (74.9%), and without HLA sensitization (51.7%). Mean cold ischemia time was 25.6 ± 5.6 hours. Antibody induction therapy occurred in 89.1% of patients. On average, biopsies were performed at 14.7 ± 8.2 days after transplantation. Histological analysis identified 6 (1.7%) normal biopsies, 142 (39.9%) biopsies with isolated acute tubular necrosis, 90 (25.3%) borderline alterations, 87 (24.4%) cases of acute cellular rejection, 5 (1.4%) acute antibody-mediated rejections, 23 (6.5%) coagulation necrosis, 1 (0.3%) thrombotic microangiopathy and 2 (0.6%) pyelonephritis. There was no correlation between donor age, race, sensitization and borderline donor with acute rejection. In the multivariate analysis, the correlations between DGF length, recipient age and type of induction therapy were significant.

Conclusion. The high incidence of acute rejection in the subset of kidney transplant recipients with DGF, even under contemporary immunosuppressive therapy, sustains surveillance biopsies as an essential diagnostic resource in deceased donor kidney transplant recipients with DGF.

Key words: kidney transplantation, delayed graft function, surveillance biopsies, acute rejection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas.

Figura 2. Perda da polaridade celular levando ao destacamento celular e obstrução da luz tubular.

Figura 3. Ativação da resposta imune inata, gerando uma reação inflamatória local.

Figura 4. Resposta imune ao tecido transplantado. Fases de apresentação, alorreconhecimento e coestimulação. Expansão clonal de células ativadas por interleucinas. Fase efetora com moléculas agressoras e fase humoral com anticorpos anti-HLA.

Figura 5. Representação esquemática da fisiopatologia, achados histológicos e alterações funcionais na nefrotoxicidade dos inibidores da calcineurina.

Figura 6. Ligação dos anticorpos aos antígenos endoteliais com consequente ativação do complemento e formação do complexo de ataque a membrana que resulta em necrose endotelial.

Figura 7. Processamento de antígenos endógenos (peptídeos derivados de proteínas intracelulares) através dos linfócitos T CD8 e dos antígenos exógenos (peptídeos derivados de proteínas extracelulares) através dos linfócitos T CD4.

Figura 8. Vias de alorreconhecimento.

Figura 9. Ativação e diferenciação linfocitária.

Figura 10. Representação esquemática simplificada do marco conceitual: utilidade da biópsia de vigilância.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de Banff revisada em 2017.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CF	Citometria de fluxo
DCE	Doador de critérios expandidos
DGF	<i>Delayed graft function</i> – disfunção inicial do enxerto
DM	Diabete melito
DRC	Doença renal crônica
DSA	<i>Donor specific antibodies</i> – Anticorpo anti-doador
FI/AT	Fibrose intersticial e atrofia tubular
GN	Glomerulonefrite
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HD	Hemodiálise
HLA	Antígenos leucocitários humanos
IRA	Insuficiência renal aguda
KPDI	<i>kidney donor profile index</i> - Índice do perfil do doador renal
NTA	Necrose tubular aguda
PNA	Pielonefrite aguda
PNC	Pielonefrite crônica
PRA	<i>Panel reactive antibodies</i> – Reatividade contra painel
RA	Rejeição aguda
RAMA	Rejeição aguda mediada por anticorpos
RBT	Registro Brasileiro de Transplantes
Tx	Transplante
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UNOS	United Network for Organ Sharing

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	12
2.2 Definições e conceitos (DGF e biópsia de vigilância)	13
2.3 Fatores de risco para disfunção inicial do enxerto (DGF)	14
2.4 Lesão de isquemia e reperfusão	15
2.5 Imunologia de transplantes e imunossupressão	17
2.6 Nefrotoxicidade dos inibidores da calcineurina	20
2.7 Rejeição aguda	22
3. MARCO CONCEITUAL	30
4. JUSTIFICATIVA	31
5. OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo geral	32
5.2 Objetivo específico	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
7. ARTIGO	38
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 10 anos o transplante renal, como forma de tratamento para doença renal crônica, vem crescendo em números absolutos, com aumento expressivo da oferta de doadores falecidos em relação aos doadores vivos. Conforme dados do Registro Brasileiro de Transplantes (RBT), em 2006 foram realizados 1525 transplantes renais de doadores falecidos e 1774 transplantes com doadores vivos, já no ano de 2018 realizaram-se 4905 transplantes de doadores falecidos e 1018 com doadores vivos (1,2).

Essa maior oferta de rins de doadores falecidos traz consigo um aumento na disponibilidade e utilização de rins de doadores com características não ideais ou limítrofes, que apesar de apresentarem resultados funcionais piores quando comparados aos órgãos chamados ideais, prolongam a sobrevida e levam a melhor qualidade de vida do receptor em relação aqueles pacientes que permanecem em lista de espera para o transplante (3–6).

A maior disponibilidade de rins de doadores limítrofes ou de critério expandido, além de outras variáveis como tempo de isquemia, aspectos cirúrgicos, imunossupressão, entre outros, contribui para um aumento da prevalência da disfunção inicial do enxerto (DGF - *delayed graft function*), definida pela necessidade de diálise nos primeiros sete dias após o transplante, levando, portanto, a maior necessidade de realização de biópsias renais de vigilância, que são o escopo do presente trabalho (7,8).

Biópsias de enxertos renais podem ser classificadas em (a) **biópsias por indicação** clínica, nas situações em que ocorre disfunção de enxerto funcionante; (b) **biópsias protocolares**, as que são realizadas em períodos fixos, determinados pelos programas de transplante, mesmo que não haja qualquer alteração clínica ou laboratorial preceptível e (c) **biópsias de vigilância**, que são as que executa em enxertos em que não há função inicial, ou seja na fase de disfunção inicial do enxerto (DGF). Estas biópsias estão indicadas nos primeiros dias de disfunção e preconiza-se a sua repetição a cada 7 a 10 dias, até que o enxerto adquira função (9–12).

Realiza-se também, em alguns centros transplantadores, as biópsias protocolares, com o objetivo de identificar alterações subclínicas que possam interferir ou prejudicar os desfechos em longo prazo do enxerto renal (13).

As biópsias por indicação clínica são geralmente feitas quando ocorre deterioração da função do rim transplantado, quando a sua função é inferior à esperada de acordo com as características do doador ou quando ocorre surgimento, ou aumento de proteinúria para níveis nefróticos. Evidentemente, antes da realização da biópsia por indicação as causas evidenciáveis pelo exame clínico, exames laboratoriais e de imagem devem ser adequadamente descartadas e incluem principalmente, desidratação, infecções do trato urinário, obstrução do trato urinário, obstruções vasculares do enxerto e níveis elevados de inibidores de calcineurina. Descartadas essas possibilidades sugere-se, para um diagnóstico e tratamento adequado, a realização de uma biópsia do enxerto renal, pois nessas situações somente a avaliação do tecido renal pode indicar a etiologia da disfunção do enxerto, cujo diagnóstico diferencial inclui principalmente a rejeição aguda, nefrototoxicidade, pielonefrite, microangiopatia trombótica, nefrite por polioma vírus e recorrência de doenças renais primárias (14).

Com os avanços na imunossupressão, em especial nos últimos 15 anos, tanto em termos de maior disponibilidade de drogas quanto em melhor utilização das mesmas, os episódios de rejeição aguda diminuíram substancialmente em frequência. Dessa forma, espera-se um aumento na porcentagem das biópsias de vigilância cujos achados seriam apenas os relacionados às lesões de isquemia e reperfusão, situação na qual a informação propiciada pela análise histológica não leva a modificação da terapia e, portanto, a biópsia não seria necessária (15,16).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão se baseia em identificar as orientações e diretrizes (“*guidelines*”) para a realização das biópsias de vigilância em transplantados renais. Por definição essas biópsias são aquelas indicadas nos pacientes cujo enxerto esteja sem função

inicial, ou com disfunção inicial do enxerto (DGF), indicando-se sua realização nos primeiros dias pós transplante e sua repetição a cada 7 a 10 dias, até que o enxerto adquira função. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed, SciELO e banco de teses da CAPES, no período de 1995 a 2019. Foram realizadas buscas através dos termos “*Surveillance biopsy in kidney transplantation*”, “*delayed graft function*”, “*protocol biopsies*”, “*subclinical rejection*”, “*acute rejection*” e suas combinações.

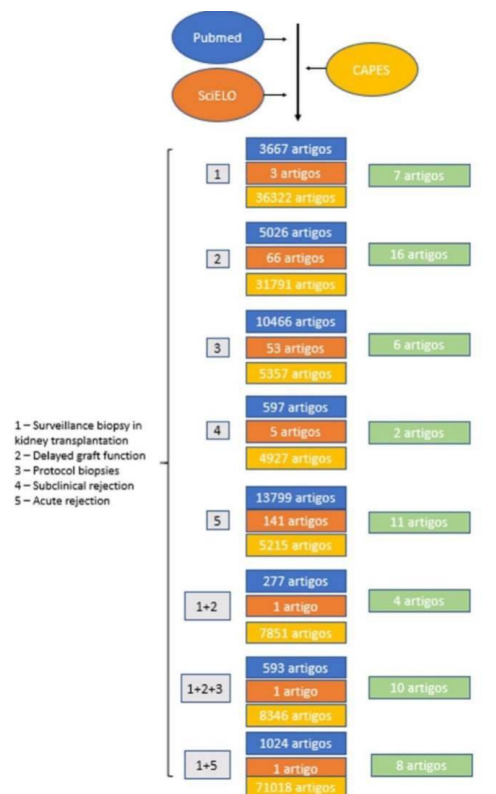


Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam este estudo. Caixas verdes indicam os artigos que foram incluídos nesta revisão.

2.2 Definições e conceitos (DGF e biópsia de vigilância)

Existem na literatura diversas definições da disfunção inicial do enxerto ou função tardia do enxerto (do inglês: DGF – *delayed graft function*), que utilizam como critério a necessidade de diálise, alterações da creatinina sérica ou a combinação de ambos os critérios, com uma variabilidade na incidência de DGF de 24,3% a 70% em transplantes com doadores falecidos em morte encefálica. A definição mais amplamente

utilizada e com aplicação mais simples e reprodutível, é aquela que considera apenas a necessidade de diálise nos primeiros sete dias após o transplante (7,17).

As biópsias de vigilância, que são as que fazem parte do escopo deste estudo, são conceitualmente as realizadas no período de disfunção inicial do enxerto renal. Preconiza-se a sua realização a cada 7-10 dias no período de DGF, quando a creatinina sérica ainda não é útil para que seja suspeitada a ocorrência de rejeição aguda ou de outras causas de disfunção do enxerto (12). Em pacientes com elevado risco para rejeição, em especial a rejeição aguda mediada por anticorpos (RAMA) e que evoluem com DGF, constitui prática comum a realização mais precoce da biópsia de vigilância.

2.3 Fatores de risco para disfunção inicial do enxerto (DGF)

A DGF, previamente definida pela necessidade de diálise na primeira semana após o transplante, apresenta grande variabilidade de incidência entre diferentes centros transplantadores e países. Os registros Norte Americanos demonstram incidência de DGF em aproximadamente 24% dos pacientes transplantados renais enquanto dados Brasileiros demonstram incidência muito mais elevada, atingindo em torno de 60% dos pacientes submetidos a transplante renal com doador falecido (8,18,19). Além da variabilidade entre centros, a incidência de DGF varia com o perfil de risco do receptor e do doador, sendo mais comum em pacientes afro-descendentes receptores de órgãos de doador falecido e com risco cerca de três vezes maior com a utilização de rins de doadores acima dos 60 anos quando comparados aos doadores com menos de 40 anos (20). Adicionalmente, a incidência de DGF sofreu uma elevação no decorrer dos anos concomitantemente à maior utilização de órgãos de doadores de critérios expandidos de acordo com os critérios UNOS (*United Network for Organ Sharing*) (17) ou doadores com KPDI (*Kidney Donor Profile Index*) elevado (5,21–23).

Os fatores de risco para DGF podem estar relacionados: (a) **ao processo da procura e captação dos órgãos**, rins de doadores de coração parado (modalidade não utilizada no Brasil atualmente), mas por vezes os rins são retirados em parada cardíaca do doador em morte encefálica, uso de drogas inotrópicas, tempo de isquemia fria, tipo de solução de preservação e tipo de preservação renal, estática ou pulsátil; (b) **ao doador**, idade e presença de doenças tais como hipertensão arterial e diabetes, doador

como sendo de critérios expandidos (Critérios UNOS: doador > 60 anos ou com idade entre 50 e 59 anos com pelo menos dois dos três fatores a seguir: AVC como causa da morte encefálica, hipertensão arterial e creatinina sérica > 1,5 mg/dL) ou com KPDI elevado, além da qualidade da manutenção do potencial doador após o diagnóstico de morte encefálica até a captação do órgão; (c) **ao receptor**, presença de hipovolemia, hidratação trans-operatória insuficiente, hemodiálise com ultrafiltração recente, etnia, obesidade, re-transplantes, e (d) **a cirurgia do transplante e pós-operatório imediato**, tempo das anastomoses vasculares, dificuldades técnicas no implante, manejo volêmico e hemodinâmico inadequado no pós-operatório imediato (14,24,25).

Em um grande estudo norte-americano em base de dados, envolvendo 24.337 receptores de transplante renal com doador falecido, os fatores de risco descritos como de maior impacto para DGF foram o tempo de isquemia fria, a creatinina sérica final do doador, o índice de massa corporal do receptor, doador em morte cardíaca e a idade do doador (20). Dados mais recentes, publicados em 2018, em estudo retrospectivo de centro único, realizado no Brasil por Helfer *et al.* reiteraram como variáveis significativas para DGF em análise multivariada a creatinina final do doador, a idade do doador, o tempo de isquemia fria além do uso de terapia de indução com anticorpos (26).

2.4 Lesão de isquemia e reperfusão

A interrupção do fluxo sanguíneo renal no momento da captação renal para transplante e a subsequente reperfusão do órgão induzem importantes perturbações no metabolismo celular e inflamação tecidual. Essas alterações relacionadas a isquemia-reperfusão contribuem para a disfunção inicial do enxerto e aumentam a imunogenicidade do enxerto.

Em nível celular, a isquemia causa uma rápida depleção do suprimento energético (ATP) nas células tubulares renais, o que induz a desorganização do citoesqueleto com quebra das junções intercelulares, perda da polarização celular e disfunção dos transportadores iônicos da membrana celular. Como consequência destes eventos as células endoteliais e epiteliais desprendem-se de suas membranas basais ocasionando a obstrução dos lúmens vascular e tubular, respectivamente (Figura 2). A

perda da permeabilidade vascular e tubular leva ao acúmulo de fluidos no interstício do órgão, o que irá contribuir futuramente para o atraso na reperfusão renal e prolongar o período de insulto isquêmico. A lesão celular ocasionada por isquemia e reperfusão se associa a produção de espécies reativas de oxigênio, que são responsáveis pela oxidação prejudicial de lipídios, proteínas, membranas e ácidos nucleicos tanto das células epiteliais como das endoteliais. Além das consequências metabólicas há uma ativação da resposta imune inata através de receptores toll-like que recrutam mediadores inflamatórios, gerando uma reação inflamatória local (27,28) (Figura 3).

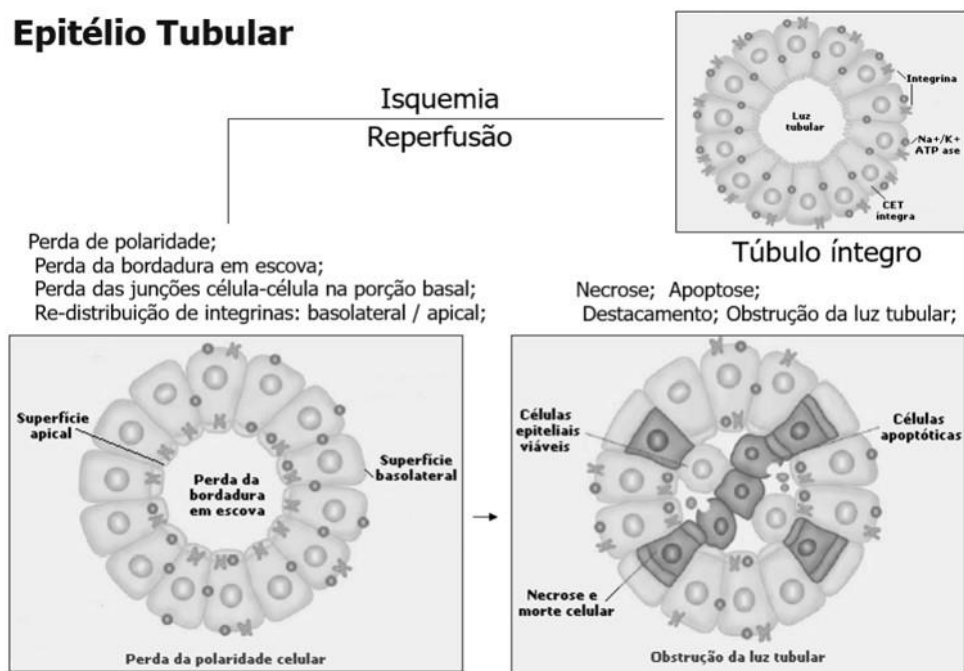


Figura 2. Perda da polaridade celular levando ao destacamento celular e obstrução da luz tubular. Adaptado de Schrier et al, 2004(29).



Figura 3. Ativação da resposta imune inata, gerando uma reação inflamatória local. Adaptado de Gandolfo et al, 2007(30).

2.5 Imunologia de transplantes e imunossupressão – estratégias para melhora dos desfechos

O sistema imune é responsável pelo reconhecimento do que é próprio ou não-próprio do organismo e a repostas aos fatores estranhos. Divide-se a imunidade em inata e adaptativa. A imunidade inata é primitiva e representa uma resposta rápida a um grande número de estímulos e é representada por moléculas e células presentes no indivíduo, independente de contato prévio com agentes agressores. Os principais agentes da imunidade inata são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *natural killer* com mecanismos principais representados pela fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação do sistema complemento assim como a síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. Já a imunidade adaptativa é dependente de exposição prévia a um antígeno e depende da ativação linfocitária e das moléculas produzidas a seguir. Esta tem como características principais a especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância aos componentes do próprio organismo (31).

O sistema imune rege a aceitação ou rejeição de um enxerto transplantado. Diferentes indivíduos possuem diferentes moléculas em sua superfície celular e que são reconhecidas pelas células do sistema imune do receptor e desencadeiam o processo aloimune que pode suscitar na rejeição do órgão. Em humanos, essas moléculas de histocompatibilidade são principalmente do sistema HLA (*human leukocyte antigens*). As moléculas HLA são glicoproteínas de superfície celular, classificadas como HLA de classe I e de classe II. Aquelas de classe I estão presentes na superfície de essencialmente todas as células nucleadas, já as moléculas de classe II são expressas em alguns tipos celulares, como as células apresentadoras de antígenos (APC): células dendríticas e macrófagos, além de linfócitos B e linfócitos T ativados. Os loci HLA de classe I são principalmente HLA-A, B e C e de classe II o HLA-DR, DQ e DP; são herdados dos genitores em conjunto, formando um haplótipo, possuindo dois alelos diferentes para cada especificidade HLA (14).

O reconhecimento de antígenos pelas células T se dá a partir da apresentação de peptídeos destes antígenos dentro de moléculas HLA, através dos receptores localizados na superfície celular chamados de receptor de célula T (TCR, *T-cell receptor*). Este reconhecimento decorre da interação entre MHC, peptídeo e TCR. Para ativação do linfócito T, são necessários dois sinais, o primeiro sinal é gerado pela interação entre o aloantígeno e TCR e dá início ao processo de ativação do linfócito T, a seguir há a interação entre moléculas co-estimulatórias como CD28, nos linfócitos T, e moléculas B7-1 e B7-2 nas células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen presenting cells*) caracterizando o segundo sinal. A partir dessas vias de ativação há uma transdução de sinais intracelulares que culminam na transcrição de diversos genes e na síntese de fatores de crescimento, como a interleucina 2 (IL-2), levando à proliferação celular e expansão clonal dos linfócitos T, a progressão deste processo leva a diferenciação das células T em efetoras ou células de memória, que serão os desencadeadores e mantenedores de um processo de agressão ao enxerto (Figura 4) (14,32).

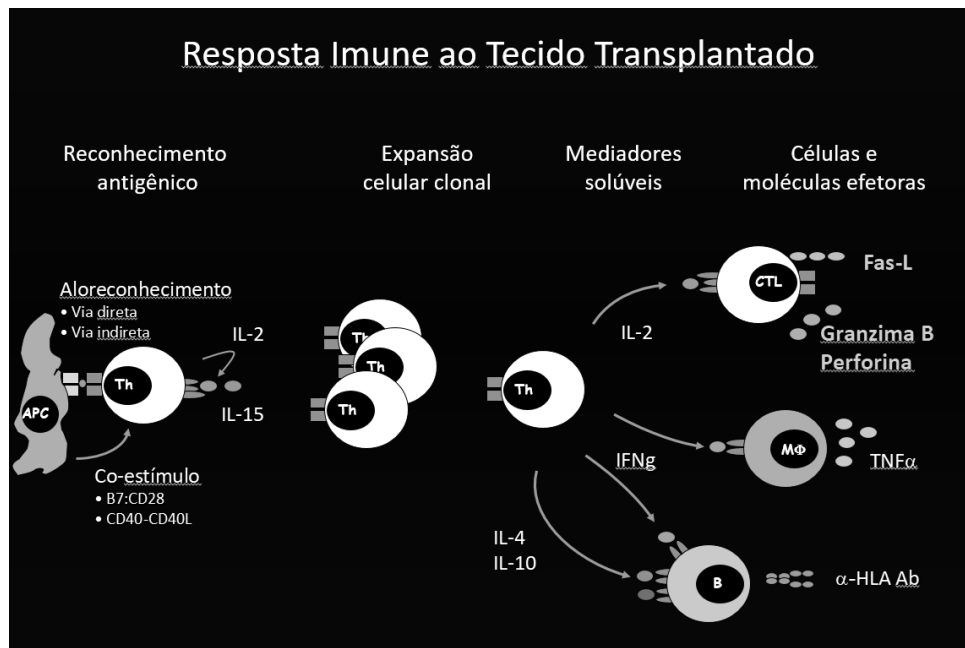


Figura 4. Resposta imune ao tecido transplantado. Fases de apresentação, alorreconhecimento e co-estimulação. Expansão clonal de células ativadas por interleucinas. Fase efetora com moléculas agressoras e fase humoral com anticorpos anti-HLA.

Como estratégia para melhores desfechos do transplante renal relacionados a imunossupressão adota-se protocolos de imunossupressão baseados nos riscos imunológicos e não-imunológicos, como o tipo de doador (vivo ou falecido), qualidade do órgão, presença de infecções e comorbidades. Grande parte dos protocolos atuais se baseiam na utilização de corticosteroides, inibidores da calcineurina, drogas antiproliferativas e anticorpos que são utilizados na terapia de indução.

Considerando pacientes com risco imunológico baixo pode não ser necessária a indução da imunossupressão com anticorpos e, em geral, pode-se realizar a manutenção de imunossupressão com o uso de corticosteroides, um inibidor da calcineurina e micofenolato ou azatioprina. Para receptores com risco imunológico padrão, ou seja, não sensibilizados, não afrodescendentes, adultos e primeiro transplante usualmente indica-se a combinação de corticosteroides, inibidor da calcineurina e agente antiproliferativo, podendo ser realizada a indução com anticorpos na dependência de fatores como tempo de isquemia fria prolongado ou insuficiência renal no doador (33,34). Já pacientes de alto risco imunológico, incluídos aqueles hipersensibilizados, com presença de anticorpos contra o doador (DSAs – *donor specific antibodies*), prova cruzada positiva, re-transplantes, afrodescendentes, receptores pediátricos e receptores

com DGF, necessitam de uma imunossupressão mais intensa, sendo então importante a realização da indução da imunossupressão com uso de anticorpos e posterior manutenção da imunossupressão com inibidor da calcineurina associado a agente antiproliferativo potente, como micofenolato (sódico ou mofetil), além do corticosteroide. Nestes pacientes de maior risco o uso de agentes depletos de células T é provavelmente benéfico para a sobrevida do enxerto (35,36).

Como parte da estratégia para propiciar melhores desfechos é importante que a definição do protocolo seja realizada de maneira individualizada, tendo em vista que os pacientes não são iguais e podem apresentar riscos e efeitos adversos diferentes às medicações empregadas e considerar ainda que uma imunossupressão de maior intensidade pode levar a redução do risco de rejeição mas ao mesmo tempo leva a um importante acréscimo no risco de infecções e neoplasias.

2.6 Nefrotoxicidade dos inibidores da calcineurina

O desenvolvimento da ciclosporina nos anos 1970 revolucionou a transplantação, a partir deste momento o tratamento preferencial para a doença renal em estágio final se tornou o transplante renal. Nos últimos anos cerca de 94% dos receptores de transplante renal estão sob regime imunossupressor contendo um inibidor da calcineurina (37,38).

A ação imunossupressora destas medicações se dá pela inibição da calcineurina levando a supressão da transcrição de IL-2 e, em última instância, bloqueando a ativação das células T (39).

Em 1984, Myers *et al.* demonstraram que o uso continuado de ciclosporina se associava não apenas com uma redução reversível da TFG como também com uma piora funcional irreversível e progressiva com lesão túbulo-intersticial e glomeruloesclerose. (40)

Na fisiopatologia da nefrotoxicidade aguda dos inibidores de calcineurina sugeriu-se como principal fator a vasoconstrição das arteríolas aferentes, mediada pela ação de fatores como endotelina (potente vasoconstritor liberado pelas células epiteliais renais), tromboxano e ativação do sistema renina-angiotensina que, por sua vez, promove a

redução do fluxo sanguíneo renal, potencializando as alterações hemodinâmicas já ocasionadas pelo uso do inibidor de calcineurina. Além dos fatores já descritos há evidência também de disfunção endotelial associada ao uso de tacrolimus e ciclosporina por inibirem a formação de óxido nítrico, cuja ação vasodilatadora poderia contrabalancear os efeitos vasoconstritores previamente citados (24,40).

A nefrotoxicidade crônica relacionada aos inibidores da calcineurina é advinda da combinação das alterações hemodinâmicas e dos efeitos tóxicos diretos destas medicações nas células epiteliais tubulares, e lesões sugestivas são identificadas em praticamente todos os pacientes após 10 anos de transplante (41). As lesões podem atingir, irreversivelmente, todos os compartimentos do rim, ou seja, levar a hialinose arteriolar, atrofia tubular e fibrose intersticial e também ao espessamento e fibrose da cápsula de Bowman (42) (Figura 5).

A ocorrência de doença renal crônica em pacientes que recebem transplantes de órgãos sólidos outros que não o rim também tem sido considerada em suporte ao relevante papel da nefrotoxicidade dos inibidores de calcineurina (43,44).

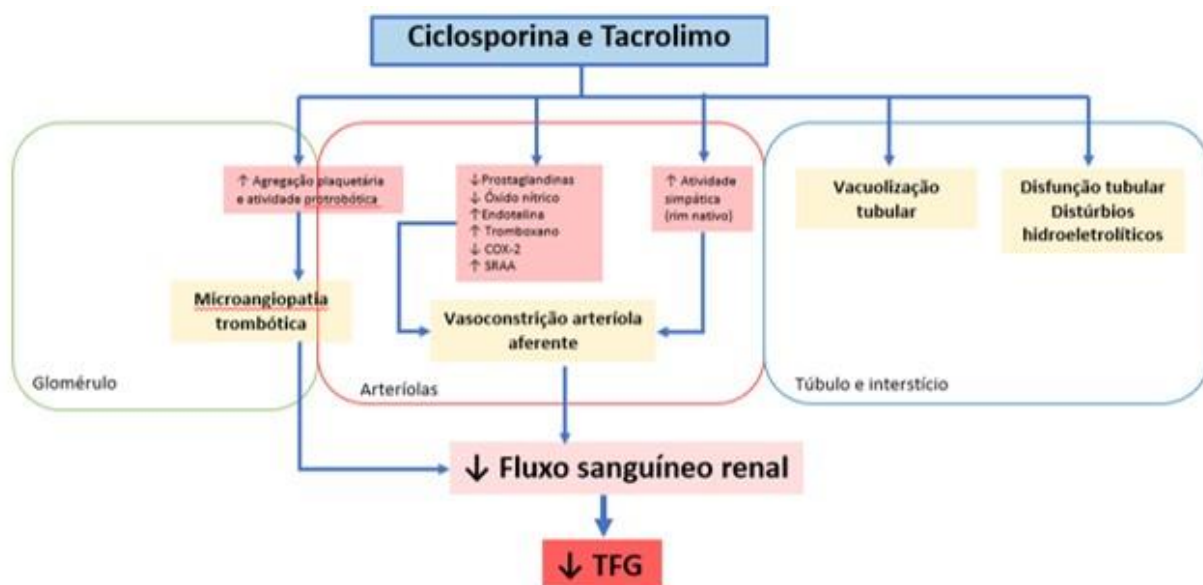


Figura 5. Representação esquemática da fisiopatologia, achados histológicos e alterações funcionais na nefrotoxicidade dos inibidores da calcineurina.

2.7 Rejeição aguda

A rejeição representa um importante obstáculo a trasplantação sendo um dos fatores de mau prognóstico mais importante na sobrevida do enxerto. O transplante entre indivíduos geneticamente diferentes induz a uma resposta imune no receptor contra os aloantígenos presentes nas superfícies celulares do órgão transplantado. O não controle dessa resposta imune culminará com a destruição do aloenxerto (45,46).

As alterações imunológicas se iniciam antes mesmo do transplante, pelos efeitos inflamatórios sistêmicos presentes no doador em morte encefálica e as alterações secundárias a isquemia-reperusão que geram uma hiperexpressão dos antígenos HLA com liberação de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão no enxerto, intensificando a resposta imune e aumentando a infiltração celular no enxerto, e dessa forma aumentando o risco de rejeição (45,47).

Na década de 1960 a imunossupressão no transplante renal era constituída unicamente por azatioprina e corticosteróides e eram comuns as rejeições agudas acompanhadas por febre, oligúria e endurecimento do enxerto. Esta apresentação clínica praticamente desapareceu com a introdução, na década de 1980, dos inibidores de calcineurina e com o melhor pareamento imunológico entre doadores e receptores, reduzindo o risco de rejeição aguda para menos de 15% no primeiro ano após o transplante. Isso levou a melhores sobrevidas demonstradas em análise realizada entre 1988 e 1996 por Hariharan *et al.* No entanto, esses desfechos favoráveis em curto prazo não impactaram na sobrevida dos enxertos em longo prazo (45,46,48).

Classicamente as rejeições foram classificadas temporalmente como: (a) **rejeição hiperaguda** (ocorrendo em minutos ou poucas horas); (b) **rejeição aguda** (dias a semanas); (c) **rejeição aguda tardia** (após três meses) ou (d) **rejeição crônica** (meses a anos após o transplante).

Modernamente, desde a década de 1990, as histopatologias dos enxertos e por conseguinte as rejeições, são avaliadas pela classificação de Banff. Tal classificação foi revisada em 2017 e encontra-se na Tabela 1 abaixo (14,45,49).

Tabela 1. Classificação de Banff 2017

Categoria 1: Biópsia normal ou alterações não específicas.
Categoria 2: Alterações mediadas por anticorpos.
Rejeição aguda mediada por anticorpos: deve preencher os três critérios para diagnóstico:
<p>1. Evidência histológica de lesão tecidual aguda, incluindo ou mais dos seguintes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Inflamação microvascular ($g > 0$ e/ou $ptc > 0$), na ausência de glomerulonefrite <i>de novo</i>, entretanto, na presença de RAC, infiltrado borderline ou infecção, $ptc \geq 1$ apenas não é suficiente e g deve ser ≥ 1); - Arterite íntimal ou transmural ($v > 0$); - Microangiopatia trombótica, na ausência de outras causas; - Necrose tubular aguda, na ausência de outras causas aparentes.
<p>2. Evidência de interação atual ou recente de anticorpos com o endotélio vascular, incluindo um ou mais dos seguintes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Marcação C4d linear em capilares peritubulares (C4d2 ou C4d3 em IF, ou C4d > 0 por IHQ em tecido parafinado). - No mínimo inflamação microvascular moderada ($[g + ptc] \geq 2$) na ausência de glomerulonefrite <i>de novo</i>, entretanto, na presença de RAC, infiltrado borderline ou infecção $ptc \geq 2$ isoladamente não é suficiente e g deve ser ≥ 1. - Aumento na expressão de transcritos ou classificadores gênicos no tecido renal que sejam fortemente associados à RAMA e validados.
<p>3. Evidência sorológica de anticorpos específicos contra o doador (DSA contra HLA ou outros antígenos).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Positividade C4d ou expressão de transcritos/classificadores gênicos, como acima no critério 2 podem substituir o DSA. Entretanto a testagem completa de DSA, incluindo anticorpos anti-HLA, se a testagem dos anticorpos anti-HLA for negativa, é fortemente recomendado que os critérios 1 e 2 estejam presentes.
Rejeição crônica mediada por anticorpos: preencher os três critérios para diagnóstico
<p>1. Evidência morfológica de lesão tecidual crônica, incluindo 1 ou mais dos seguintes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Glomerulopatia do transplante ($cg > 0$) se não houver evidência de MAT crônica ou glomerulonefrite recorrente/<i>de novo</i>; inclui alterações evidentes apenas pela microscopia eletrônica ($cg1a$). - Membrana basal de capilar peritubular severamente espessada (requer ME) - Fibrose arterial de início recente, excluídas outras causas.
2. Idênticos aos critérios 2 para RAMA.
3. Idênticos aos critérios 3 para RAMA, incluindo forte recomendação para testar DSA quando presentes os critérios 1 e 2.
Marcação C4d sem evidência de rejeição: os 4 critérios devem estar presentes para o diagnóstico:
1. Marcação C4d linear em capilares peritubulares.

2. Ausência do critério 1 para RAMA ou RCMA.
3. Ausência de evidência molecular de RAMA ou RCMA.
4. Ausência de RAC ou alterações borderline.
Categoria 3: Alterações borderline
Alterações suspeitas (borderline) para RAC.
Tubulite (t>0) com inflamação intersticial leve (i0 ou i1), ou inflamação intersticial moderada a severa (i2 ou i3) com tubulite (t1) moderada.
Ausência de arterite intimal ou transmural (v=0).
Categoria 4: Rejeição mediada por células T
Rejeição aguda mediada por células T
IA – inflamação intersticial envolvendo >25% do parênquima cortical (i2 ou i3) com tubulite moderada (t2) envolvendo 1 ou mais túbulos, excluindo os túbulos severamente atrofícos.
IB - inflamação intersticial envolvendo >25% do parênquima cortical (i2 ou i3) com tubulite severa (t3) envolvendo 1 ou mais túbulos, excluindo os túbulos severamente atrofícos.
IIA – leve a moderada arterite (v1), com ou sem inflamação intersticial e/ou tubulite.
IIB – arterite intimal severa (v2), com ou sem inflamação intersticial e/ou tubulite.
III – arterite transmural e/ou necrose fibrinóide da camada muscular média com presença de arterite intimal com células mononucleares (v3), independente da presença ou não de inflamação intersticial e/ou tubulite.
Rejeição crônica mediada por células T
IA – inflamação intersticial envolvendo >25% do córtex (score ti 2 ou 3) e >25% de esclerose cortical (score IFTA 2 ou 3) com tubulite moderada (t2) envolvendo 1 ou mais túbulos, sem inclusão de túbulos severamente atrofícos; outras causas conhecidas de IFTA devem ser descartadas.
IB - inflamação intersticial envolvendo >25% do córtex (score ti 2 ou 3) e >25% de esclerose cortical (score IFTA 2 ou 3) com tubulite severa (t3) envolvendo 1 ou mais túbulos, sem inclusão de túbulos severamente atrofícos; outras causas conhecidas de IFTA devem ser descartadas.
III – arteriopatia crônica do enxerto (fibrose intimal arterial com presença proliferação celular mononuclear e formação de neoíntima).

Adaptado de Haas et al, 2018 (49).

Na **rejeição hiperaguda**, que nos dias atuais praticamente inexistente devido a melhora nas técnicas de prova cruzada pré-transplante que detectam com melhor eficiência anticorpos específicos contra o doador, há a ativação da via clássica da cascata do complemento seguida por necrose endotelial, deposição plaquetária e coagulação local, ocorrendo quase imediatamente após a liberação dos clampes vasculares. O enxerto pode se apresentar visualmente como um rim de aspecto moteado e flácido, reflexo da deposição de anticorpos contra antígenos HLA expressos no

endotélio glomerular e na microvasculatura que em última instância irá levar a necessidade de remoção do enxerto.(50,51)

A **rejeição aguda mediada por anticorpos**, que se inicia alguns dias após o transplante, ou em algumas semanas quando utilizada terapia imunossupressora potente, tem como característica uma rápida disfunção do enxerto secundária a inflamação. Essa resposta inflamatória pode manifestar-se com mais rapidez quando há exposição prévia a alguns antígenos que irão gerar uma elevação nos títulos de anticorpos fixadores de complemento, que terão como principal alvo os antígenos MHC dispostos no endotélio dos capilares peritubulares e glomerulares do doador. A lesão dessas células endoteliais induz a liberação de diversas moléculas agressoras como: o fator de von Willebrand e P-selectina, que promovem agregação plaquetária; citocinas como IL-1 α e IL-8 e quimiocinas como CCL2 que ocasionam a aderência de leucócitos aos glomérulos (glomerulite) ou aos capilares peritubulares; e os quimiotáticos C3a e C5a. Esse processo de agressão tecidual se acompanha da deposição do C4d, marcador clássico de ativação do complemento, nos capilares peritubulares e, o C5b é o gatilho para a formação do complexo de ataque a membrana (C5b-C9) que irá resultar em necrose endotelial localizada e apoptose, bem como o descolamento das células endoteliais da membrana basal (figura 6). O diagnóstico e tratamento precoces nesta situação são indispensáveis para a manutenção do enxerto (45,50,52).

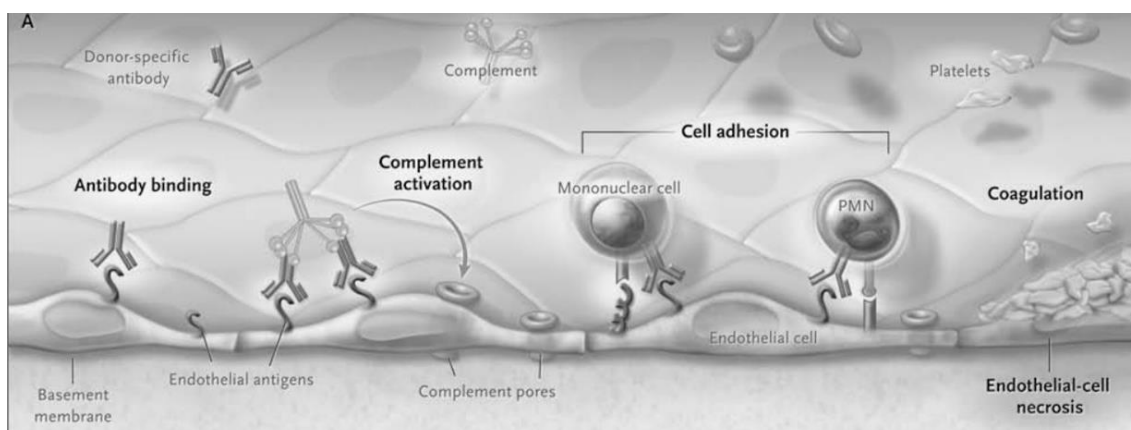


Figura 6. Ligação dos anticorpos aos antígenos endoteliais com consequente ativação do complemento e formação do complexo de ataque a membrana que resulta em necrose endotelial. Adaptado de Nankivell et al,2010 (45).

A **rejeição aguda mediada por células** se inicia pela apresentação de aloantígenos do doador aos linfócitos T do receptor através das células apresentadoras de antígenos (APCs). O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) contém os genes HLA, altamente polimórficos, e que codificam as glicoproteínas que permitem que as APCs apresentem fragmentos de antígenos (peptídeos) aos receptores de células T. As moléculas MHC são, como previamente descrito, de classe I ou classe II, tendo como principal diferença funcional que as moléculas de classe I apresentam peptídeos derivados de proteínas intracelulares aos linfócitos citotóxicos T CD8, enquanto as moléculas de classe II apresentam peptídeos derivados de proteínas extracelulares aos linfócitos T CD4, no fenômeno conhecido como “restrição do MHC” (Figura 7).

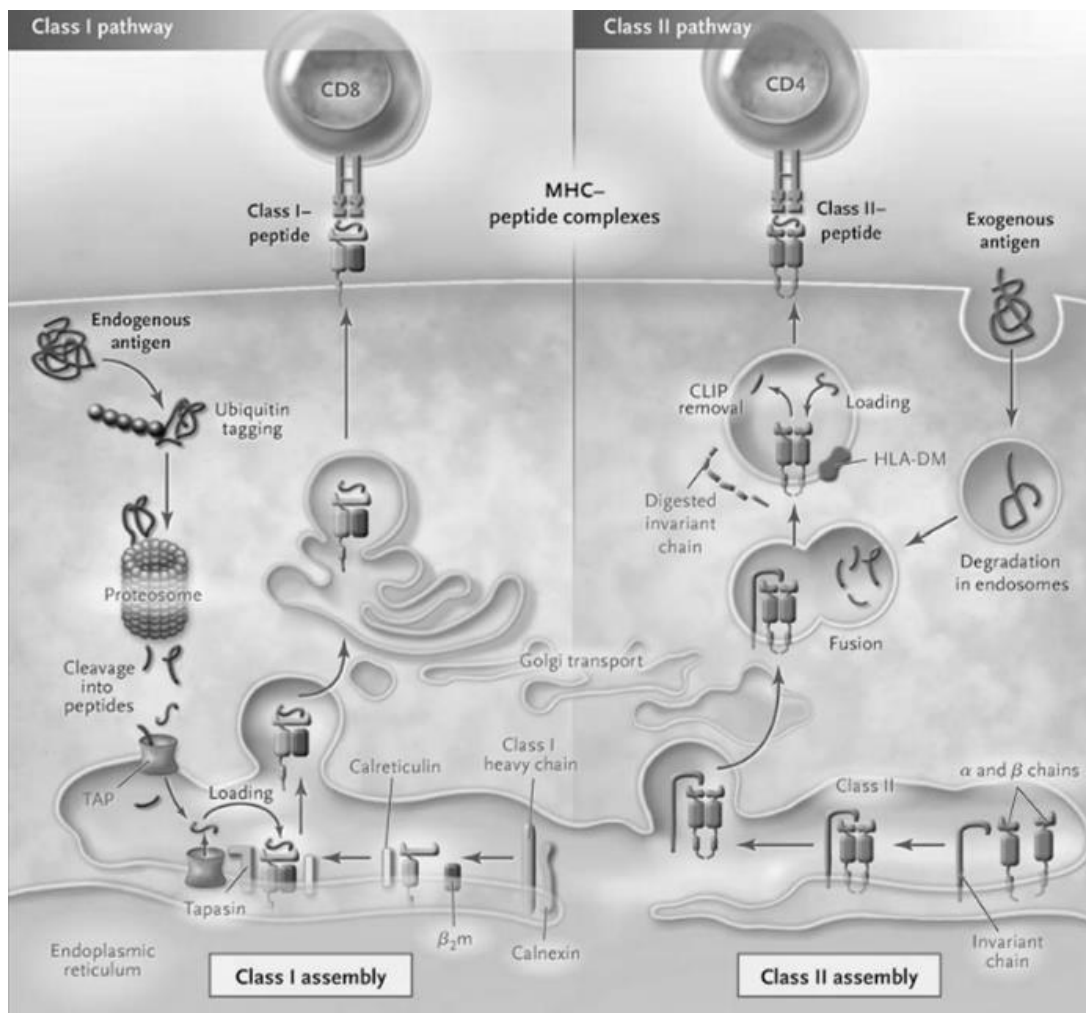


Figura 7. Processamento de antígenos endógenos (peptídeos derivados de proteínas intracelulares) através dos linfócitos T CD8 e dos antígenos exógenos (peptídeos derivados de proteínas extracelulares) através dos linfócitos T CD4. Adaptado de Nankivell et al, 2010 (45).

Essa apresentação de antígenos pode se dar por três vias de alorreconhecimento: (a) via direta, os linfócitos T do receptor reconhecem MHC + peptídeo nas APC do doador; (b) via indireta, linfócitos T do receptor reconhecem os antígenos derivados do doador processados e apresentados por APC do próprio receptor e; (c) via semi-direta, os linfócitos T do receptor reconhecem moléculas MHC derivadas do doador que foram transferidas para a superfície de células do receptor por mecanismo chamado trogocitose (figura 8). A via indireta de alorreconhecimento se torna mais importante no processo de injúria ao enxerto com o passar do tempo, na medida em que desaparecem as APCs do doador. (14,45,53)

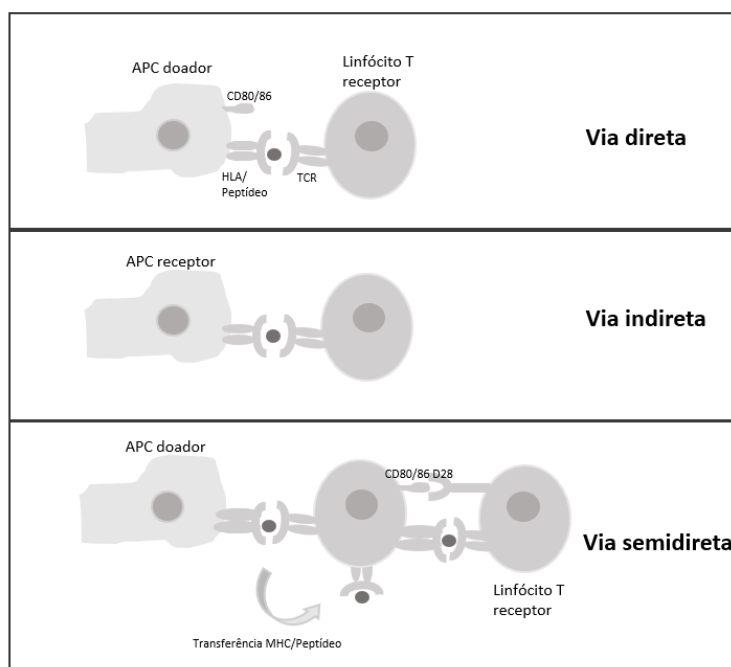


Figura 8. Vias de alorreconhecimento.

Após a apresentação do antígeno pela APC, o linfócito T é ativado e, a seguir, prolifera e se diferencia em subgrupos de células T auxiliares que possuem diferentes perfis de produção de citocinas. Existe, no entanto, uma sobreposição das suas funções efetoras, já que as células T CD4⁺ produzem citocinas inflamatórias como IF- γ e IL-2, indutoras da resposta celular, e IL-4, IL-5 e IL-13, indutoras da resposta humoral, e as células T CD8⁺ promovem citotoxicidade direta (figura 9) (45,54,55).

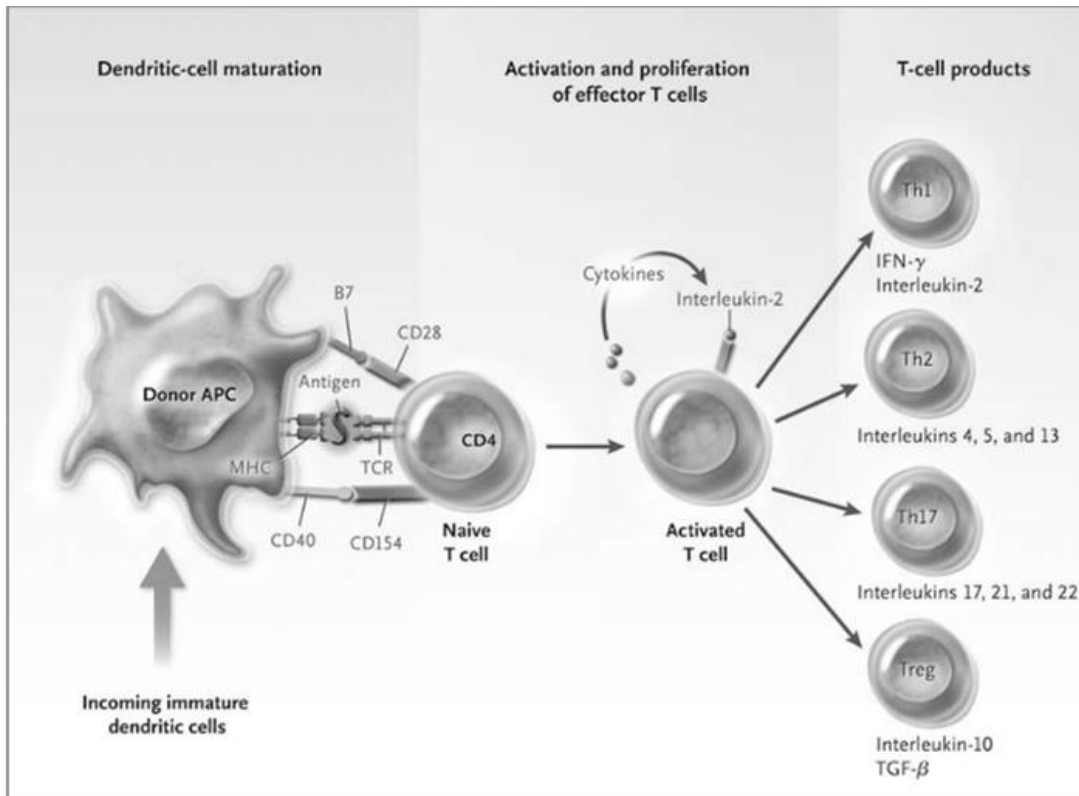


Figura 9. Ativação e diferenciação linfocitária. Adaptado de Nankivell et al, 2010 (45).

Além das células mononucleares, como os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, citocinas inflamatórias e quimiocinas se acumulam nos locais de rejeição celular aguda e há, também, a participação de outras células e vias na rejeição. A expressão de genes de células B e CD20 aumentam em rejeição celular severa, infiltração eosinofílica ocorre em rejeições corticorresistentes, macrófagos ativados secretam citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-12, e IL-18, TNF- α , e IF- γ) intensificam a reação inflamatória que propicia a deterioração da função do enxerto (45,52,56).

Em decorrência de proliferação clonal ocorrendo no interstício há infiltração por células mononucleares, que a seguir, invadem os túbulos renais causando o fenômeno conhecido por “tubulite”. Citocinas inflamatórias produzidas por esses linfócitos T no interstício ativam as células epiteliais tubulares que, por sua vez, atraem mais linfócitos através da liberação de quimiocinas (como CCL2, CCL5 e CXCL1). Os linfócitos T CD8⁺ que tem especificidade imunológica com o enxerto cruzam a membrana basal do túbulo, onde proliferam e levam a apoptose das células tubulares e, por fim essas células tubulares lesadas contribuem para a promoção da fibrose intersticial. Esse mecanismo

de ruptura da membrana basal associado a necrose das células epiteliais tubulares levam a uma disfunção do enxerto e atrofia tubular progressivas (45,57).

Rejeição vascular (arterite ou endarterite) que se caracteriza pela infiltração dos vasos por células mononucleares, apoptose de células endoteliais e a síntese de matriz protéica e colágeno pelos miofibroblastos. Nesta apresentação, os linfócitos T CD4+ e T CD8+ e macrófagos invadem a camada íntima e o subendotélio das artérias por intermédio das moléculas de adesão ICAM-1 ou VCAM, além da participação de anticorpos anti-MHC, células *natural killer* e IF- α nesta invasão vascular. Esta forma de rejeição é uma condição severa que geralmente não responde à corticoterapia e necessita terapia potente com anticorpos antilinfocitários (45,58,59).

Com a evolução dos esquemas imunossupressores a incidência de rejeição aguda apresentou importante redução nos últimos anos. Mesmo decrescendo ao longo do tempo ela permanece sendo uma complicação importante, principalmente no grupo de pacientes que apresentam disfunção inicial do enxerto, com repercussões sobre o prognóstico do transplante. Em estudo recente Sandes-Freitas *et al.* demonstraram incidência de RA significativamente maior em pacientes com DGF em comparação com aqueles sem DGF (36,2% vs. 12,2%, $p < 0,001$) (19). Outro estudo, ainda mais recente, publicado no mesmo periódico, confirma maior incidência de rejeição aguda comprovada por biópsia em pacientes do grupo DGF (27,3% no grupo DGF vs. 17,9% no grupo sem DGF, $p < 0,05$) (60). A ocorrência da DGF também se associou a maior incidência de rejeição aguda com classificação de Banff \geq IA (RA em 24,5% do grupo com DGF e 14,7% em grupo sem DGF, $p=0,017$) no estudo apresentado por Helfer *et al.*, além de ter apresentado uma função reduzida do enxerto até seis anos após o transplante e menor sobrevida do enxerto (26). Esses dados, recentemente publicados, ratificam a importância da realização de biópsias de vigilância no grupo de pacientes com disfunção inicial do enxerto, que conforme citado previamente, apresentam um aumento de imunogenicidade do enxerto com consequente aumento do risco de rejeição e redução da sobrevida do enxerto.

3. MARCO CONCEITUAL

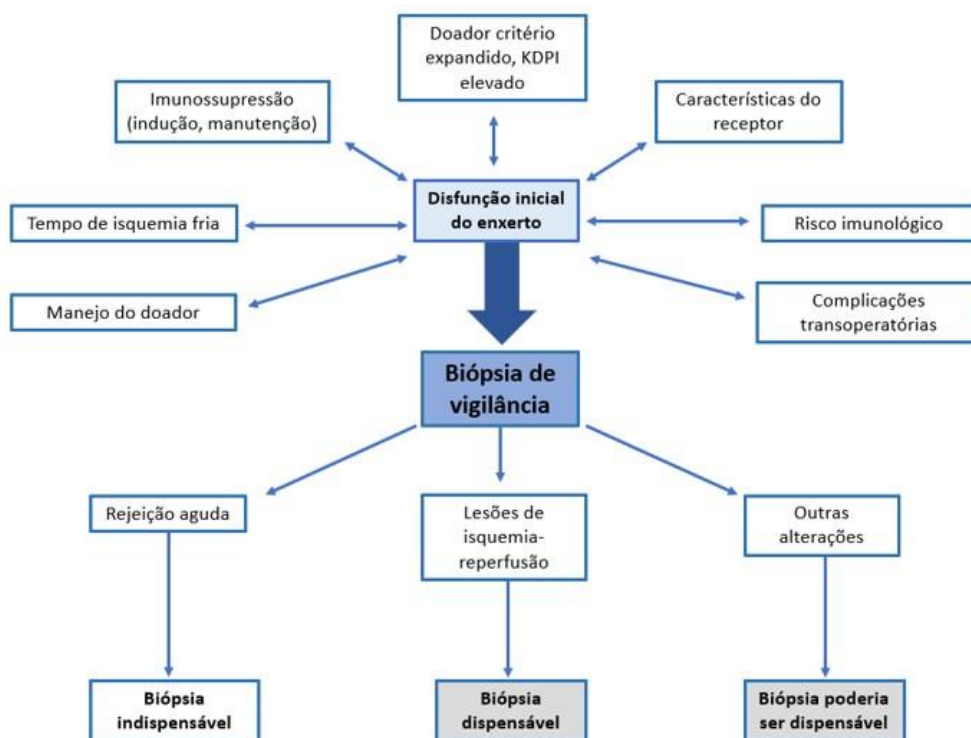


Figura 10. Representação esquemática simplificada do marco conceitual: utilidade da biópsia de vigilância.

4. JUSTIFICATIVA

As biópsias de rins transplantados geralmente são indicadas com o objetivo de identificar lesões que levam a alteração da função renal ou produzem sinais de agressão. Estudos prévios demonstram que a rejeição aguda subclínica é prevalente em biópsias protocolares (aquelas realizadas a despeito da função renal e em momento pré-estabelecido) e se associa disfunção tardia do enxerto (61), assim como o tratamento precoce destas alterações poderia reduzir a progressão para fibrose intersticial e atrofia tubular (FI/AT), além de melhorar a função do enxerto renal a longo prazo (62–65). No entanto esses estudos iniciais foram realizados em coortes de pacientes transplantados que receberam regimes de imunossupressão consideravelmente menos eficientes e estudos com pacientes que receberam terapia imunossupressora mais eficiente mostram uma diminuição significativa da incidência de rejeição subclínica (66).

Com relação às biópsias chamadas “de vigilância” ainda há uma escassez de dados publicados. Em uma coorte anterior de nosso serviço demonstramos que as biópsias de vigilância permaneciam um instrumento útil em pacientes transplantados renais durante o período de DGF e com disfunção aguda do enxerto (67). No entanto o impacto da terapia imunossupressora contemporânea nessa utilidade não foi avaliado até o presente momento.

As biópsias de vigilância são recomendadas pelas diretrizes e exercidas na prática clínica, sendo realizadas em 7 a 10 dias nos pacientes com DGF (9–12). O racional para sua realização é revelar processos nocivos ao enxerto que estejam mascarados pelas lesões de isquemia-reperfusão, em especial a necrose tubular aguda (NTA). Entre essas lesões destacam-se a rejeição aguda (RA), pielonefrite do enxerto e a nefrotoxicidade por drogas imunossupressoras, primordialmente os inibidores da calcineurina.

O aprimoramento dos regimes de imunossupressão levou a uma redução significativa da rejeição aguda e da nefrotoxicidade, assim, atualmente as biópsias de vigilância provavelmente tenham uma relevância significativamente menor do que no passado. Dessa forma, o presente estudo busca identificar grupos de pacientes que poderiam não se beneficiar da biópsia de vigilância, na medida que a biópsia renal

agrega riscos e custos. Apesar de baixa probabilidade de complicações clinicamente relevantes ocorrerem em biópsias de pacientes estáveis (biópsias protocolares), não há uma avaliação sistemática do custo-benefício das biópsias de vigilância (16,68).

Dessa forma realizamos o presente estudo para testar a hipótese de que as biópsias de vigilância possam não mais ser necessárias em função da maior efetividade da terapia imunossupressora contemporânea.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral:

Avaliar resultados das biópsias de vigilância em transplantados renais com disfunção inicial do enxerto.

5.2 Objetivos específicos:

5.2.1. Avaliar o impacto do regime de imunossupressão na incidência de rejeição aguda observada nas biópsias de vigilância;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABTO. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2005-2015). *Regist Bras Transplantes* [Internet]. 2015;21(1):88. Available from: <http://www.abto.org.br/>
2. ABTO. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2011-2018). *Regist Bras Transplantes*. 2018. [Internet] Available from: <http://www.abto.org.br/>
3. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med*. 1999;341(23):1725–30.
4. Anil Kumar MS, Khan SM, Jaglan S, Heifets M, Moritz MJ, Saeed MI, et al. Successful transplantation of kidneys from deceased donors with acute renal failure: Three-year results. *Transplantation*. 2006;82(12):1640–5.
5. Gill J, Dong J, Rose C, Gill JS. The risk of allograft failure and the survival benefit of kidney transplantation are complicated by delayed graft function. *Kidney Int*. 2016;89(6):1331–6.
6. Boffa C, van de Leemkolk F, Curnow E, Homan van der Heide J, Gilbert J, Sharples E, et al. Transplantation of Kidneys From Donors With Acute Kidney Injury: Friend or Foe? *Am J Transplant*. 2017;17(2):411–9.
7. Mallon DH, Summers DM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Defining delayed graft function after renal transplantation: Simplest is best. *Transplantation*. 2013;96(10):885–9.
8. Helfer MS, Vicari AR, Spuldaro F, Goncalves LFS, Manfro RC. Incidence, risk factors, and outcomes of delayed graft function in deceased donor kidney transplantation in a Brazilian center. *Transplant Proc*. 2014;46(6):1727–9.
9. Chadban SJ, Barraclough KA, Campbell SB, Clark CJ, Coates PT, Cohn SJ, et al. KHA-CARI guideline: KHA-CARI adaptation of the KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *Nephrology (Carlton)*. 2012;17(3):204–14.
10. Knoll GA, Blydt-Hansen TD, Campbell P, Cantarovich M, Cole E, Fairhead T, et al. Canadian Society of Transplantation and Canadian Society of Nephrology Commentary on the 2009 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *Am J Kidney Dis*. 2010;56(2):219–46.
11. Bia M, Adey DB, Bloom RD, Chan L, Kulkarni S, Tomlanovich S. KDOQI US commentary on the 2009 KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Kidney Dis*. 2010;56(2):189–218.
12. Kasiske BL, Zeier MG, Chapman JR, Craig JC, Ekberg H, Garvey CA, et al. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a

- summary. *Kidney Int.* 2009;77(4):299–311.
13. Rush DN, Karpinski ME, Nickerson P, Dancea S, Birk P, Jeffery JR. Does subclinical rejection contribute to chronic rejection in renal transplant patients? *Clin Transplant.* 1999;13(6):441–6.
 14. Manfro RC, Noronha IL, Pacheco e Silva Filho A. *Manual de Transplante Renal.* 2° ed. Barueri, SP: Manole; 2014. 281–316 p.
 15. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolckoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med.* 2002;346(8):580–90.
 16. Huang Y, Farkash E. Protocol Biopsies: Utility and Limitations. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2016;23(5):326–31.
 17. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant.* 2011;11(11):2279–96.
 18. Azevedo LS, Castro MCR, Monteiro De Carvalho DB, D’Avila DO, Contieri F, Gonçalves RT, et al. Incidence of delayed graft function in cadaveric kidney transplants in Brazil: A multicenter analysis. *Transplant Proc.* 2005;37(6):2746–7.
 19. de Sandes-Freitas TV, Felipe CR, Aguiar WF, Cristelli MP, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO. Prolonged Delayed Graft Function Is Associated with Inferior Patient and Kidney Allograft Survivals. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144188.
 20. Irish WD, Ilsley JN, Schnitzler MA, Feng S, Brennan DC. A Risk Prediction Model for Delayed Graft Function in the Current Era of Deceased Donor Renal Transplantation. *Am J Transplant.* 2010;10(10):2279–86.
 21. Lim WH, Johnson DW, Teixeira-Pinto A, Wong G. Association between duration of delayed graft function, acute rejection and allograft outcome after deceased donor kidney transplantation. *Transplantation.* 2019;103(2):412-419.
 22. Lee J, Song SH, Lee JY, Kim DG, Lee JG, Kim BS, et al. The recovery status from delayed graft function can predict long-term outcome after deceased donor kidney transplantation. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–8.
 23. Zens TJ, Danobeitia JS, Levenson G, Chlebeck PJ, Zitur LJ, Redfield RR, et al. The impact of kidney donor profile index on delayed graft function and transplant outcomes: A single-center analysis. *Clin Transplant.* 2018;32(3):e13190.
 24. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet (London, England).* 2004;364(9447):1814–27.
 25. Malinoski DJ, Patel MS, Ahmed O, Daly MC, Mooney S, Graybill CO, et al. The Impact of Meeting Donor Management Goals on the Development of Delayed Graft Function in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 2013;13(4):993–1000.
 26. Helfer M, Pompeo J, Costa O, Vicari A, Ribeiro A, Manfro R. Long-term effects of delayed graft function duration on function and survival of deceased donor

- kidney transplants. *Brazilian J Nephrol.* 2019;(41)231–241.
27. Li C, Jackson R. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;227–41.
 28. Requião-Moura LR, Durão Junior M de S, Matos ACC de, Pacheco-Silva A. Ischemia and reperfusion injury in renal transplantation: hemodynamic and immunological paradigms. *Einstein (São Paulo).* 2015;13(1):129–35.
 29. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest.* 2004;114(1):5–14.
 30. Gandolfo M-T, Rabb H. Very early alloantigen-independent trafficking of lymphocytes during ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* 2007;71(12):1193–5.
 31. Cruvinel WM, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória; Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammation. *Rev bras Reum.* 2010;50(4):434–447.
 32. Manfro R, Franco R, Gonçalves LF. *Imunologia dos Transplantes Renais e Imunossupressão.* In: *Nefrologia na Prática Clínica.* 1ª ed. São Paulo: Editora Balieiro, 2019.
 33. First MR. Strategies to minimize immunological and nonimmunological risk factors in the renal transplant population. *Transplantation.* 2001 Sep;72(6 Suppl):S20-4.
 34. Danovitch GM. Immunosuppressive medications for renal transplantation: a multiple choice question. *Kidney Int.* 2001 Jan;59(1):388–402.
 35. Hill P, Cross NB, Barnett ANR, Palmer SC, Webster AC. Polyclonal and monoclonal antibodies for induction therapy in kidney transplant recipients. *Cochrane database Syst Rev.* 2017 Jan;1:CD004759.
 36. Grgic I, Chandraker A. Significance of biologics in renal transplantation: past, present, and future. *Curr Opin Organ Transplant.* 2018 Feb;23(1):51–62.
 37. Andreoni KA, Brayman KL, Guidinger MK, Sommers CM, Sung RS. Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1996-2005. *Am J Transplant.* 2007;7(5 Pt 2):1359–75.
 38. Metha R, Cherikh W, Starzl TE, Mehta R. Kidney allograft surveillance biopsy practices across US transplant centers: A UNOS survey. *Clin Transplant.* 2017;31(5).
 39. Hošková L, Málek I, Kopkan L, Kautzner J. Pathophysiological Mechanisms of Calcineurin Inhibitor-Induced Nephrotoxicity and Arterial Hypertension Immunosuppressive therapy. 2017;8408:167–80.
 40. Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perlroth M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med.* 1984;311(11):699–705.
 41. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.*

- 2003;349(24):2326–33.
42. Naesens M, Kuypers DRJ, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(2):481–508.
 43. Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med*. 2003;349(10):931–40.
 44. Magee C, Pascual M. The growing problem of chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med*. 2003;349(10):994–6.
 45. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the Kidney Allograft. Schwartz RS, editor. *N Engl J Med*. 2010;363(15):1451–62.
 46. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of Improvement in Renal Allograft Survival Despite a Marked Decrease in Acute Rejection Rates over the Most Recent Era. *Am J Transplant*. 2004;4(3):378–83.
 47. Ponticelli C. Ischaemia-reperfusion injury: A major protagonist in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(6):1134–40.
 48. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med*. 2000;342(9):605–12.
 49. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufousse C, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant*. 2018;18(2):293–307.
 50. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: Diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(4):1046–56.
 51. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant*. 2003 Jun;3(6):665–73.
 52. Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection and Acceptance. *Annu Rev Pathol* 2008;3:189-220.
 53. Womer KL, Sayegh MH, Auchincloss HJ. Involvement of the direct and indirect pathways of allorecognition in tolerance induction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356(1409):639–47.
 54. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009;361(9):888.
 55. Csencsits KL, Bishop DK. Contrasting alloreactive CD4+ and CD8+ T cells: There's more to it than MHC restriction. Vol. 3, *Am J Transplant*. 2003;107–15.
 56. Wyburn KR, Jose MD, Wu H, Atkins RC, Chadban SJ. The Role of Macrophages in Allograft Rejection. *Transplantation*. 2005;80(12):1641–7.
 57. Bonsib SM, Abul-Ezz SR, Ahmad I, Young SM, Ellis EN, Schneider DL, et al. Acute rejection-associated tubular basement membrane defects and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int*. 2000;58(5):2206–14.

58. Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA. Leukocyte extravasation: Chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*. 2002;3853–60.
59. Sun Q, Liu ZH, Ji S, Chen J, Tang Z, Zeng C, et al. Late and early C4d-positive acute rejection: Different clinico- histopathological subentities in renal transplantation. *Kidney Int*. 2006;70(2):377–83.
60. Weber S, Dienemann T, Jacobi J, Eckardt K, Weidemann A. Delayed graft function is associated with an increased rate of renal allograft rejection: A retrospective single center analysis. *PLoS One*. 2018;1–13.
61. Rush DN, Jeffery JR, Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients: repeated inflammation is associated with impaired graft function at 1 year. *Transplant Proc*. 1995;27(1):1017–8.
62. Rush D, Nickerson P, Gough J, McKenna R, Grimm P, Cheang M, et al. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol*. 1998 Nov;9(11):2129–34.
63. Kurtkoti J, Sakhuja V, Sud K, Minz M, Nada R, Kohli HS, et al. The utility of 1- and 3-month protocol biopsies on renal allograft function: a randomized controlled study. *Am J Transplant*. 2008;8(2):317–23.
64. Choi BS, Shin MJ, Shin SJ, Kim YS, Choi YJ, Kim Y-S, et al. Clinical significance of an early protocol biopsy in living-donor renal transplantation: ten-year experience at a single center. *Am J Transplant*. 2005;5(6):1354–60.
65. Veronese FV, Manfro RC, Roman FR, Edelweiss MI, Rush DN, Dancea S, et al. Reproducibility of the Banff classification in subclinical kidney transplant rejection. *Clin Transplant*. 2005;19(4):518–21.
66. Rush D, Arlen D, Boucher A, Busque S, Cockfield SM, Girardin C, et al. Lack of benefit of early protocol biopsies in renal transplant patients receiving TAC and MMF: a randomized study. *Am J Transplant*. 2007;7(11):2538–45.
67. Silva DM, Garcia JP, Ribeiro AR, Veronese FJ, Edelweiss MI, Gonçalves LF, et al. Utility of Biopsy in Kidney Transplants With Delayed Graft Function and Acute Dysfunction. *Transplant Proc*. 2007;39(2):376–7.
68. Furness PN, Philpott CM, Chorbajian MT, Nicholson ML, Bosmans J-L, Corthouts BL, et al. Protocol biopsy of the stable renal transplant: a multicenter study of methods and complication rates. *Transplantation*. 2003;76(6):969–73.

7. ARTIGO

Evaluation of the utility of surveillance graft biopsies in kidney transplant recipients with delayed graft function.

Joao Batista Saldanha de Castro Filho¹

<https://orcid.org/0000-0003-4719-2110>

Jeferson de Castro Pompeo³

<https://orcid.org/0000-0003-0602-1999>

Rafael Berlezi Machado³

<https://orcid.org/0000-0002-5943-7798>

Roberto Ceratti Manfro^{1,2,3}

<https://orcid.org/0000-0001-8324-3734>

¹ Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

² Division of Transplantation, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

³ UFRGS Medical School, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author

Roberto C. Manfro MD, PhD.

Division of Transplantation.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Federal University of Rio Grande do Sul

2350 Ramiro Barcelos St. 90040-003

Porto Alegre, RS. Brazil

rmanfro@hcpa.edu.br

Abstract

Current guidelines recommend performing surveillance biopsies in patients with delayed graft function (DGF). These guidelines were written in an era in which the effectiveness of immunosuppressive therapy was substantially lower in preventing acute rejection. The elevated incidence of DGF observed in Brazil, after deceased donor kidney transplantation, leads to an elevated need for performing such biopsies since an elevated incidence of acute rejection is observed in these patients. This is a single-center, retrospective study including kidney transplant recipients (KTR) that underwent a graft biopsy during the DGF period between January 2006 and July 2019. Three hundred and fifty six biopsies were performed in 335 patients, the results were 6 (1.7%) normal biopsies, 142 (39.9%) isolated acute tubular necrosis, 90 (25.7%) borderline rejections, 92 (25.7%) acute rejections, 23 (6.5%) coagulation necrosis, 1 (0.3%) thrombotic microangiopathy and 2 (0.6%) pyelonephritis. As significant risk factors for acute rejection we identify on multivariate analysis recipient age, DGF duration, vascular anastomosis time as well as an important protective effect of induction therapy with polyclonal antibodies. In conclusion, surveillance biopsies of kidney grafts undergoing DGF remain an essential tool for clinical care of kidney transplant recipients.

Abbreviations: DGF, delayed graft function; ECD, expanded criteria donors; BDD, brain dead donors; DSA, donor specific antibodies; AR, acute rejection; PRA: panel reactive antibodies.

Introduction

Over the last decades kidney transplantation has become an effective lifesaving procedure for a substantial portion of patients with end-stage kidney diseases (1). Besides increasing life expectancy, successful renal transplants offer a better life-quality as compared to other forms of renal replacement therapies (2). In the decade between 2009 and 2018 the number of kidney grafts increased by 32 % in the USA and by 55 % in Brazil. A substantial part of this increase is due to a more flexible policy of living donation in some countries but not in all (3). However, the large majority of the kidney transplants continues to be performed with organs of deceased donors in both countries (4,5). As compared to transplants with organs from living-donors, deceased donor kidney transplantation is associated with a higher incidence of delayed graft function (DGF), which itself as long being associated to lower graft survival and perhaps lower patient survival (6–8).

Besides, another observed phenomenon, is the increasing age of deceased donors and the use of donors in circulatory death (DCD) (9). Also, organs donated by expanded criteria donors (ECD), from donors with high kidney donor profile index (KDPI) are largely utilized, and tend to be allocated to older recipients (10,11). Such donors and recipients characteristics, along with a variety of others, that include cold ischemia time (CIT), type of preservation solution and technique (static versus pulsatile) and immunosuppressive regimen are associated with the occurrence of DGF that is currently best characterized by the need of dialysis within the first week after transplantation (12). Delayed graft function occurs in approximately one fourth of kidney transplants in North America but for reasons that are not entirely clear yet, has a much higher incidence in Brazil (3,6). Graft injuries, during DGF, immunologic and others, usually go unnoticed due to the absence of graft functional parameters usually used to monitor such injuries. Therefore, the only reliable tool to uncover injury is the graft surveillance biopsy. Importantly, the incidence of acute rejection is substantially higher in kidney grafts undergoing DGF (13,14).

Current guidelines indicate graft tissue histologic evaluation every 7-10 days until the graft acquires function (15,16). Accordingly, surveillance biopsies are frequently performed in this setting mainly in centers in which a high incidence of DGF is observed. However, guidelines were proposed in an era in which the effectiveness of

immunosuppressive therapy, in terms of preventing acute rejection, was substantially lower (15,17).

The aim of the present study is to evaluate the utility of surveillance biopsies in uncovering graft injuries, other than those related to reperfusion-ischemia injuries that would lead to specific treatments, mainly acute cellular and/or antibody-mediated rejections.

Materials and Methods

Study design, variables and biopsies

This is a retrospective study that included all deceased donor kidney transplant recipients who developed DGF and underwent a surveillance graft biopsy between January 1st, 2006 and July 31st, 2019 at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil. The study flow-chart is shown in Figure 1. All data was acquired by systematic review of medical charts and electronic medical records. Individual patient's records were anonymous registered in the study database. During the study period 1204 deceased donor (brain dead) kidney transplants were performed. Three hundred and thirty-five patients were submitted to 351 surveillance biopsies and were included in the survey. Variables included in the analysis were: (a) donors variables: age, ethnicity, acute renal injury and ECD; (b) recipients variables: age, ethnicity, gender, previous transplantation, antibody induction therapy, calculated panel reactive antibodies (cPRA), presence of donor specific antibodies (DSA), HLA mismatches, positive flow cytometry cross match and DGF duration; and (c) transplant variables: cold ischemia time and vascular anastomosis time.

The kidney biopsies were performed through real-time ultrasonography guidance, using a semiautomatic gun with a 16-G biopsy needle. Slides were stained with hematoxylin-eosin, periodic acid shift and Masson's trichrome and evaluated by a kidney transplant pathologist who was unaware of the clinical data. Slides were interpreted according to the Banff classification current at the time of the evaluation.

Due to the retrospective nature of this study, the informed consent was not required. The study was approved by the local Ethics Committee (protocol number 64239617.4.0000.5327).

Definitions

Delayed graft function was defined as the requirement of at least one dialysis session during the first week after transplantation (12,13). DGF duration was recorded from the day of transplantation to the day of the last dialysis session. Expanded criteria donors were defined according to the UNOS criteria as all donors aged 60 years or older and those aged 50 to 59 years with at least two of the following conditions: cerebrovascular cause of death, serum creatinine ≥ 1.5 mg/dL, and hypertension (18,19).

Statistical analysis

Data is presented in absolute numbers, percentages and frequencies. Continuous variables are presented as mean \pm standard deviation, compared using ANOVA, with *Tukey post hoc* test. Categorical variables as frequencies, and compared using Chi-square tests.

Sixteen variables included in the model for acute rejection risk analysis. Namely, donor and recipient age, donor and recipient ethnicity, recipient gender, donor final serum creatinine > 1.5 mg/dL, ECD, previous transplantation, cPRA > 0 , HLA mismatches, DSA, cold ischemia time, vascular anastomosis time, DGF duration (days), positive flow cytometry cross match and immunosuppressive antibody induction with polyclonal anti T cell antibody. Analyzed by robust Poisson regression.

P values lower than .05 were considered statistically significant. Variables with a P value $\leq .2$ in the univariable analysis were included in multivariable analysis model.

Statistical analysis was performed using SPSS v. 18.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Results

In the study period 356 allograft biopsies were performed in 335 kidney transplant recipients. All recipients received organs from brain dead deceased donors. Demographic data of recipients, donors and transplant related variables are demonstrated in Table 1.

The majority of the patients were male (61.2%), Caucasians (74.9%) and without HLA sensitization (51.7% zero PRA). All patients received an initial immunosuppressive regimen consisting of steroids, calcineurin inhibitor (tacrolimus or cyclosporine) and anti-proliferative agents (azathioprine, sodium/mophetil mycophenolate) with or without antibody induction (Basiliximab in 148 patients (44.1%; 156 biopsies) or polyclonal anti-T cell antibodies in 151 patients (45.0%; 157 biopsies). The most common maintenance regimen was tacrolimus, sodium mycophenolate and steroids in 288 (85.9%) patients.

Biopsy results

The number of patients with one, two and three biopsies were 317,15 and 3 respectively. As depicted in Figure 2 six biopsies (1.7%) were read as normal transplant kidney, 142 (39.9%) presented with pure acute tubular necrosis (ATN), 90 (25.3%) presented borderline acute rejections, 92 (25.7%) presented acute rejection (AR), either cellular (87 cases, 24.3%) or antibody-mediated (5 cases, 1.4%), 23 (6.5%) were read with coagulation necrosis, 2 (0.6%) with acute pyelonephritis and one biopsy (0.3%) was interpreted as having thrombotic microangiopathy (Figure 2).

Figure 3 shows the Banff classification the biopsies that were interpreted as having acute rejection. As shown in the Figure the large majority were cellular rejections, predominantly IA and IIA phenotype and a small proportion of the more severe phenotypes, including antibody-mediated rejection, was observed. Importantly all biopsies with acute antibody-mediated rejection were from high immunological risk patients that received induction therapy with polyclonal anti T cell antibodies. (Figure 3).

The risk factors for acute rejection included in the analysis were: donor related (age, ethnicity, acute renal injury and ECD), recipient related (age, ethnicity, gender, previous transplantation, antibody induction therapy, cPRA, presence of DSA, HLA mismatches, positive flow cytometry cross match and DGF duration) and those related to the surgery (cold ischemia time and vascular anastomosis time). Risk factors were analyzed through univariate and multivariate (table 2) methods. Variables with a P value lower than 0.2 in the univariate analysis were included in multivariate analysis.

In the univariate analysis the risk factors with statistical significance for rejection were: positive flow cytometry cross match ($p < 0.05$), vascular anastomosis time ($p < 0.05$), DGF duration ($p < 0.05$) and a protective effect of induction therapy with polyclonal antibodies ($p < 0.005$). These factors and recipient's age ($p < 0.2$) were included in multivariate analysis.

In multivariate analysis model the variables that remained significant were recipient's age, DGF duration, vascular anastomosis time and induction therapy with polyclonal antibodies (Table 2).

Immunosuppressive regimen and the occurrence of rejection

The incidence of rejection was influenced by the immunosuppressive regimen. In the 36 patients that did not receive induction the incidence of acute rejection was 36.1% (13 episodes; all cellular rejection phenotype). Patients treated with Basiliximab (N = 148) 37.8 % incidence was observed (56 episodes; all cellular rejection phenotype). And 151 patients treated with polyclonal anti T cell antibodies had a 15.2% incidence of acute rejection (23 episodes; 18 cellular and 5 antibody-mediated phenotypes). The frequencies of rejection were not different between the groups of patients without antibody induction and the group the received Basiliximab ($P = 0.126$). However, the incidence of acute rejection in the group that was treated with polyclonal anti T cell antibodies was significantly lower than in the group without antibody induction ($P < 0.001$) and also lower than the group treated with Basiliximab ($P < 0.001$). Table 3 shows the frequency of acute rejection according to the Banff classification and presence and type of antibody-induction. Importantly, this lower incidence in the depleting antibody group occurred in spite of the considerably higher rejection risk in this group of patients. Cold ischemia time, frequency of re-transplants, class I and II cPRA and frequency donor specific anti-HLA antibodies were all significantly higher in this group recipients.

Delayed graft function length and the occurrence of rejection

The incidence of rejection was influenced by DGF length. For this analysis patients were divided in three groups according to DGF duration. Group 1, up to 13 days (18 rejections); group 2, 14 to 26 days (33 rejections) and group 3 that included

patients with DGF longer than 27 days (41 rejections). The median day and interquartile interval (P25-75) for the biopsy procedure were 11 [7-13] days (group 1), 13 [10-14] (group 2) and 16 [10-20] days (group 3), and the percentages of acute rejection were in the groups were 15.0 , 28.2 and 34.4 %, respectively (P = 0.016).

Discussion

In the present study we analyzed the utility of surveillance graft biopsies of kidney transplants undergoing DGF and found a high frequency of injuries in particular cellular acute rejection. Importantly this occurred within a period of time in which the current immunosuppressive regimen did not change substantially but was different the most employed regimens used at time of guidelines publications.

Delayed graft function is a frequent complication of brain dead deceased donor kidney transplantation and is even more frequent when kidneys of circulatory death donors are transplanted (9). The incidence is also higher with organs from expanded criteria donors or high KDPI donors (13,20). Although there are a variety of definitions, the currently most accepted is the need for dialysis within the first week after transplantation (12). Clinically DGF occurs as a post-transplant acute kidney injury with graft failure that may be associated with organ procurement (inotropic support of the donor, cold ischemia time, and cold storage preservation), donor age, renal function and comorbidities, recipient factors (hypovolemia, previous transplantation, preformed anti-donor antibodies, and obesity). It may also be related to the transplant surgery and postoperative care (hydration, vascular anastomosis time, hemodynamic support) (21–25).

The incidence for DGF is highly variable. In the literature and in registry reports it ranges from around one forth to approximately two-thirds of transplants with brain dead deceased donors transplants (4,26–28). In addition, a higher incidence, around 40% is observed in transplants with organs from donors in circulatory death (9,13,29). Interestingly, for reasons that are not entirely clear, the reported incidence of DGF is consistently much higher in Brazil as compared to the one reported in national registries (7,8,28).

In this retrospective cohort, as expected, the largest percentage of the biopsies obtained during DGF presented histological diagnosis of isolated acute tubular necrosis. However, Banff IA or higher acute rejections were identified in one fourth of the biopsies and another one-fourth presented borderline findings of uncertain clinical significance. In the multivariate analysis, we found recipient age, vascular anastomosis time, and length of DGF as independent risk factors for acute rejection and antibody induction with polyclonal anti-T cell antibodies as a protective factor. Recently an important association between DGF duration and acute rejection was also demonstrated by Lim et al, who described that three-fourths of the acute rejection episodes occurred in kidney transplant recipients whose DGF period was longer than two weeks (29). Borderline findings can be the expression of an initial T cell mediated rejection but can also be due to non-alloimmune inflammation induced by different injuries, leaving its significance uncertain (14,30).

In the present study DGF was defined by the need of dialysis in the first week after transplantation. By this definition 64.5% of the deceased donor transplants within the study period underwent DGF. This frequency is similar to the one observed in previous studies from our center (7) and from other Brazilian centers (8) and is much higher than the incidence reported in national and transnational registries in the US and Europe, respectively (4,27,29). Most importantly a high frequency of acute rejection was found in the biopsies and this frequency was similar to the one previously reported by our and another large Brazilian transplant center (7,8). Additionally, longer periods of DGF correlated with a higher frequency of rejection episodes. Such relationship between DFG duration an increased risk of rejection was also reported in a large study by the Australian and New Zealand Dialysis and Transplant Registry (29).

The observed controversy, in the literature, on whether DGF is associated with an increased incidence of acute rejection and reduced graft survival is, at least partly, due to a lack of homogeneity of study cohorts and also to the large variety of DGF definitions (12,14,17,31). However, a variety of reports describes a much higher incidence (14,17,31). Wu and collaborators reported that DGF is an major risk factor for acute rejection in the modern era of immunosuppression and deceased donor kidney transplantation, showing that the cumulative probability for rejection was greater in DGF patients at all points over the follow-up period (17). A more recent study by

Weber *et al* demonstrated that the hazard ratio for developing acute rejection within the first year after transplantation was 71% higher in the group of patients with DGF (14). Perhaps the major hurdle of DGF is the inability of detecting or even suspecting the occurrence of graft acute rejection, due to the lack of graft functional parameters usually used to monitor injuries. Importantly, in the absence of accurate tools or biomarkers of rejection in this setting, the only reliable tool to uncover alloimmune graft injury is the surveillance biopsy.

In accordance with previous studies our results showed that the rejection rates decreases with age, that is, aging as a protective factor, reinforcing the suggestion that the immunosuppressive therapy could perhaps be reduced in aged recipients since they may have a progressive decline of immune functions (32–34).

Another strategy related to decreasing rejection incidence was the use of polyclonal anti-T cell antibodies (anti-thymocyte globulin), as induction therapy. In this study the cohort of patients that received anti-thymocyte globulin displayed a considerably higher immunological risk and, in spite of this, presented a substantially lower rejection incidence as compared with patients induced with monoclonal anti-IL2 receptor antibodies (Basiliximab) or patients that did not receive antibody induction therapy. Recently, was published by Alloway *et al* a report reanalyzing data from prior trials comparing ATG versus monoclonal antibodies indicated the superiority of ATG over Basiliximab in preventing acute rejection (35). Moreover, previous studies including patients with DGF ATG was more efficient in preventing acute rejection (36,37).

A small study of Hatoum and collaborators evaluated the utility of surveillance allograft biopsies during DGF in patients under current immunosuppressive therapy and concluded that rejection during DGF is uncommon and the utility of serial biopsies is limited in this setting due to the low incidence of acute rejection. Their results differ from ours in some aspects. The incidence of DGF is much lower, the study included recipients of living donors kidneys and had a higher proportion of african-american recipients (37). The differences found can perhaps be due to the severity of the ischemia-reperfusion injury. It is entirely conceivable that with higher incidence of DGF and use of organs from expanded criteria donors the incidence of rejection will be higher (14).

An interesting finding of this work was the independent association of prolonged vascular anastomosis time with the occurrence of acute rejection. The association of a prolonged vascular anastomosis time with DGF is expected and confirmed in a recent study (27). Moreover, the prolongation of warm ischemia can lead to a more intense ischemia and reperfusion injury. A well-known consequence of IRI is the activation of the innate immunity where signaling to transcription factors that encode genes involved in the regulation of inflammation. In such inflamed environment graft antigens are processed by antigen presenting cells and presented to host immune system facilitating acute rejection processes (38,39).

The present work, by selecting only biopsies of patients with DGF, does not allow analysis of DGF risk factors such as cold ischemia time, terminal serum creatinine and donor age, among others (21,40). However, in previous studies, cold ischemia time surfaced as an independent risk factor for acute rejection (24,41). We did not find such correlations and believe that the effect may have been lost due to the usually prolonged ischemia time, observed in our region, and perhaps for sample size matters.

Our study has limitations that are mostly related to its retrospective and single center design. In addition, early protocol biopsies, at a similar time of the surveillance DGF biopsies, of function kidney grafts could uncover unexpected lesions. Nevertheless, a considerable incidence of acute cellular rejection occurred during DGF period indicating that surveillance biopsies are instrumental for clinical care of kidney transplant recipients.

In conclusion, surveillance biopsies of kidney grafts undergoing DGF remain an essential tool for clinical care of kidney transplant recipients. This is perhaps even more important on settings where prolonged cold ischemia times and high incidences of DGF occur.

Disclosure

All the authors declared no competing interests.

References

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LYC, et al. Comparison of Mortality in All Patients on Dialysis, Patients on Dialysis Awaiting Transplantation, and Recipients of a First Cadaveric Transplant. *N Engl J Med*. 1999 Dec 2;341(23):1725–30.
2. Purnell TS, Auguste P, Crews DC, Lamprea-Montealegre J, Olufade T, Greer R, et al. Comparison of Life Participation Activities Among Adults Treated by Hemodialysis, Peritoneal Dialysis, and Kidney Transplantation: A Systematic Review. *Am J Kidney Dis*. 2013 Nov;62(5):953–73.
3. Wynn JJ, Alexander CE. Increasing organ donation and transplantation: the U.S. experience over the past decade. *Transpl Int*. 2011 Apr;24(4):324–32.
4. OPTN, SRTR. 2017 Annual Data Report. Scientific Registry of Transplant Recipients [Internet]. 2017. Available from: http://srtr.transplant.hrsa.gov/annual_reports/Default.aspx
5. ABTO. Brazilian Organ Transplantation society. Organ Transplantation in Brazil (2011-2018). Brazilian Transplantation Registry. 2018.
6. Helfer MS, Vicari AR, Spuldaro F, Goncalves LFS, Manfro RC. Incidence, risk factors, and outcomes of delayed graft function in deceased donor kidney transplantation in a Brazilian center. *Transplant Proc*. 2014;46(6):1727–9.
7. Helfer MS, Pompeo J de C, Costa ORS, Vicari AR, Ribeiro AR, Manfro RC. Long-term effects of delayed graft function duration on function and survival of deceased donor kidney transplants. *Brazilian J Nephrol*. 2019 Jun;41(2):231–41.
8. de Sandes-Freitas TV, Felipe CR, Aguiar WF, Cristelli MP, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO. Prolonged Delayed Graft Function Is Associated with Inferior Patient and Kidney Allograft Survivals. *PLoS One*. 2015 Dec 17;10(12):e0144188.
9. Summers DM, Watson CJE, Pettigrew GJ, Johnson RJ, Collett D, Neuberger JM, et al. Kidney donation after circulatory death (DCD): state of the art. *Kidney Int*. 2015 Aug;88(2):241–9.
10. Jay CL, Washburn K, Dean PG, Helmick RA, Pugh JA, Stegall MD. Survival Benefit in Older Patients Associated With Earlier Transplant With High KDPI Kidneys. *Transplantation*. 2017 Apr;101(4):867–72.
11. Savoye E, Tamarelle D, Chalem Y, Rebibou J-M, Tuppin P. Survival Benefits of Kidney Transplantation With Expanded Criteria Deceased Donors in Patients Aged 60 Years and Over. *Transplantation*. 2007 Dec;84(12):1618–24.
12. Mallon DH, Summers DM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Defining Delayed Graft Function after Renal Transplantation. *Transplantation* 2013;96: 885-889.
13. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant*. 2011;11(11):2279–96.
14. Weber S, Dienemann T, Jacobi J, Eckardt K, Weidemann A. Delayed graft function is associated with an increased rate of renal allograft rejection: A retrospective single center analysis. *PLoS One*. 2018 Jun 21;13(6):e0199445.

15. Kasiske BL, Zeier MG, Chapman JR, Craig JC, Ekberg H, Garvey CA, et al. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney Int.* 2009;77(4):299–311.
16. Bia M, Adey DB, Bloom RD, Chan L, Kulkarni S, Tomlanovich S. KDOQI US commentary on the 2009 KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Kidney Dis.* 2010;56(2):189–218.
17. Wu WK, Famure O, Li Y, Kim SJ. Delayed graft function and the risk of acute rejection in the modern era of kidney transplantation. *Kidney Int.* 2015;88(4):851–8.
18. Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA, Dykstra DM, Gillespie BW, Young EW, et al. Donor characteristics associated with reduced graft survival: An approach to expanding the pool of kidney donors. *Transplantation.* 2002;74(9):1281–6.
19. Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2003 Apr;3(s4):114–25.
20. Zens TJ, Danobeitia JS, Levenson G, Chlebeck PJ, Zitur LJ, Redfield RR, et al. The impact of kidney donor profile index on delayed graft function and transplant outcomes: A single-center analysis. *Clin Transplant.* 2018 Mar;32(3):e13190.
21. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet (London, England).* 2004;364(9447):1814–27.
22. Baptista APM, Silva HTJ, Pestana JOM. Influence of deceased donor hemodynamic factors in transplant recipients renal function. *Brazilian J Nephrol.* 2013;35(4):289–98.
23. Malinoski DJ, Patel MS, Ahmed O, Daly MC, Mooney S, Graybill CO, et al. The Impact of Meeting Donor Management Goals on the Development of Delayed Graft Function in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 2013 Apr;13(4):993–1000.
24. Irish WD, Ilsley JN, Schnitzler MA, Feng S, Brennan DC. A Risk Prediction Model for Delayed Graft Function in the Current Era of Deceased Donor Renal Transplantation. *Am J Transplant.* 2010 Sep 27;10(10):2279–86.
25. Kayler LK, Srinivas TR, Schold JD. Influence of CIT-Induced DGF on Kidney Transplant Outcomes. *Am J Transplant.* 2011 Dec;11(12):2657–64.
26. Heylen L, Naesens M, Jochmans I, Monbaliu D, Lerut E, Claes K, et al. The effect of anastomosis time on outcome in recipients of kidneys donated after brain death: A cohort study. *Am J Transplant.* 2015;15(11):2900–7.
27. Eurotransplant. 2018 Yearly Statistics Overview Eurotransplant. 2018; Available from: statistics.eurotransplant.org
28. Azevedo LS, Castro MCR, Monteiro De Carvalho DB, D’Avila DO, Contieri F, Gonçalves RT, et al. Incidence of delayed graft function in cadaveric kidney transplants in Brazil: A multicenter analysis. *Transplant Proc.* 2005;37(6):2746–7.

29. Lim WH, Johnson DW, Teixeira-Pinto A, Wong G. Association between duration of delayed graft function, acute rejection and allograft outcome after deceased donor kidney transplantation. *Transplantation*. 2019 Feb;103(2):412-419.
30. de Freitas DG, Sellarés J, Mengel M, Chang J, Hidalgo LG, Famulski KS, et al. The Nature of Biopsies with “Borderline Rejection” and Prospects for Eliminating This Category. *Am J Transplant*. 2012 Jan;12(1):191–201.
31. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: A systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(3):1039–47.
32. Bradley BA. Rejection and recipient age. *Transpl Immunol*. 2002;10(2–3):125–32.
33. Rana A, Murthy B, Pallister Z, Kueht M, Cotton R, Galvan NTN, et al. Profiling risk for acute rejection in kidney transplantation: recipient age is a robust risk factor. *J Nephrol*. 2017 Dec 29;30(6):859–68.
34. Panda A, Qian F, Mohanty S, van Duin D, Newman FK, Zhang L, et al. Age-Associated Decrease in TLR Function in Primary Human Dendritic Cells Predicts Influenza Vaccine Response. *J Immunol*. 2010 Mar 1;184(5):2518–27.
35. Alloway RR, Woodle ES, Abramowicz D, Segev DL, Castan R, Ilesley JN, et al. Rabbit anti- thymocyte globulin for the prevention of acute rejection in kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2019 Aug 3;19(8):2252–61.
36. Chen G, Gu J, Qiu J, Wang C, Fei J, Deng S, et al. Efficacy and safety of thymoglobulin and basiliximab in kidney transplant patients at high risk for acute rejection and delayed graft function. *Exp Clin Transplant*. 2013;11(4):310–4.
37. Hatoum HH, Patel A, Venkat KK. The Utility of Serial Allograft Biopsies during Delayed Graft Function in Renal Transplantation under Current Immunosuppressive Regimens. *ISRN Nephrol*. 2014;2014:1–3.
38. Zhao H, Alam A, Soo AP, George AJT, Ma D. Ischemia-Reperfusion Injury Reduces Long Term Renal Graft Survival: Mechanism and Beyond. *EBioMedicine*. 2018;28:31–42.
39. Ponticelli C. Ischaemia-reperfusion injury: A major protagonist in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(6):1134–40.
40. Miglinas M, Supranaviciene L, Mateikaite K, Skebas K, Kubiliene A. Delayed graft function: Risk factors and the effects of early function and graft survival. *Transplant Proc*. 2013;45(4):1363–7.
41. Mikhalski D, Wissing KM, Ghisdal L, Broeders N, Touly M, Hoang AD, et al. Cold ischemia is a major determinant of acute rejection and renal graft survival in the modern era of immunosuppression. *Transplantation*. 2008;85(7 SUPPL.):3–9.

Table 2. Demographic data of recipients, donors and transplantations.

Recipients/biopsies (number)	N = 335/356
Recipients' age (years, mean \pm SD)	46.1 \pm 12.9
Recipients' gender (male, number, %)	205 (61.2%)
Recipients' ethnicity (Caucasian, number, %)	251 (74.9%)
Donor's age (years, mean \pm SD)	43.7 \pm 16.6
Donor's creatinine (mg/dL) – (median; 95% CI)	1.40 [1.52–1.91]
Expanded criteria donors – (number; %)	116 (34.4%)
HLA mismatches – (median; 95% CI)	4.00 [3.34–3.76]
cPRA 0	163 (51.7%)
cPRA 1-50	107 (33.9%)
cPRA >50	45 (14.2%)
DGF duration (days mean \pm SD)	26.4 \pm 19.9
Dialysis sessions – (median; 95% CI)	9.0 [9.4–12.5]
Cold ischemia time (hours, mean \pm SD)	25.6 \pm 5.6
Vascular anastomosis time (minutes, mean \pm SD)	27.7 \pm 6.6
All biopsies postoperative day (mean \pm SD)	14.7 \pm 8.2
First biopsy postoperative day (N = 317; mean \pm SD)	12.4 \pm 6.1
Second biopsy postoperative day (N = 15; mean \pm SD)	23.6 \pm 8.0
Third biopsy postoperative day (N = 3; mean \pm SD)	41.3 \pm 13.4

Table 1. DGF: delayed graft function. m: mean. SD: standard deviation. 95%CI: confidence interval 95%. cPRA: calculated panel reactive antibodies.

Table 2. Univariate and multivariate analysis of acute rejection risk factors.

Univariate analysis	r	p-value
Donor related factors:		
Age	1.001	0.842
Ethnicity (non-white)	0.929	0.771
ECD	0.882	0.535
Renal insufficiency*	1.082	0.668
Recipient related factors:		
Age	0.988	0.078
Ethnicity (non-white)	1.275	0.228
Gender (male)	1.083	0.678
Previous transplantation	0.586	0.255
Induction therapy (polyclonal antibodies)	2.529	0.000
PRA > 0	0.799	0.223
DSA	0.761	0.322
HLA mismatches	1.100	0.251
+veFCXM	2.364	0.023
DGF duration	1.010	0.005
Surgery related factors:		
Cold ischemia time	0.983	0.245
Vascular anastomosis time	1.018	0.000
Multivariate analysis	r	p-value
Recipient age	0.981	0.008
Induction therapy (polyclonal antibodies)	3.436	0.000
+veFCXM	1.782	0.231
DGF duration	1.013	0.003
Vascular anastomosis time	1.011	0.040

Table 3. ECD = expanded criteria donors. *Serum creatinine > 1,5 mg/dL. PRA = panel reactive antibodies. DSA = donor specific antibody. +veFCXM = positive flow cytometry cross match. DGF = delayed graft function. Statistical analysis by Robust Poisson Regression.

Table 3. Acute rejection according to the Banff classification and presence and type of antibody-induction therapy.

	No Ab induction	Basiliximab	Anti T cell
Patients/Biopsies	(36/43)	(148/156)	(151/157)
Banff classification			
Borderline	10 (23.2%)	47 (30.1%)	33 (21.0%)
IA	4 (9.3%)	36 (23.0%)	8 (5.0%)
IB	2 (4.6%)	2 (1.2%)	0 (0%)
IIA	6 (13.9%)	11 (7.0%)	7 (4.4%)
IIB	0 (0%)	5 (3.2%)	3 (1.9%)
III	1 (2.3%)	2 (1.2%)	0 (0%)
ABMR	0 (0%)	0 (0%)	5 (3.1%)

Table 3. Ab = antibody; AMBR = antibody-mediated acute rejection

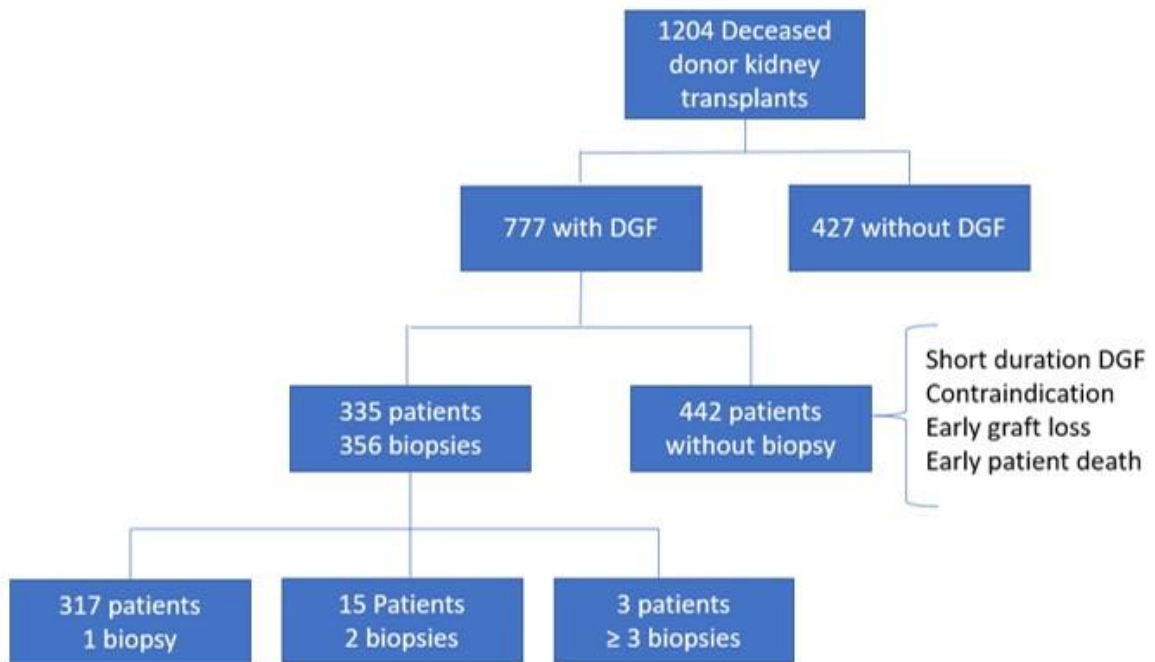
Figure1. Study flow-chart.**Figure 1.** Study flow-chart.

Figure 2. Histologic results of surveillance biopsies.

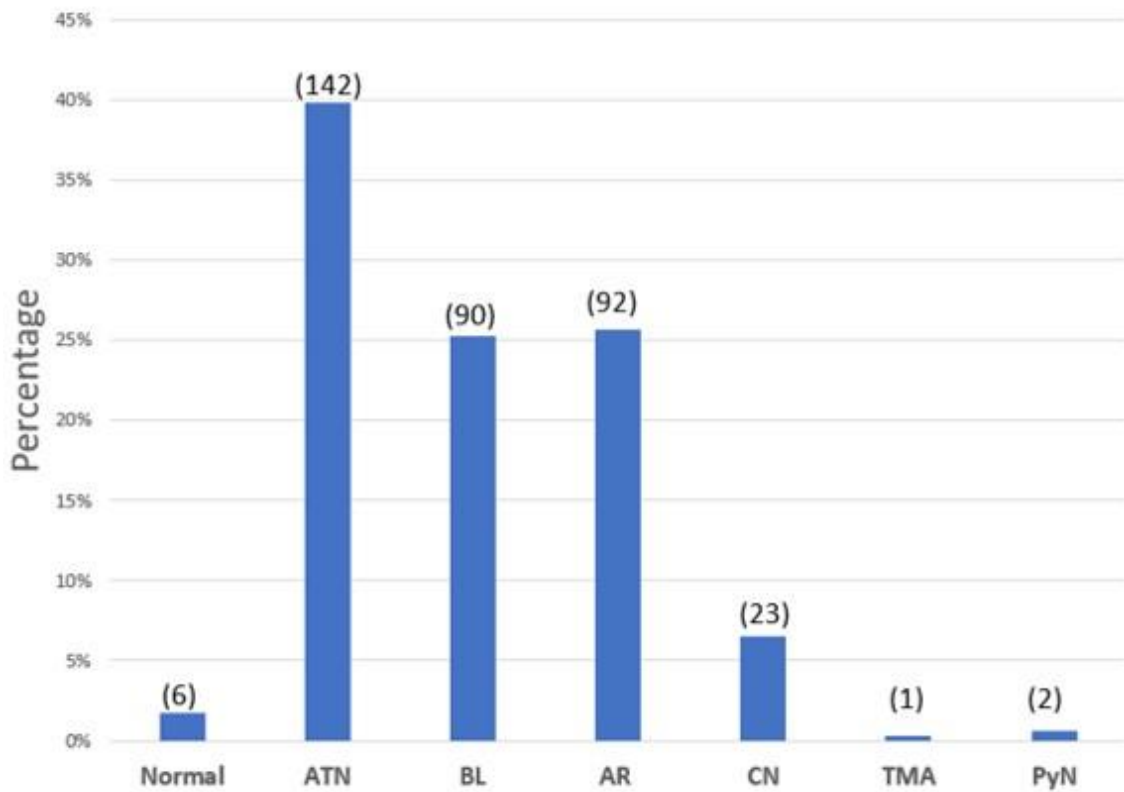


Figure 2. Histologic results of surveillance biopsies. ATN = acute tubular necrosis. BL = borderline rejection. AR = acute rejection. CN = coagulation necrosis. TMA = thrombotic microangiopathy. PyN = pyelonephritis.

Figure 3. Surveillance biopsies with acute rejection accordingly to the Banff classification.

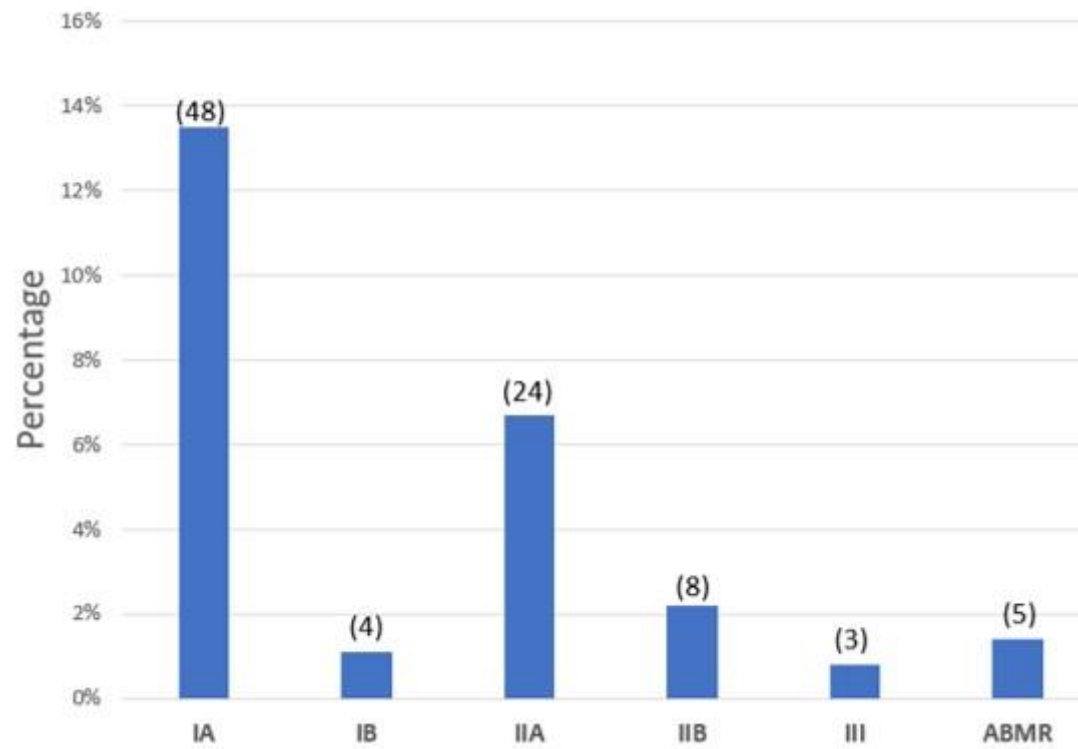


Figure 3. Surveillance biopsies with acute rejection accordingly to the Banff classification. T cell mediated rejection grades IA, IB, IIA, IIB and III. ABMR = antibody-mediated acute rejection.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O transplante renal, como tratamento para doença renal crônica em estágio final permanece, o tratamento com melhores resultados tanto em termos de sobrevida quanto de qualidade de vida quando comparado a outras formas de substituição da função renal.

Na última década, mesmo com o aumento do número absoluto de transplantes renais, a necessidade estimada de órgãos no Brasil permanece maior que duas vezes a quantidade de rins efetivamente transplantados. Houve, nos últimos anos, importante acréscimo no número de transplantes realizados com rins de doadores falecidos, conseqüentemente, aumentando a utilização de rins de doadores com características não ideais, ou seja, doadores de critérios expandidos, que apesar de apresentarem resultados funcionais piores se comparados aos órgãos chamados ideais, ainda assim, prolongam a sobrevida e melhoram a qualidade de vida dos receptores em relação aqueles que permanecem em lista de espera para o transplante.

Essa maior oferta de órgãos de doadores de critérios expandidos promove, aliada a outras variáveis, um aumento na prevalência de disfunção inicial do enxerto (DGF) que, por sua vez, poderia levar ao acréscimo de risco para rejeição aguda, principalmente, conforme identificado nesta coorte, quando ocorre DGF com duração prolongada.

Ainda que a maioria dos resultados histológicos das biópsias de vigilância identificados nesta coorte se devam a lesões relacionadas ao próprio processo de transplante, como a necrose tubular aguda isolada, identificamos também uma parcela importante de pacientes com rejeição aguda ou com alterações *borderline* durante o período de DGF, indicando que a realização de biópsias de vigilância permanece um instrumento essencial para o manejo dos pacientes transplados renais, mesmo sob terapia imunossupressora contemporânea.