

Isabelle Malbouisson Menezes

**Correlação entre os achados histológicos em
biópsia protocolar precoce e seu impacto na função
renal e na sobrevida do enxerto de pacientes
transplantados renais sensibilizados**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Elias David Neto

São Paulo

2024

Isabelle Malbouisson Menezes

**Correlação entre os achados histológicos em
biópsia protocolar precoce e seu impacto na função
renal e na sobrevida do enxerto de pacientes
transplantados renais sensibilizados**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Elias David Neto

**São Paulo
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Menezes, Isabelle Malbouisson
Correlação entre os achados histológicos em biópsia
protocolar precoce e seu impacto na função renal e
na sobrevida do enxerto de pacientes transplantados
renais sensibilizados / Isabelle Malbouisson
Menezes. -- São Paulo, 2024.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientador: Elias David Neto.

Descritores: 1.Rejeição de enxerto
2.Sensibilização HLA 3.Anticorpos 4.Biópsia
5.Histologia 6.Taxa de filtração glomerular
7.Sobrevida do enxerto

USE/FM/DBD-011/24

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esse trabalho à minha irmã, Beatriz Malbouisson Menezes, que é para mim um exemplo de generosidade e perseverança e a quem eu desejo toda luz nos caminhos da Medicina.

AGRADECIMENTOS

Essa tese é fruto de um trabalho disciplinado e de uma vontade educada para propósitos maiores. E como todo bom fruto, jamais poderia nascer sem o auxílio das raízes, tronco, seiva e luz.

Aos meus pais, Maria Amélia Carvalho Malbouisson e Antonio Wilson Ferreira Menezes, minhas raízes, que me passaram valores, princípios e sede pelo conhecimento, que sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida e em quem eu me inspiro diariamente.

À minha família, especialmente a do Evangelho, que, além dos meus pais e minha irmã, conta com meu primo, José Carlos Pitangueira Filho, e minha tia, Genoveva Margarida Malbouisson Pitangueira (*in memoriam*), e que sempre me deu suporte nos momentos difíceis, e celebrou comigo as alegrias que só o amor é capaz de nos dar.

Ao Caio por estar sempre ao meu lado me apoiando nos meus mais diversos projetos de vida e me encorajando a seguir em frente e melhorar sempre.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elias David-Neto, e minha co-orientadora, Dra. Patricia Soares de Souza, que abriram as portas do Serviço de Transplante Renal no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com generosidade e tão bem me guiaram nessa jornada, que é árdua, mas também cheia de aprendizados.

Ao meu professor de Patologia Renal da residência de Nefrologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, Prof. Dr. Luiz Moura, que me mostrou a beleza por trás da histologia das biópsias renais.

A Ítalo Silveira que me ajudou com prontidão e solicitude com a checagem de dados importantes para esse estudo e foi sempre acessível para discutirmos os resultados.

À estatística desse trabalho, Aline Campos, que partilhou comigo dúvidas, soluções e muita torcida para que alcançássemos os resultados aqui apresentados e à Marie Quinto, que me acompanhou na jornada do mestrado e agora vem também fazer parte da reta final do doutorado.

E finalmente a Jesus Cristo, a fonte da luz que ilumina e abençoa nossos dias, que, com toda sua misericórdia, tocou o meu coração e o meu espírito e transformou a minha vida, fazendo com que eu adquirisse um olhar sobrenatural, capaz de enxergar a beleza no que há de mais simples e certamente mais essencial, nosso dia a dia, pois é a cada dia que construímos a nossa história.

*“Como a vida é bela quando se faz
algo bom e sincero!”*

Fiódor Dostoiévski em Os irmãos Karamázov

Lista de abreviaturas

AMR	Rejeição mediada por anticorpos, Antibody-mediated rejection
AMR-CA	Rejeição mediada por anticorpos crônica ativa
BI	biópsia por indicação
BP	biópsia protocolar
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	Citotoxicidade dependente de complemento
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CKD-EPI	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
DSA	<i>donor specific antibody</i>
DGF	<i>delayed graft function</i>
DP	desvio padrão
DTT	ditiotreitol
et al	e colaboradores
ex	exemplo
ENDAT	<i>endothelial-associated transcript</i>
FCXM	<i>Flow cytometry crossmatch</i>
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato, <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
g	glomerulite
HLA	sistema de antígenos leucocitários humanos, <i>Human Leukocyte Antigens</i>
IFTA	fibrose intersticial e atrofia tubular, <i>Interstitial fibrosis and tubular atrophy</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IP	Imunoperoxidase
IMV	Inflamação microvascular
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MPA	Micofenolato (sódico ou mofetil)
N	tamanho amostral
NTA	Necrose Tubular Aguda
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
P	Prednisona
PCR-SSO	<i>Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide</i>
PCR-SSP	<i>Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers</i>
PRA	<i>Panel Reactivity Antibodies</i>
ptc	pericapilarite
RAMA ou AMR ou ABMR	Rejeição aguda/ativa mediada por anticorpos
RMC	Rejeição mediada por células
RNA	ácido ribonucleico
TAC	Tacrolimo
TCMR	Rejeição mediada por células T
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFGe	Taxa de Filtração Glomerular estimada

Lista de símbolos

>	maior que
m	mili
K	quilo
g	grama
U	Unidade
mL	mililitro
°C	grau celsius
μl	microlitro
mM	milimolar
rpm	rotações por minuto
P/C	Relação Proteína/Creatinina Urinária

Lista de siglas

UTR	Serviço de Transplante Renal
HC	Hospital das Clínicas
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Lista de Tabelas

Tabela 1: Caracterização da amostra de pacientes.....	23
Tabela 2: Caracterização dos dados imunológicos da amostra de pacientes.....	25
Tabela 3: Frequência absoluta e percentuais de DSA (<i>pré-formado ou de novo</i>) positivo no período da biópsia por indicação.....	27
Tabela 4: Frequência absoluta e percentuais de complicações na biópsia protocolar.....	30
Tabela 5: Frequências absolutas e percentuais dos principais achados histológicos das biópsias no tempo zero, protocolar e por indicação.....	32
Tabela 6: Frequências absolutas e percentuais de deposição do C4d das biópsias protocolar e por indicação.....	34
Tabela 7: Taxa de Filtração Glomerular (TFG estimada por CKD-EPI) de acordo com achados histológicos nas biópsias protocolar e por indicação.....	35
Tabela 8: Relação proteína/creatinina (P/C) de acordo com achados histológicos nas biópsias protocolar e por indicação.....	37
Tabela 9: Indicadores de função renal (TFG por CKD-EPI e P/C) de acordo com a deposição de C4d nas biópsias protocolar e por indicação.....	39
Tabela 10: Análise univariada de risco dos fatores que impactam a TFG em 1 ano e 3 anos de seguimento.....	43
Tabela 11: Análise univariada de risco dos fatores que impactam a proteinúria em 1 ano e 3 anos de seguimento.....	45
Tabela 12: Análise multivariada de risco dos fatores que impactam a TFG em 1 ano e 3 anos de seguimento.....	46
Tabela 13: Análise multivariada de risco para proteinúria em 1 ano e 3 anos de seguimento.....	47
Tabela 14: Frequência absoluta e percentuais de perda de enxerto na coorte observada...	48
Tabela 15: Frequência absoluta e percentuais de perda de enxerto na coorte observada.....	48
Tabela 16: Sobrevidas do enxerto censurada para óbito estimadas em 1 ano, 3 anos e 5 anos e respectivos intervalos de confiança de 95%.....	50
Tabela 17: Probabilidade estimadas de sobrevida do enxerto em 1 ano, 3 anos e 5 anos e respectivos intervalos de confiança de 95%, de acordo com covariáveis selecionadas...	57
Tabela 18: Frequência absoluta e percentuais de óbitos durante o período de acompanhamento.....	58
Tabela 19: Frequência absoluta e percentuais de causas de óbito na coorte observada.....	58
Tabela 20: Probabilidade de sobrevida dos pacientes em 1 ano, 3 anos e 5 anos e respectivos intervalos de confiança de 95%.....	59
Tabela 21: Sobrevidas dos pacientes transplantados estimadas em 1 ano, 3 anos e 5 anos e respectivos intervalos de confiança de 95%, de acordo com covariáveis selecionadas..	64
Tabela 22: Frequência de rejeição na biópsia por indicação segundo subgrupos, C4d e DSA pré-transplante na biópsia protocolar.	66
Tabela 23: TFGe nos grupos <i>AB activity</i> , ABMR e Controle em 1, 3 e 5 anos de acompanhamento	68

Tabela 24: Comparação pós-hoc da TFGe entre os grupos <i>AB activity</i>, ABMR e Controle em 1, 3 e 5 anos de acompanhamento.....	69
Tabela 25: Variáveis associadas com o declínio da TFGe em 1 ano, 3 anos e 5 anos em uma análise multivariada do subgrupo de pacientes com NTA ou glomerulite e/ou pericapilarite que não fecharam critério para ABMR na biópsia protocolar.....	71
Tabela 26: Probabilidade estimada de sobrevida do enxerto nos grupos <i>AB activity</i>, ABMR e Controle em 1, 3 e 5 anos de acompanhamento.....	72
Tabela 27: Variáveis associadas a risco de perda do enxerto em uma análise multivariada nos subgrupos de interesse e grupo controle.....	73
Tabela 28: Mean Immunofluorescence Intensity (MFI) of pre-transplant DSA in <i>AB activity</i> and ABMR groups.....	74

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Frequência de DSA positivo pré-transplante.....	26
Gráfico 2: Gráfico em boxplot da mediana do MFI imunodominante dos DSA pré-transplante.....	27
Gráfico 3: Frequência de DSA <i>de novo</i> positivo no período da biópsia por indicação	28
Gráfico 4: Tempo médio entre o transplante e a biópsia protocolar.....	29
Gráfico 5: Frequência de complicações na biópsia protocolar.....	30
Gráfico 6.1: Gráfico de barras com frequências absolutas dos principais achados histológicos das biópsias no tempo zero.....	32
Gráfico 6.2: Gráfico de barras com frequências absolutas dos principais achados histológicos das biópsias protocolar.....	33
Gráfico 6.3: Gráfico de barras com frequências absolutas dos principais achados histológicos das biópsias por indicação clínica.....	33
Gráfico 7: Gráfico em boxplots para taxa de Filtração Glomerular (TFG estimada por CKD-EPI) de acordo com o achado histológico de AMR nas biópsias protocolar e por indicação.....	36
Gráfico 8: Gráfico em boxplots para relação proteína/creatinina (P/C) de acordo com o achado histológico de AMR nas biópsias protocolar e por indicação.....	38
Gráfico 9: Gráfico em boxplots para taxa de Filtração Glomerular (TFG estimada por CKD-EPI) de acordo com a deposição de C4d nas biópsias protocolar e por indicação	40
Gráfico 10: Gráfico em boxplots para taxa de filtração Glomerular (TFG estimada por CKD-EPI) em 1 ano de acordo com o achado histológico de AMR nas biópsias protocolar e por indicação e ausência do achado. BP: biópsia protocolar. BI: biópsia por indicação.....	41
Gráfico 11: Distribuição percentual das causas de perda do enxerto.....	49
Gráfico 12: Distribuição percentual das causas de óbito.....	59
Gráfico 13: Box-plot de comparação da TFGe entre os grupos de interesse em 1, 3 e 5 anos de acompanhamento.....	70
Gráfico 14: MFI do DSA pré-transplante dos pacientes dos grupos <i>AB activity</i> e ABMR....	74

Lista de Figuras

Figura 1: Fotos de Microscopia Óptica de inflamação microvascular em biópsia de enxerto renal, gentilmente cedidas pela Dra. Daísa David. A) Glomerulite B) Pericapilarite.....	5
Figura 2: Principais causas da perda tardia do enxerto.....	6
Figura 3: Fluxograma do desenho de seguimento do estudo.....	10
Figura 4: Fluxograma do desenho de seguimento da segunda parte do estudo.....	11
Figura 5: Fluxograma de pacientes incluídos no estudo.....	22
Figura 6: Sobrevida estimada do enxerto dos pacientes em estudo.....	50
Figura 7: Probabilidade estimada de sobrevida do enxerto de acordo com o número de transplantes.....	52
Figura 8: Probabilidade estimada de sobrevida do enxerto de acordo com a realização prévia de transfusão sanguínea.....	52
Figura 9: Probabilidade estimada de sobrevida do enxerto de acordo com o tipo de doador.....	53
Figura 10: Probabilidade estimada de sobrevida do enxerto de acordo com o achado histológico de AMR na biópsia protocolar.....	54
Figura 11: Probabilidade estimada de sobrevida do enxerto de acordo com o achado histológico de g/ptc na biópsia protocolar.....	55
Figura 12: Probabilidade estimada de sobrevida do enxerto de acordo com a presença de DSA pré-transplante positivo.....	56
Figura 13: Probabilidade estimada de sobrevida do enxerto de acordo com a presença de C4d positivo na biópsia protocolar.....	56
Figura 14: Sobrevida estimada dos pacientes do estudo.....	60
Figura 15: Probabilidade estimada de sobrevida do paciente de acordo com o tipo de doador.....	61
Figura 16: Probabilidade estimada de sobrevida do paciente de acordo com o achado histológico de AMR na biópsia protocolar.....	62
Figura 17: Probabilidade estimada de sobrevida do paciente de acordo com a presença de DSA pré-transplante positivo.....	63
Figura 18: Correlação entre a presença de DSA pré-transplante e a intensidade de perda da TFGe em pacientes que não fecham critério para ABMR na biópsia protocolar.....	67
Figura 19: Curvas de sobrevida estimada do enxerto nos grupos <i>AB activity</i> , ABMR e Controle.....	72

RESUMO

Menezes IM. Correlação entre os achados histológicos em biópsia protocolar precoce e seu impacto na função renal e na sobrevida do enxerto de pacientes transplantados renais sensibilizados [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

O reconhecimento da associação entre anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA, de *donor specific antibody*) e o risco aumentado de rejeição e perda do enxerto é de longa data. Pacientes previamente sensibilizados apresentam maior risco de rejeição mediada por anticorpos no pós-transplante. Pouco se sabe sobre a correlação entre os achados histológicos de biópsia precoce do enxerto renal e desfechos relacionados à função renal e à sobrevida desse enxerto. Dessa forma, não apenas a monitorização imunológica da presença de DSA, mas também o seguimento histológico, através de biópsia protocolar, podem contribuir para o diagnóstico precoce desse tipo de rejeição e avaliação prognóstica do transplante. Esse é um estudo retrospectivo, observacional de análise de uma coorte de 324 pacientes sensibilizados com transplante renal isolado de doador vivo ou falecido submetidos à biópsia protocolar nos primeiros 7 a 10 dias de transplante. O objetivo primário do estudo é correlacionar achados histológicos da biópsia protocolar e a presença de DSA pré-transplante com a evolução da função renal e a sobrevida do enxerto em até 5 anos de seguimento clínico.

Palavras-chave: Rejeição de enxerto. Sensibilização HLA. Anticorpos. Biópsia. Histologia. Taxa de filtração glomerular. Sobrevida do enxerto.

ABSTRACT

Menezes IM. Correlation between histological findings in early protocol biopsy and the impact on renal function and graft survival in sensitized kidney transplanted patients [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2024.

The association between the presence of donor specific antibodies (DSA) and the increased risk of antibody-mediated rejection and graft loss is well known in the field of kidney transplant. Although previously sensitized patients have a higher risk of antibody-mediated rejection, little is known about the correlation between histological findings in early performed renal graft biopsies and transplant outcomes related to renal function and graft survival. Therefore, not only is the immunological surveillance pre- and post-transplant important, but the histological follow-up through protocol biopsy may also contribute to the early diagnosis of rejection and to the prognosis evaluation of the kidney transplant. This is a retrospective, observational, cohort study, which included 324 sensitized isolated kidney transplant patients, with deceased or live donor, who underwent a protocol biopsy between 7 to 10 days after the transplant surgery. The primary objective of this study is to correlate the histological findings of the early protocol biopsy and the presence of DSA pre-transplant with the evolution of the renal graft function and graft survival up to 5 years of follow-up.

Keywords: Graft rejection. Graft vs host reaction. Antibodies. Biopsy. Histology. Glomerular filtration rate. Graft survival.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Lista de figuras	
Resumo	
<i>Summary</i>	
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	08
3. MÉTODOS	09
3.1. Casuística.....	09
3.2. Desenho do estudo.....	10
3.3. Critérios de inclusão e exclusão.....	11
3.3.1. Critérios de inclusão.....	11
3.3.2. Critérios de exclusão.....	12
3.4. Rotina de acompanhamento clínico do serviço.....	12
3.4.1. Imunossupressão de indução e de manutenção.....	12
3.4.2. Seguimento clínico.....	12
3.4.3. Diagnóstico das rejeições.....	13
3.4.4. Tratamento das rejeições.....	13
3.4.5. Profilaxias.....	14
3.4.6. Avaliação da função renal.....	14
3.4.7. Testes imunológicos.....	15
3.4.7.1. Obtenção de soro do receptor e células do doador.....	15
3.4.7.2. Tipificação HLA.....	15
3.4.7.3. Prova-cruzada.....	16
3.4.7.4. Reatividade contra painel (PRA) e avaliação de anticorpos anti- HLA doador-específicos.....	18
3.4.8. Biópsia do enxerto renal no receptor.....	19
3.5. Análise estatística.....	20
3.6. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	21
4. Resultados	22
4.1. Pacientes incluídos.....	22
4.2. Dados clínicos.....	24
4.2.1. Perfil imunológico pré e pós-transplante.....	24
4.2.1.1. Reatividade contra painel no pré-transplante renal.....	24
4.2.1.2. Reatividade contra painel no pós-transplante renal.....	24
4.3. Achados histológicos.....	29
4.3.1. Tempo médio entre o transplante e a biópsia protocolar e complicações das biópsias protocolares.....	29
4.3.2. Histologia das biópsias protocolares das biópsias de enxerto renal de tempo zero e das biópsias protocolares (7-10 dias após o transplante).....	31
4.3.3. Histologia das biópsias de enxerto renal por indicação.....	31
4.4. Estudo imunopatológico.....	34
4.5. Função renal.....	35
4.5.1. Associação entre taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) e histologia nas biópsias protocolar e por indicação.....	35
4.5.2. Associação entre proteinúria e histologia nas biópsias protocolar e por indicação.....	37

4.5.3. Associação entre a deposição de C4d nas biópsias protocolar e por indicação e indicadores de função renal.....	39
4.5.4. Comparação da TFGe entre pacientes com AMR na biópsia protocolar, na biópsia por indicação ou sem AMR.....	41
4.6. Análises de risco.....	42
4.6.1. Fatores de risco implicados na redução da TFGe.....	42
4.6.1.1 Análise univariada.....	42
4.6.1.2 Análise multivariada.....	46
4.7. Evolução.....	48
4.7.1. Análises da frequência e das causas de perda do enxerto.....	48
4.7.2. Análises de sobrevida do enxerto em 1, 3 e 5 anos de acompanhamento.....	49
4.7.3. Análises de fatores associados à probabilidade de menor sobrevida do enxerto.....	51
4.7.3.1. Dados clínicos.....	51
4.7.3.2. Dados histológicos.....	54
4.7.3.3. Dados imunológicos e imunopatológicos.....	55
4.7.4. Análises das frequências e causas de óbito na coorte.....	57
4.7.5. Análises de sobrevida do paciente em 1, 3 e 5 anos de acompanhamento.....	59
4.7.6. Análises de fatores associados à probabilidade de menor sobrevida do paciente.....	60
4.7.6.1. Dados clínicos.....	60
4.7.6.2. Dados histológicos.....	61
4.7.6.3. Dados imunológicos.....	62
5. DISCUSSÃO.....	75
6. CONCLUSÕES.....	90
7. REFERÊNCIAS.....	92
8. APÊNDICE	

1. INTRODUÇÃO

O transplante renal constitui o tratamento de escolha para a maioria dos pacientes com doença renal crônica em estágio final. Já foi demonstrado que o transplante renal oferece melhora tanto na sobrevida, como na qualidade de vida desses pacientes, quando comparado aos métodos dialíticos¹. Apesar dos avanços consideráveis na terapia imunossupressora do transplante renal, a resposta alo-imune ainda constitui um importante fator determinante para a perda tardia do enxerto²⁻⁴. Atualmente, as taxas de rejeições agudas já foram reduzidas para menos de 15% e a sobrevida do enxerto renal no primeiro ano de transplante ultrapassa 90%, porém a taxa de perda tardia do enxerto e conseqüentemente a sua sobrevida a longo-prazo permanecem inalteradas^{2,5,6}.

O reconhecimento da associação entre anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA, de *donor specific antibody*) e o risco aumentado de rejeição e perda do enxerto é de longa data. Há cerca de 40 anos foi demonstrada a associação entre a presença de anticorpos anti-HLA isotipo IgG pré-formados e direcionados contra antígenos HLA do doador e a ocorrência de rejeição hiperaguda e conseqüentemente a perda do enxerto⁷. Com o objetivo de evitar esse tipo de rejeição, Patel e Terasaki desenvolveram a técnica da prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e a realização da mesma no pré-transplante levou à redução da incidência desse tipo de rejeição. O fato desses anticorpos anti-HLA serem linfocitotóxicos definiu seu papel chave na patogênese da rejeição mediada por anticorpos e falência do enxerto renal⁷⁻⁹. No entanto, alguns DSA pré-transplante só são detectados por técnicas mais sensíveis, ademais a rejeição mediada por anticorpos também pode ocorrer em pacientes que desenvolvem tais anticorpos *de novo* no pós-transplante¹⁰.

Nos últimos anos houve o desenvolvimento de novas tecnologias e métodos mais sensíveis e específicos para acessar a especificidade dos anticorpos anti-HLA do doador. A introdução dos sofisticados ensaios de fase

sólida, que utilizam moléculas HLA purificadas aderidas a microesferas, aumentou a sensibilidade na identificação e caracterização dos anticorpos anti-HLA de classe I e classe II. Ao mesmo tempo, houve avanços na classificação histológica de biópsias de enxertos renais, especialmente no que concerne à possibilidade de evidenciar a ativação imunopatológica, através da marcação do C4d, confirmando o processo de ativação imune pela via clássica da cascata de complemento associado à rejeição mediada por anticorpos pré-formados ou *de novo*¹¹⁻¹³. Tanto a avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-HLA quanto a imuno-histológica são necessárias para o diagnóstico dos processos imunológicos que acometem o enxerto renal¹².

Apesar da detecção e monitoração dos anticorpos anti-HLA contra o doador nos períodos pré e pós-transplante serem amplamente usadas na prática clínica do transplante para estratificar o risco de rejeição e perda do enxerto, sabe-se também que nem todo DSA é deletério ao enxerto renal^{14,15}. Já se tem conhecimento que tais anticorpos podem causar um largo espectro de efeitos histológicos no enxerto, desde ausência de lesão renal à manifestação clara de rejeição mediada por anticorpo^{16,17}.

Uma das formas de se estratificar o risco de rejeição mediada por anticorpos relacionado à presença de DSA circulante é através da intensidade média de fluorescência (MFI de *Mean Fluorescence Intensity*) dos anticorpos anti-HLA específicos contra o doador, onde quanto maior o MFI, maior o risco de rejeição mediada por anticorpos no futuro¹⁸. Entretanto, nem sempre o MFI elevado levará necessariamente à lesão renal, pois para causar injúria no enxerto, o anticorpo precisa ter a capacidade de ativar a cascata de complemento^{18,19}.

A ativação da via clássica da cascata do complemento leva a um fenótipo histológico de lesão do enxerto caracterizado por inflamação da microvasculatura e deposição da fração C4d do complemento nos capilares peritubulares^{18,20}. Vale ressaltar que, apesar de específico, o C4d é pouco

sensível como indicador de rejeição mediada por anticorpos, uma vez que já se tem conhecimento de episódios desse tipo de rejeição nos quais o C4d é negativo. Portanto, a capacidade de ligação ao complemento não leva inevitavelmente à deposição de C4d^{21,22}.

Em relação às alterações histológicas no transplante renal, a Classificação de Banff é universalmente aceita como padronização da descrição dos achados morfológicos em biópsia do enxerto renal para o diagnóstico das rejeições agudas e crônicas²³. Para o diagnóstico de rejeição aguda/ativa mediada por anticorpos três critérios precisam ser preenchidos.

O primeiro é a evidência histológica de lesão tecidual aguda, incluindo um ou mais dos seguintes:

a) inflamação microvascular ($g > 0$ e/ou $ptc > 0$), na ausência de glomerulonefrite recorrente ou *de novo*. Entretanto na presença de rejeição mediada por células, de infiltrado inflamatório limítrofe, de infecção, $ptc \geq 1$ isoladamente não é suficiente e alterações glomerulares ($g > 0$) são necessárias; pode-se visualizar um exemplo de inflamação microvascular na figura 1.

b) arterite intimal ou transmural ($v > 0$);

c) microangiopatia trombótica aguda, na ausência de qualquer outra causa;

d) lesão tubular aguda, na ausência de qualquer outra causa aparente.

O segundo critério é a evidência de interação atual ou recente do anticorpo com o endotélio vascular, incluindo um ou mais dos seguintes:

a) deposição linear de C4d nos capilares peritubulares (C4d 2 ou C4d 3 através de imunofluorescência de cortes congelados ou C4d > 0 através de imunoperoxidase em cortes de parafina,

b) pelo menos inflamação microvascular moderada ($g + ptc \geq 2$), na ausência de glomerulonefrite recorrente ou *de novo*. Entretanto, na presença de rejeição mediada por células, de infiltrado limítrofe, ou de infecção, $ptc \geq 1$

isoladamente não é suficiente e alterações glomerulares ($g > 0$) são necessárias;

c) expressão aumentada de transcritos gênicos no tecido da biópsia que sejam fortemente associados à rejeição mediada por anticorpos, se completamente validados.

O terceiro critério a ser preenchido é a evidência sorológica de anticorpos doador-específicos (DSA contra antígenos HLA ou não-HLA). A deposição de C4d ou a expressão de transcritos gênicos classificadores validados podem substituir a detecção do DSA, no entanto, recomenda-se fortemente a pesquisa completa para DSA, incluindo testes para anticorpos contra antígenos não-HLA nos casos em que o teste para anticorpos contra antígenos HLA for negativa, sempre que os critérios 1 e 2 forem preenchidos²³.

A Classificação de Banff foi revisada em 2019 e, no que concerne ao diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos, esforços foram realizados para se caracterizar o grau de atividade e cronicidade dos casos de rejeição crônica ativa mediada por anticorpos (ABMR-CA). Tanto a atividade, quanto a cronicidade da lesão poderia ser classificada em leve, moderada e grave, porém havendo subjetividade por ser observador-dependente, e, portanto, os critérios diagnósticos para ABMR da classificação de 2017 continuam válidos²⁴.

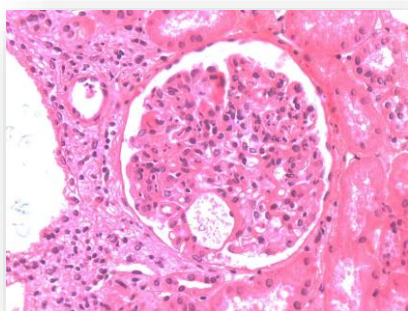
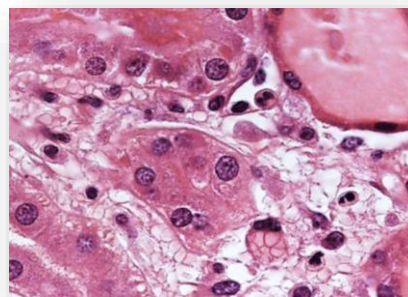
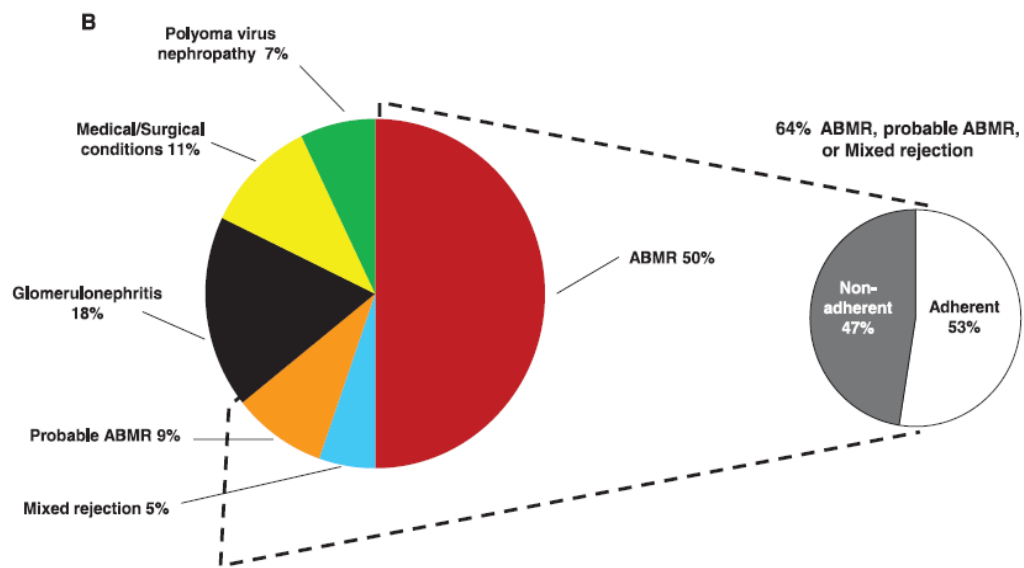
**A. Glomerulite****B. Pericapilarite**

Figura 1: Fotos de Microscopia Óptica de inflamação microvascular em biópsia de enxerto renal, gentilmente cedidas pela Dra. Daísa David. A) Glomerulite B) Pericapilarite

Como mencionado, apesar dos consideráveis avanços da terapia imunossupressora sobre os desfechos de curto prazo, a resposta alo-imune gerada pela rejeição aguda pode perpetuar levando à rejeição crônica mediada por anticorpos, a qual constitui importante fator determinante para a perda tardia do enxerto¹⁻⁴. Pacientes previamente sensibilizados e que mantêm DSA positivo no pós-transplante, seja por DSA preexistente, seja por DSA formado *de novo*, estão sob maior risco de desenvolverem rejeição mediada por anticorpos no curso do transplante renal^{9,10,17}. Dessa forma, um dos objetivos mais importantes do transplante renal é evitar a ocorrência desse tipo de rejeição, visto que é reconhecidamente uma das principais causas da perda tardia do enxerto²⁻⁴, como mostra a figura 2.



Fonte: Sellàres J. et al, Am J Transplant. 2012 Feb;12(2):388-99

Figura 2: Principais causas da perda tardia do enxerto

Mesmo tendo conhecimento de extensa literatura que comprova a associação entre características do doador e do procedimento de transplante com a função tardia, disfunção e falência do enxerto²⁵⁻³², pouco se sabe sobre o valor preditivo da apresentação histológica do enxerto renal em biópsias de vigilância realizadas precocemente no pós-transplante^{33,34}.

No estudo realizado em nosso centro, que acompanhou pacientes transplantados renais previamente sensibilizados por 2 anos, observou-se que os achados histológicos da biópsia protocolar, realizada na primeira semana de pós-transplante, foi capaz de diagnosticar precocemente casos de rejeição aguda mediada por anticorpos³⁴. Sendo ainda necessário comprovar o benefício da biópsia protocolar precoce em uma coorte maior de pacientes sensibilizados.

Racional para a realização do estudo

Pacientes sensibilizados apresentam maior risco de rejeição aguda mediada por anticorpos no pós-transplante. A monitorização da presença de DSA e a realização de biópsia protocolar contribuem para o diagnóstico precoce desse tipo de rejeição e o seu tratamento em tempo hábil pode consequentemente impactar na melhora da sobrevida do enxerto. Uma das abordagens possíveis seria a realização de biópsia de vigilância precocemente, já nos primeiros 7 a 10 dias de pós-transplante, o que já vem sendo realizado em alguns serviços.

Hipótese

Levando em consideração que pacientes sensibilizados têm maior risco de rejeição e que a presença de anticorpos anti-HLA doador-específicos tem papel central na patogênese da rejeição mediada por anticorpos, levantamos como hipótese que a realização de biópsia protocolar nos primeiros 7-10 dias do pós-transplante, além da monitorização do DSA, é capaz de diagnosticar precocemente a rejeição e que seu tratamento precoce impactaria positivamente na função renal de longo-prazo após o transplante de pacientes sensibilizados.

2. OBJETIVOS

2.1. Desfecho primário

Correlacionar os achados histológicos em biópsia protocolar precoce de enxerto renal com a função renal de longo-prazo em pacientes sensibilizados.

2.2. Desfechos secundários

1. Comparar a função renal e proteinúria entre os pacientes com diagnóstico de ABMR na biópsia protocolar versus aqueles com diagnóstico de ABMR na biópsia por indicação a longo-prazo;

2. Correlacionar os achados histológicos que não fecham critério para ABMR na biópsia protocolar com a função renal do enxerto em 5 anos de acompanhamento;

3. Correlacionar os achados histológicos que não fecham critério para ABMR na biópsia protocolar com a sobrevida do enxerto em 5 anos de acompanhamento;

4. Determinar os fatores de risco clínicos e histológicos implicados na perda de função renal e na menor sobrevida do enxerto;

5. Determinar os fatores de risco clínicos e histológicos implicados na menor sobrevida do paciente.

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

Esse é um estudo retrospectivo, observacional de análise de uma coorte de pacientes sensibilizados anti-HLA e que receberam transplante renal isolado de doador vivo ou falecido. Os pacientes foram submetidos ao transplante no Serviço de Transplante Renal no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (UTR HC-FMUSP) entre 2010 e 2017. Os dados clínicos foram extraídos do prontuário eletrônico, dados de biópsias do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas e dados imunológicos do Laboratório de Imunologia do Transplante do Instituto do Coração. O seguimento foi de no mínimo 12 meses de transplante a máximo de 5 anos, ou até a perda do enxerto, ou até o óbito do receptor.

Todos os pacientes receberam rim de doador com tipagem sanguínea ABO compatível e foram transplantados com prova-cruzada por citotoxicidade dependente de complemento T e B negativas no momento da alocação para transplantes com doador falecido. Nestes casos, a prova cruzada por citometria de fluxo foi realizada retrospectivamente, após o transplante, utilizando-se soro do receptor do dia do transplante, bem como células do doador os quais estavam armazenados no laboratório de Imunologia de Transplantes do InCor.

Em caso transplante de doador vivo, todos os receptores apresentaram prova-cruzada por citometria de fluxo negativa para linfócitos T e B antes da internação para o transplante.

3.2. Desenho do estudo

Todos os pacientes incluídos no estudo eram sensibilizados com PRA diferente de zero. Os pacientes foram submetidos à biópsia protocolar precoce ao final dos primeiros 7-10 dias de pós-transplante, além disto, alguns pacientes foram adicionalmente submetidos à (outra) biópsia por indicação clínica sempre que o médico assistente suspeitasse de rejeição, a saber: elevação de 30% da creatinina basal e/ou proteinúria (relação P/C >0.3). Concomitantemente à biópsia renal, coletava-se soro para pesquisa de DSA, conforme rotina do serviço.

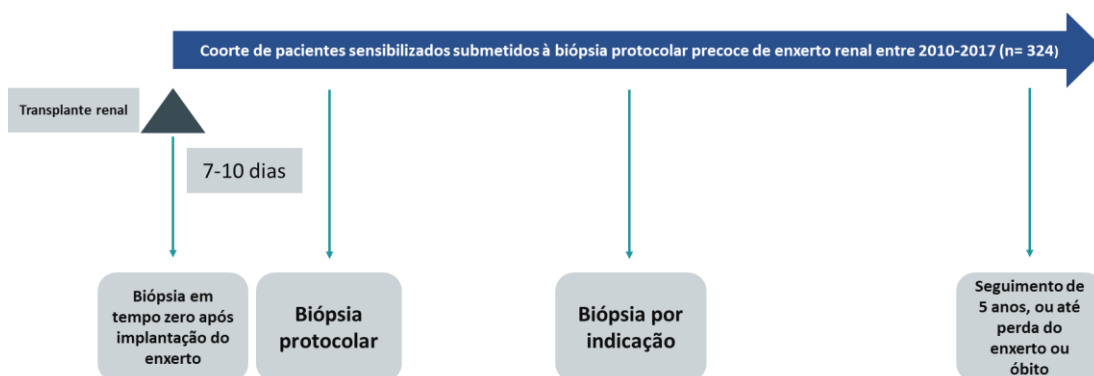


Figura 3: Fluxograma do desenho de seguimento da primeira parte do estudo

Na segunda parte do estudo, foi realizada uma comparação entre três grupos de pacientes: a) o grupo *Antibody Activity* (AB activity) era composto pelos pacientes que apresentavam NTA ou inflamação microvascular (glomerulite e/ou pericapilarite) na biópsia protocolar e com DSA pré-transplante ou C4d positivo, ou seja, não fechavam os três critérios necessários para diagnóstico de ABMR na biópsia precoce, mas que ainda evoluíram com rejeição na biópsia por indicação; b) o grupo ABMR era composto pelos pacientes que

fechavam critério para esse diagnóstico já na biópsia protocolar e; c) o grupo controle que incluiu os pacientes com biópsia protocolar com histologia normal ou NTA ou glomerulite e/ou pericapilarite e DSA pré-transplante e C4d negativos e que evoluíram sem rejeição na biópsia por indicação. O desenho da segunda parte do estudo pode ser visto na figura 4.

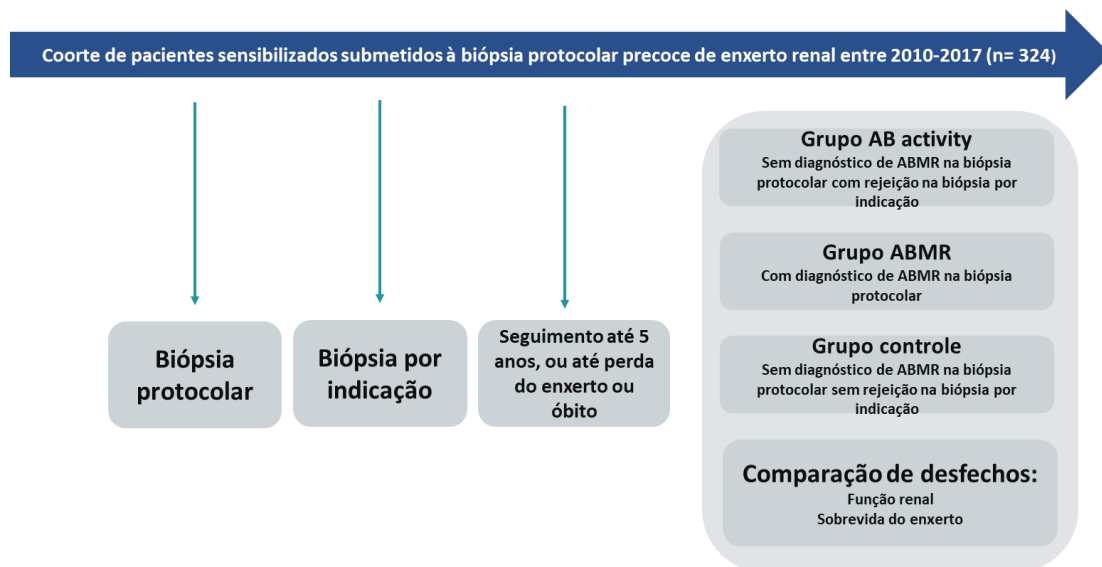


Figura 4: Fluxograma do desenho de seguimento da segunda parte do estudo

3.3. Critérios de inclusão e exclusão

3.3.1. Critérios de inclusão

1. Pacientes com idade igual ou acima de 18 anos.
2. Pacientes submetidos a transplante de rim isolado com doador vivo ou falecido.
3. Pacientes com painel (PRA) diferente de zero (sensibilizados).

3.3.2 Critérios de exclusão

1. Pacientes submetidos a transplante de outros órgãos que não o rim.

3.4. Rotina de acompanhamento clínico

3.4.1 Imunossupressão de indução e de manutenção

Todos os pacientes receberam terapia de indução com Metilprednisolona 500mg via endovenosa em dose única e/ou anticorpo antilinfocitário Timoglobulina na dose de 6mg/Kg fracionada por 4 a 6 dias conforme contagem do número de linfócitos totais. Alguns pacientes com DSA pré-transplante receberam 2 doses de Imunoglobulina Humana a 5% 1g/Kg via endovenosa num intervalo de 48 horas entre elas.

A imunossupressão de manutenção utilizada foi definida de acordo com as indicações habituais do grupo, levando-se em consideração as características clínicas e imunológicas dos pacientes na avaliação pré-transplante. Na maioria dos casos, os pacientes receberam Tacrolimo na dose de 0.2mg/Kg/dia, Micofenolato Mofetil 2000mg/dia ou Micofenolato de Sódio 1440mg/dia e ainda prednisona na dose de 0,5mg/Kg com diminuição progressiva da dose até atingir a dose de 5mg/dia ao final do 2º mês pós-transplante.

3.4.2. Seguimento clínico

O seguimento clínico hospitalar e ambulatorial foi realizado conforme a rotina do serviço. A biópsia de tempo zero foi realizada 1 hora após o desclameamento dos vasos renais durante a cirurgia de implante do enxerto. Os pacientes foram submetidos à biópsia protocolar ao final dos primeiros 7-10 dias de pós-transplante, além disto, o médico assistente do paciente

solicitava biópsias por indicação sempre que o paciente apresentasse sinais clínicos e/ou laboratoriais que sugerissem rejeição, a saber: elevação de 30% da creatinina basal ou proteinúria (P/C) maior que 0,3. Foi feita pesquisa de DSA sempre que realizada biópsia do enxerto renal por indicação clínica.

3.4.3. Diagnóstico das rejeições

Todas as rejeições foram confirmadas por biópsias e classificadas conforme os Critérios de Banff vigentes no momento de sua realização. Além da coloração por microscopia óptica, todos os espécimes de biópsias foram submetidos à marcação imunohistoquímica por C4d, preferencialmente por imunofluorescência.

Pacientes com distúrbios de coagulação ou em uso de anticoagulantes não foram submetidos à biópsia renal enquanto o quadro clínico não fosse seguro para realização da mesma.

3.4.4. Tratamento das rejeições

Rejeições mediadas por células e classificadas como Banff limítrofe ou Banff IA foram tratadas com pulso endovenoso de Metilprednisolona 500mg/dia durante 3 dias consecutivos. Rejeições mediadas por células Banff IB, Banff IIA, Banff IIB e Banff III foram tratadas com Timoglobulina na dose total de 6mg/kg com infusão fracionada em 4 a 6 dias a depender da contagem geral de linfócitos que deveriam estar acima de 150 células/mm³.

Rejeições mediadas por anticorpos (ABMR) foram tratadas com plasmaferese (4 a 6 sessões), seguida de imunoglobulina humana 5% na dose de 2g/kg (fracionada na dose de 1g/Kg com intervalo de 48 horas entre elas) e posteriormente, rituximabe 375mg/m² de superfície corpórea.

Em caso de rejeições mistas, os pacientes receberam pulso de Metilprednisolona e/ou Timoglobulina, bem como plasmaferese, imunoglobulina humana e Rituximabe, nas mesmas doses acima descritas.

3.4.5. Profilaxias

A infecção por citomegalovírus (CMV) pode ocorrer em pacientes transplantados por reativação de infecção prévia ou por infecção primária. O *status* sorológico é considerado o mais importante preditor de doença por CMV após o transplante. Desse modo, receptores CMV-soronegativos antes do transplante e que recebe um transplante renal de doador CMV-soropositivo (R-/D+) apresentam maior risco de desenvolver a doença. Todos os pacientes nesta condição e todos aqueles induzidos com Timoglobulina receberam profilaxia para CMV com Ganciclovir e mais recentemente profilaxia com Valganciclovir, em ambos os casos com dose corrigida pela função renal, por 3 meses.

A Ivermectina 6mg, com dose ajustada pelo peso, é usada antes das doses de Metilprednisolona seja na terapia de indução ou para o tratamento de rejeição.

É realizada profilaxia para infecção do trato urinário com Amicacina 100mg via endovenosa na indução anestésica. Todos os pacientes recebem profilaxia para pneumocistose com Sulfametoxazol-Trimetropina 400/80mg 1 comprimido à noite por 3 meses; a partir do ano de 2015, seu uso passou a ser contínuo e por tempo indeterminado.

3.4.6. Avaliação de função renal

A Taxa de Filtração Glomerular foi estimada (TFGe) pela fórmula de CKD-EPI (mL/min/1,73m² de superfície corpórea). E a proteinúria foi aferida através da relação Proteína/Creatina (P/C) em amostra isolada de urina. Ambos os parâmetros foram avaliados ao final do primeiro e do terceiro ano de transplante.

3.4.7. Testes imunológicos

3.4.7.1. Obtenção de soro do receptor e células do doador

Os soros dos receptores foram coletados para realização do teste de painel e para pesquisa de anticorpos anti-HLA doador-específicos. Todos os pacientes foram submetidos a coleta de 15 ml de sangue periférico em tubo seco e sem anticoagulante no momento da internação para o transplante, bem como na ocasião da realização das biópsias renais. Os soros foram armazenados em refrigeradores a -40°C até o momento da realização dos testes.

Para obter células mononucleares do doador vivo, foram coletados 50 ml de sangue periférico com heparina (50 U/mL). No caso de doador falecido, as células foram obtidas de fragmentos de linfonodo e/ou de baço do doador. Em ambos os casos, as células mononucleares passaram por processo de centrifugação e, por fim, separadas em linfócitos T e B, seguida de contagem para se obter a concentração de 15 a 20x10⁶ células/mL para, então, proceder à realização das provas-cruzadas. As células não utilizadas foram distribuídas em tubos de criopreservação e refrigeradas a -80°C para uso posterior caso necessário.

3.4.7.2. Tipificação HLA

A tipificação HLA foi realizada após extração de DNA contido nos linfócitos do sangue periférico do doador vivo ou de linfonodos/baço do doador falecido. A técnica empregada na tipificação foi o PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers*) e o PCR-SSO (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide*).

Todos os doadores e receptores foram tipificados para os *loci* HLA-A, -B e -DR. Alguns pacientes também tiveram tipificação HLA-Cw e -DQ, mas

isso não foi possível em todos, visto que esses testes não eram rotina no país na ocasião da realização dos transplantes dos pacientes incluídos neste estudo.

3.4.7.3. Prova-cruzada

a. Teste de Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC)

Todos os pacientes foram alocados para o transplante baseado no resultado da prova-cruzada por CDC.

Foi incubado 1 µl de soro com 1 µl de suspensão celular (linfócitos T ou B do doador) em placa de Terasaki (One Lambda, Canoga Park, CA, USA) durante 30 minutos à temperatura ambiente; neste período há formação de imunocomplexos. Em seguida, foram adicionados 5 µl de complemento de coelho (One Lambda, Canoga Park, CA, USA), deixando-se incubar por 90 minutos. A reação foi evidenciada pela adição de 10 µL de Stain-Fix (One Lambda, Canoga Park, CA, USA) e após 20 minutos o resultado pôde ser avaliado em microscópio de contraste de fase e a reação é lida como negativa (linfócitos vivos) ou positiva (linfócitos mortos), quando há mais do que 10% de lise celular.

Para caracterizar o isotipo do anticorpo, foi utilizado o agente redutor ditioneitol (DTT) o qual destrói as pontes de dissulfeto da molécula IgM dos anticorpos. Sua inativação não interfere com a reatividade dos anticorpos IgG, mantendo-os funcionantes de modo a detectar sua atividade em provas-cruzadas. O DTT é utilizado na proporção de 1 parte de DTT 50mM para 9 partes de soro a ser testado em tubo Fisher. Em seguida, procede-se a incubação durante 30 minutos a 37°C, sob agitação a cada 5 minutos. Para aumentar a sensibilidade do teste, foi utilizado o anticorpo a antiglobulina humana, o AGH (One Lambda, Canoga Park, CA, USA), em uma placa

contendo linfócitos T. A incubação das células deve variar de acordo com a subpopulação celular utilizada para prova cruzada contra linfócitos T.

b. Prova cruzada por citometria de fluxo

Em um tubo, foram dispensados 100 µL de suspensão celular contendo $0,5 \times 10^6$ células (linfócitos totais do doador) por tubo para incubação. Após os processos de centrifugação, ressuspensão e lavagem, as células foram dispostas em tubos para incubação com 25 µL de soro controle-negativo, outro tubo com 25 µL de soro controle-positivo e outro tubo com 25 µL soro teste (soro do receptor). Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, procede-se novamente à lavagem com FCS, centrifugação e ressuspensão das células. Após, e para identificar anticorpos do isotipo IgG, as células foram incubadas com 25 µl de anticorpo anti-IgG humano FITC (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) na diluição de 1:50 a 4°C durante 30 minutos. Após novo processo de lavagem, a suspensão celular foi incubada com 25µl de anticorpo anti-CD3 marcado com Cychrome (Pharmigen, San Diego, CA, USA) e 25 µl de anticorpo anti-CD19 PE (Pharmigen, San Diego, CA, USA) a 4°C durante 30 minutos. Estes anticorpos secundários, marcam respectivamente as reações antígenos-anticorpos que ocorreram nas superfícies de linfócitos T (CD3) e linfócitos B (CD19), respectivamente. Por fim, as células foram ressuspensas em 400 µl de tampão de lavagem.

A leitura das reações e análise do teste foi realizada em FACS-Calibu®r (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e o resultado expresso em mediana de intensidade e de fluorescência. O teste foi positivo quanto a mediana de intensidade de fluorescência foi superior a 60 canais para linfócito T e superior a 80 canais para linfócitos B.

3.4.7.4. Reatividade contra painel (PRA) e avaliação de anticorpos anti-HLA doador-específicos

Os testes da Plataforma Luminex (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA) baseiam-se na utilização de microesferas marcadas e com antígenos HLA purificados de Classe I e Classe II aderidos em sua superfície. Existem 3 tipos de teste. O teste Mixed detecta simultaneamente a presença de anticorpos anti-HLA de classe I e/ou classe II presentes no soro teste. Trata-se de um teste qualitativo, com resultado positivo ou negativo para a presença de anticorpo circulante. O teste de Flow-PRA detecta a percentagem e a especificidade dos anticorpos anti-HLA circulantes presente em cada amostra de soro analisado. Por fim, o teste de *Single Antigen Beads*, que é muito mais sensível que os outros testes, podendo-se definir com maior acurácia a especificidade do anticorpo circulante. O resultado é expresso em Mediana de Intensidade de Fluorescência (do inglês, *Median Fluorescence Intensity*, MFI) do anticorpo detectado na circulação.

O teste de Flow-PRA foi utilizado pelo Laboratório de Imunologia dos Transplantes do InCor de 2010 a 2015, após este período, padronizou-se o uso do teste Mixed como *screening*, seguido do teste *Single* para definir as especificidades e o MFI do anticorpo anti-HLA nos casos em que há anticorpo circulante. Nos últimos anos, graças ao teste *Single*, pode-se fazer a avaliação do grau de sensibilização pré-transplante utilizando-se o painel calculado (PRAc).

Para realização do teste são incubados 2.5µL de microesferas com 10 µL de soro-teste em cada poço, durante 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e sob homogeneização constante. Para cada teste, utiliza-se um soro controle negativo e outro soro controle positivo. Todos os dados são normalizados para cada esfera, conforme o resultado do teste de controle negativo. Após a incubação, são adicionados 150 µL de tampão de lavagem previamente diluído. A placa é selada e submetida à homogeneização, seguida de centrifugação a 1.300 rpm durante 5 minutos. Depois o tampão de

lavagem é removido com movimento súbito. Repete-se a lavagem por mais 2 vezes.

São diluídos anticorpo IgG caprino anti-humano conjugado PE em tampão de lavagem na diluição de 1:100 (0.5µL de anticorpo IgG anti-caprino com 49.5 µL de tampão de lavagem para cada poço). Adicionam-se 50 µL dessa solução por poço e inicia-se incubação por 30 minutos. Após a lavagem, adicionam-se 70µL de PBS. O conteúdo da placa é então transferido para placa de aquisição com fundo em U e inicia-se a leitura do teste.

A leitura do teste é realizada em aparelho LABScan™ (Luminex Corporation, Austin, Texas, EUA) e a positividade é avaliada pela Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI), unidade que expressa a intensidade da ligação antígeno-anticorpo. MFIs superiores a 500 foram considerados como positivos, conforme valor de corte da bula do ensaio.

3.4.8. Biópsias de enxerto renal no receptor

As biópsias renais foram realizadas em três circunstâncias: a biópsia em tempo zero foi realizada após reperusão do enxerto renal, a biópsia protocolar após 7 a 10 dias de transplante, e a biópsia por indicação clínica, em caso de disfunção do enxerto e suspeita de rejeição.

As biópsias renais foram realizadas pela equipe da Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, preferencialmente pela via percutânea, e em seguida encaminhadas para o Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e submetidas à avaliação histopatológica com as colorações tradicionais (hematoxilina-eosina, ácido periódico de Shiff e Tricrômio de Masson) e classificadas conforme critérios de Banff vigente na ocasião das biópsias. Os espécimes de biópsias também foram submetidos a estudo imunohistoquímico por imunofluorescência indireta marcada por C4d.

A detecção de C4d baseia-se na técnica de imunofluorescência indireta. Cortam-se fragmentos de rim congelado numa espessura de 2 a 4 μm , os quais são colocados em superfície seca para descongelar durante 30 minutos. Após, estes são lavados com PBS. A seguir, aplicam-se 150 μl de avidina-D (100 $\mu\text{g/ml}$ em PBS/BSA 1%) durante 20 minutos. Repete-se lavagem com PBS. A seguir, aplica-se anti-soro monoclonal contra C4d 1:100 (clone 10-11 Biogenesis) durante 30 minutos. Lava-se com PBS por 3 vezes durante 2 a 3 minutos. Aplica-se anticorpo de cavalo IgG anti-camundongo 1:100 durante 30 minutos. Lava-se com PBS 3 vezes durante 2 a 3 minutos. A seguir aplica-se FITC-estreptavidina 1:50 durante 30 minutos. Repetem-se 3 lavagens durante 2 a 3 minutos.

3.5. Análise estatística

As variáveis contínuas são apresentadas como média e desvio-padrão ou mediana e intervalos interquartis e as variáveis categóricas como frequência absoluta e porcentagem. A diferença entre as médias é determinada pelo teste de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e através do teste exato de Fisher de acordo com sua adequabilidade.

A análise de risco é determinada pelo modelo logístico (dados binários – ex. presença vs não presença de AMR nas biópsias) e modelo de regressão gama (dados positivos assimétricos – ex. CKD-EPI e P/C).

As sobrevidas estimadas do enxerto e dos pacientes foram obtidas através do estimador Kaplan-Meier. Para evitar os casos de censura informativas, para a análise da sobrevida do enxerto não foram consideradas observações de óbito com enxerto funcionando (sobrevida do enxerto censurada para óbitos, N=50 óbitos). A análise de risco do efeito de variáveis em relação à sobrevida do enxerto e à sobrevida do paciente foi feita através do teste de log-rank.

As análises estatísticas foram executadas com auxílio do *software* R (versão 4.0.3). O p-valor < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3.6. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Por tratar-se de estudo observacional, realizado através da análise de dados do prontuário eletrônico, não houve necessidade de TCLE conforme deliberado pelo parecer do CEP de número 4.169.976 na data de 23 de julho de 2020.

4. RESULTADOS

4.1. Pacientes incluídos

No período de janeiro de 2010 a dezembro de 2017, foram realizados 1624 transplantes de rim isolado na Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da FMUSP. Desses, 435 (27%) foram transplantes renais em pacientes previamente sensibilizados, ou seja, com PRA diferente de zero, dos quais 324 foram submetidos à biópsia de vigilância do enxerto renal nos primeiros 7 a 10 dias de pós-transplante e foram incluídos no estudo, conforme evidenciado na figura 5.

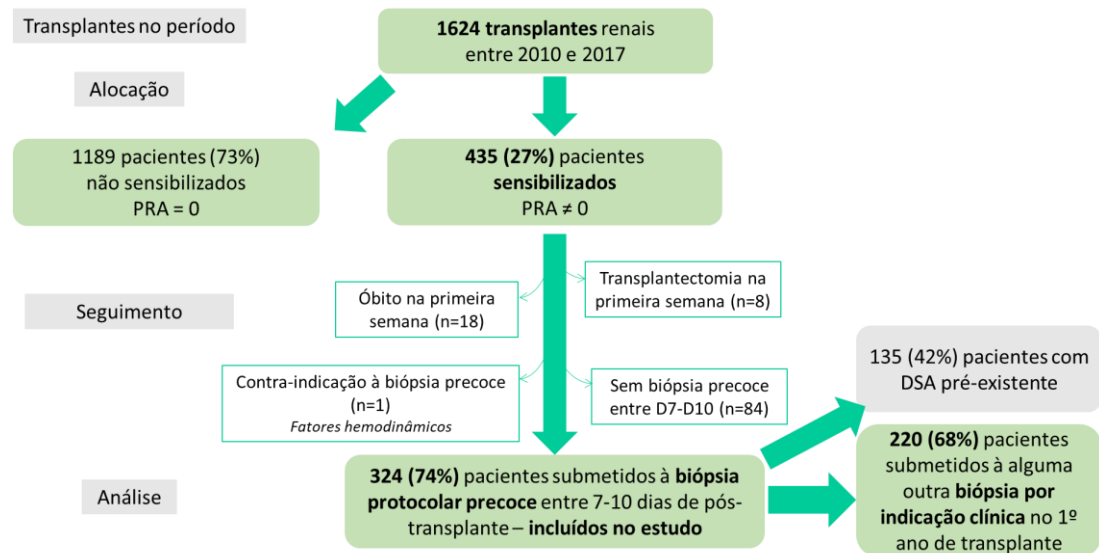


Figura 5: Fluxograma de pacientes incluídos no estudo

Em relação à caracterização demográfica da amostra populacional analisada no estudo, entre os 324 pacientes transplantados renais sensibilizados e submetidos à biópsia protocolar, a idade média foi de 47 ± 12 anos, sendo que 243 (75%) deles eram do sexo feminino. Em relação às formas de sensibilização, entre as mulheres incluídas no estudo, 210 (86%) já haviam tido pelo menos uma gestação prévia. A maioria dos pacientes, 256 (79%), foram submetidos ao primeiro transplante, enquanto 68 (21%) eram

re-transplante e 230 (71%) já haviam recebido transfusão de sangue previamente.

Entre os pacientes incluídos no estudo, 248 (77%) receberam rim de doador falecido, dos quais 152 (47%) cursaram com função retardada do enxerto. A maioria dos pacientes, 297 (92%), receberam indução com Timoglobulina e 304 (94%) receberam o esquema tríplice de imunossupressão de manutenção com Tacrolimo, Prednisona e Micofenolato de sódio. Esses dados descritivos podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1: Caracterização da amostra de pacientes (N=324)

Dados demográficos do receptor	N	
Idade em anos, média (DP)	324	47 ± 12
Sexo feminino, n (%)	324	243 (75)
Gestação prévia, n (%)	243	210 (86)
Número de gestações, n (%)	243	
0		33 (13)
1		23 (9)
2		43 (18)
3 ou mais		144 (59)
Primeiro transplante, n (%)	324	
Sim		256 (79)
Não		68 (21)
Número de transplantes, n (%)	324	
1		255 (79)
2		58 (18)
3 ou mais		11 (3)
Transfusão de sangue sim, n (%)	324	230 (71)
Dados do doador		
Tipo de doador, n (%)	324	
Falecido		248 (76)
Vivo		75 (23)
Dados transplante		
Função retardada do enxerto, n (%)	324	152 (47)
Indução com Timoglobulina, n (%)	324	297 (92)
Imunossupressão com TAC+P+MPA n (%)	324	304 (94)

Primeira parte do estudo

4.2. Dados clínicos

4.2.1. Perfil imunológico pré e pós-transplante

4.2.1.1. Reatividade contra painel no pré-transplante renal

Em relação aos dados imunológicos, os 324 pacientes incluídos apresentavam painel diferente de zero, sendo que 118 (37%) deles tinham PRA acima de 80%. Na amostra estudada, 116 (36%) pacientes tinham apenas anticorpos de Classe I e 32 (10%) apresentavam apenas anticorpos de Classe II, enquanto 176 (54%) pacientes apresentavam anticorpos de Classe I e de Classe II pré-transplante. 135 (42%) pacientes da amostra apresentavam anticorpos específicos contra o doador (DSA) antes do transplante, como pode ser observado na tabela 2 e gráfico 1. A mediana da intensidade do MFI do DSA imunodominante foi de 3250 (2026-6865), gráfico 2. Todos os dados imunológicos da amostra podem ser visualizados na tabela 2.

4.2.1.2. Reatividade contra painel no pós-transplante renal

Foi realizada a pesquisa de DSA *de novo* no pós-transplante quando realizada a biópsia por indicação. Dos 220 pacientes com biópsia por indicação, 47 (21%) não tiveram pesquisa de DSA. Entre os 173 com pesquisa, 121 (70%) o DSA era positivo e em 52 (30%) o DSA era negativo. Chama a atenção que, dentre os 121 pacientes com DSA positivo no período da biópsia por indicação, 110 (91% dos casos) corresponderam a DSA pré-formado e apenas 11 (9%) a DSA *de novo*. Tais dados podem ser vistos na tabela 3 e no gráfico 3.

Tabela 2: Caracterização dos dados imunológicos da amostra de pacientes (N=324)

Características Imunológicas	N = 324 (%)
PRA Classe I e Classe II; n (%)	
1 – 10%	19 (6)
11 – 50%	99 (31)
51 – 80%	88 (27)
>80%	118 (36)
PRA calculado %, média ± DP	
Classe I	47 ± 29
Classe II	38 ± 26
Classes de anticorpos anti-HLA, n (%)	
Apenas Classe I	116 (36)
Apenas Classe II	32 (10)
Classes I & II	176 (54)
Mismatches HLA; n (%)	
Locus A, B e DR	
0	21 (6)
1-2	101 (31)
3-4	135 (42)
5-6	67 (21)
Locus –Cw (n=55)	
0	7 (13)
1	25 (45)
2	23 (42)
Locus –DQ (n=88)	
0	54 (61)
1	24 (28)
2	10 (11)
DSA pré-transplante, n (%)	135 (42)
MFI do DSA imunodominante (IQ₁-IQ₃)	3250 (2026-6885)
MFI do DAS pré-transplante, n (%)	
500 - 1500	13 (10)
1501 – 3000	44 (33)
3001 – 6000	37 (27)
>6000	41 (30)

PRA: *panel reactivity antibodies*

Mismatches: incompatibilidades

DSA: *donor specific antibody*

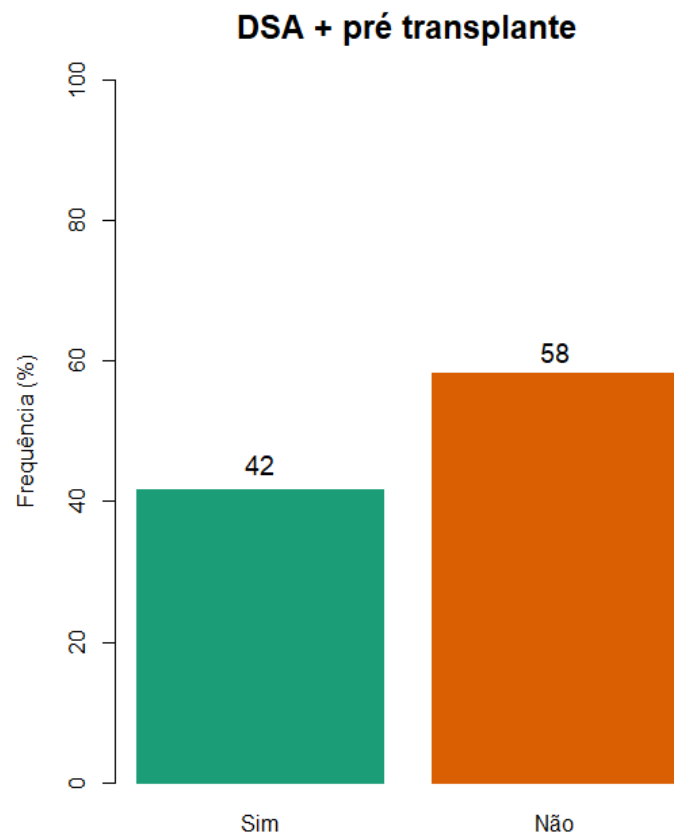
Gráfico 1: Frequência de DSA positivo pré-transplante

Gráfico 2: Gráfico em boxplot da mediana do MFI imunodominante dos DSA pré-transplante

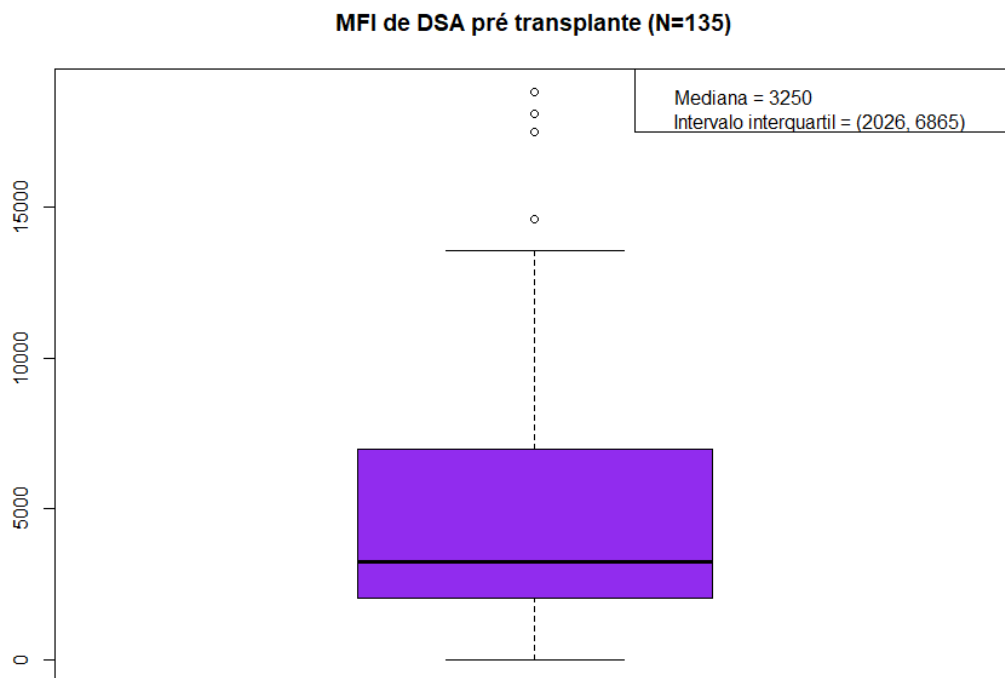
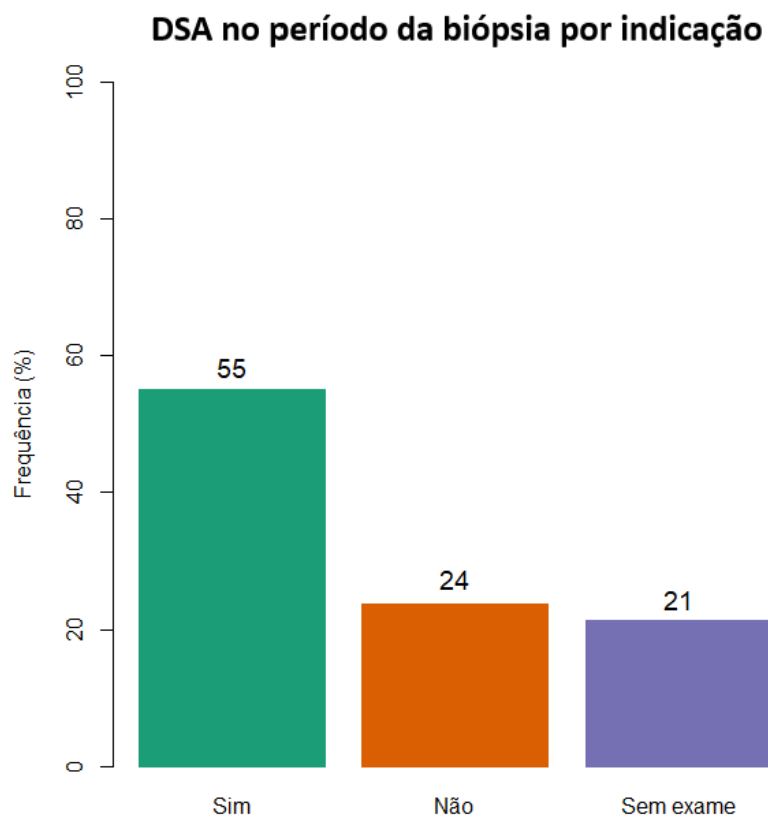


Tabela 3: Frequência absoluta e percentuais de DSA (pré-formado ou *de novo*) positivo no período da biópsia por indicação (N=220)

DSA (pré-formado ou <i>de novo</i>) no período da biópsia por indicação	Frequência (%)
Positivo	121 (55)
Negativo	52 (24)
Sem exame	47 (21)
Total	220 (100)

Gráfico 3: Frequência de DSA (pré-formado ou *de novo*) positivo no período da biópsia por indicação



4.3. Achados histológicos

4.3.1. Tempo médio entre o transplante e a biópsia protocolar e complicações das biópsias protocolares

O tempo médio entre o transplante de rim e a realização da biópsia protocolar foi de aproximadamente 9 dias (mediana de 8 dias, intervalo interquartil de 6-11 dias), conforme pode ser visualizado no gráfico 4. A biópsia protocolar mostrou-se ser um procedimento seguro, conforme observado na tabela 4 e no gráfico 5. A complicação mais frequente foi sangramento manifestado por hematúria.

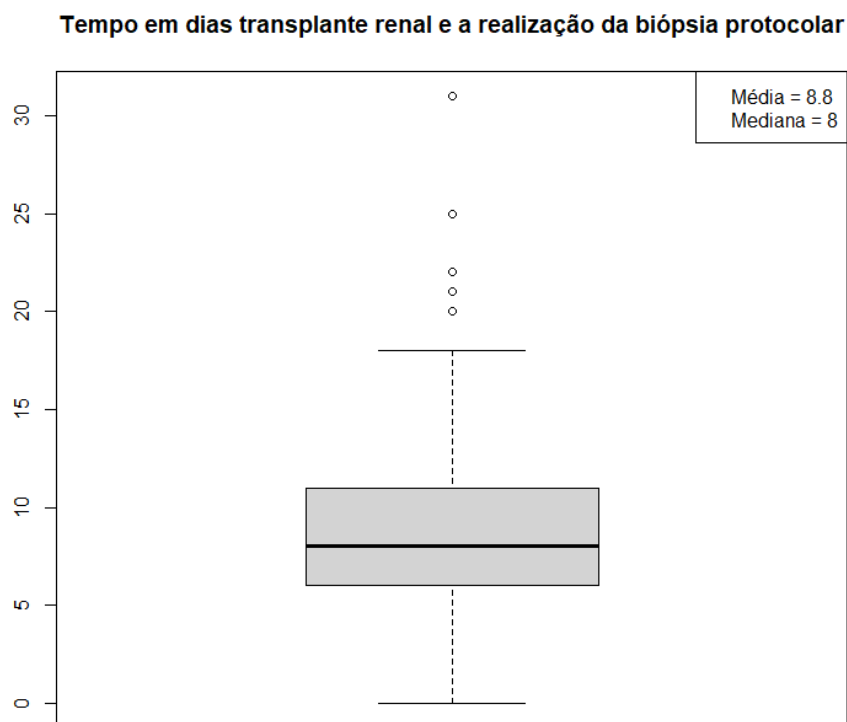
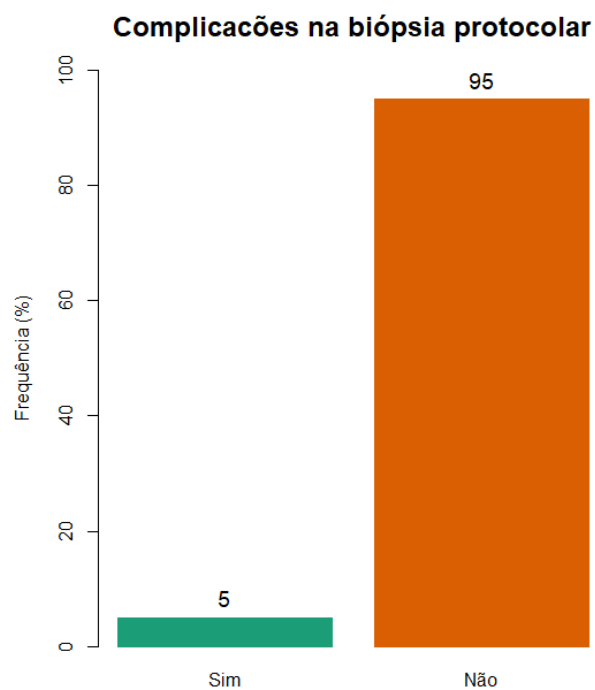


Gráfico 4: Tempo médio e mediana entre o transplante e a biópsia protocolar

Tabela 4: Frequência absoluta e percentuais de complicações na biópsia protocolar (N=324)

Complicações na biópsia protocolar	Frequência (%)
Sim	16 (5)
Não	308 (95)
Total	324 (100)

Gráfico 5: Frequência de complicações na biópsia protocolar



4.3.2. Histologia das biópsias de enxerto renal de tempo zero e das biópsias protocolares (7-10 dias após o transplante)

Dos 324 pacientes submetidos à biópsia protocolar, 166 (51%) também haviam sido submetidos à biópsia de tempo zero e 220 (68%) deles foram submetidos posteriormente à biópsia por indicação clínica. A mediana de dias entre a biópsia protocolar e a biópsia por indicação foi de 54 dias (interquartil de 15-118 dias). Percebe-se que tanto na biópsia de tempo zero, como na biópsia protocolar, o principal achado histológico foi a necrose tubular aguda (NTA), seguido de glomerulite e/ou pericapilarite. NTA ocorreu em 132 (76%) os pacientes com biópsia de tempo zero e em 158 (49%) pacientes com biópsia protocolar e o achado de glomerulite e/ou pericapilarite ocorreu em 16 (9,6%) pacientes com biópsia de tempo zero e 39 (12%) pacientes com biópsia protocolar. Outro achado histológico relevante na biópsia protocolar (n=324) foi o de rejeição aguda mediada por anticorpos (ABMR) em 39 (12%) pacientes. Tabela 5 e Gráficos 6.1 (biópsia em tempo zero) e 6.2 (biópsia protocolar).

4.3.3. Histologia das biópsias de enxerto renal por indicação

Quando analisamos os principais achados histológicos da biópsia por indicação (n=220), os casos de NTA correspondeu a 42 (19%) pacientes, o achado de glomerulite e/ou pericapilarite ao todo somaram 31 (14%) pacientes, o número de casos de ABMR ao todo somaram 30 (14%) pacientes. Chama a atenção o número de casos de atrofia tubular e fibrose intersticial (IFTA), totalizando 24 (11%) pacientes, entre os achados histológicos na biópsia por indicação clínica. A caracterização dos principais achados histológicos nas biópsias de enxerto renal nos três tempos pode ser vista na tabela 5 e no gráfico 6.3.

Tabela 5: Frequências absolutas e percentuais dos principais achados histológicos das biópsias no tempo zero, protocolar e por indicação

Achados histológicos	Biópsia no tempo zero N = 166	Biópsia protocolar N = 324	Biópsia por indicação N = 220
Normal; n (%)	3 (2)	21 (6)	9 (4)
NTA; n (%)	132 (80)	158 (49)	42 (19)
ABMR; n (%)	0 (0)	39 (12)	30 (14)
TCMR; n (%)	0 (0)	3 (1)	11 (5)
G e/ou ptc; n (%)	16 (10)	39 (12)	31 (14)
Infiltrado limítrofe; n (%)	0 (0)	13 (4)	16 (7)
IFTA; n (%)	0 (0)	0 (0)	24 (11)
Outros; n (%)	15 (9)	51 (16)	57 (26)

NTA: necrose tubular aguda; ABMR: rejeição mediada por anticorpos; TCMR: rejeição mediada por células; G e/ou/ptc: glomerulite e/ou pericapilarite

Gráfico 6.1: Gráfico de barras com frequências absolutas dos principais achados histológicos das biópsias no tempo zero

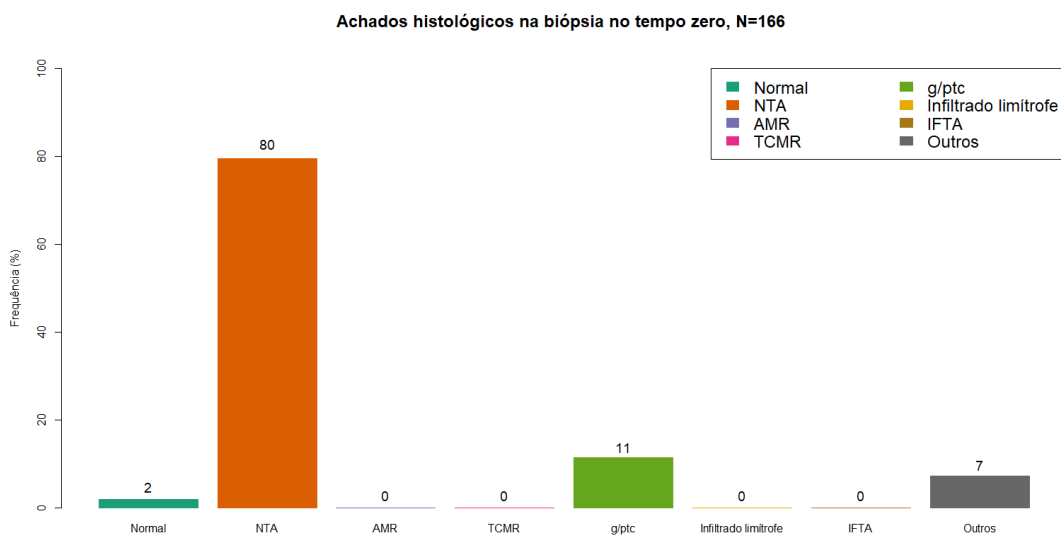


Gráfico 6.2: Gráfico de barras com frequências absolutas dos principais achados histológicos das biópsias protocolar

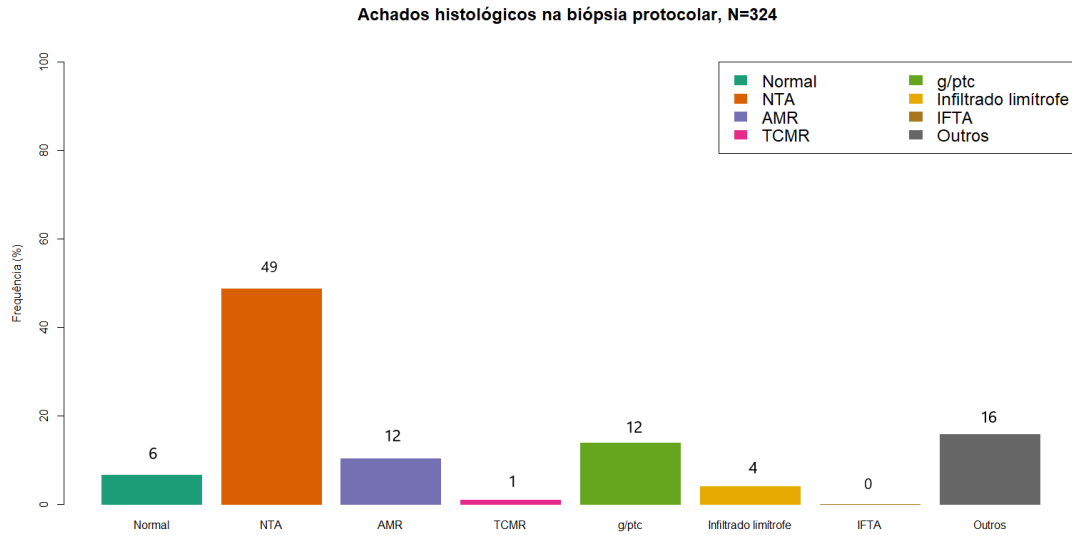
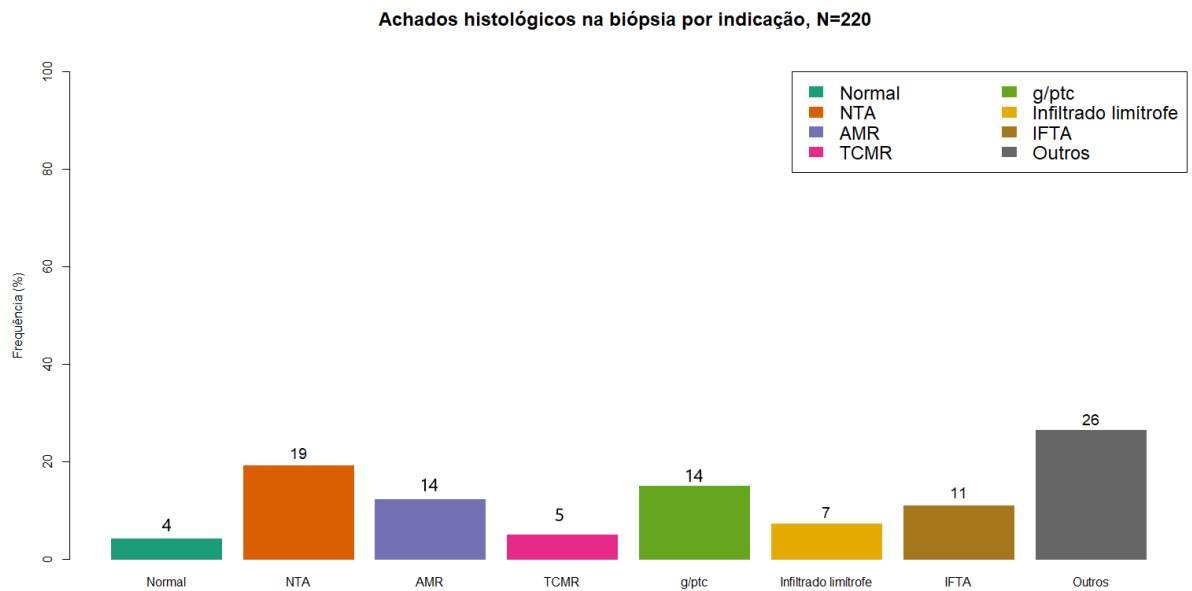


Gráfico 6.3: Gráfico de barras com frequências absolutas dos principais achados histológicos das biópsias por indicação clínica



4.4. Estudo imunopatológico

Entre os pacientes que realizaram ambas as biópsias, protocolar e por indicação (n=220), percebe-se uma manutenção do padrão de positividade do C4d em ambos os momentos. A maioria dos pacientes apresentaram C4d negativo, tanto na biópsia protocolar, 161 (75%), como na biópsia por indicação, 154 (70%). Dentre aqueles que apresentaram deposição de C4d, a maioria teve positividade em mais de 50% dos capilares peritubulares, respectivamente, 29 (13%) na biópsia protocolar e 26 (12%) na biópsia por indicação. A pesquisa de C4d não estava disponível para todos os pacientes submetidos a ambas as biópsias, não sendo realizada em 22 (10%) pacientes quando da biópsia protocolar e em 27 (12%) quando da biópsia por indicação. Entre os que tiveram pesquisa de C4d (198), 161 (81%) tiveram resultado negativo e 37 (19%) tiveram resultado positivo na biópsia protocolar. Quando da biópsia por indicação, entre os pacientes que tiveram pesquisa de C4d (193), 154 (80%) tiveram resultado negativo e 39 (20%) tiveram resultado positivo. Esses dados podem ser vistos na tabela 6.

Tabela 6: Frequências absolutas e percentuais de deposição do C4d das biópsias protocolar e por indicação

C4d	Biópsia protocolar	Biópsia por indicação
	N = 220	N = 220
Negativo	161 (73)	154 (70)
<10%	2 (10)	6 (3)
10% a 50%	6 (3)	7 (3)
> 50%	29 (13)	26 (12)
Sem exame	22 (10)	27 (12)

4.5. Função renal

4.5.1. Associação entre taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) e histologia nas biópsias protocolares e por indicação

Em relação aos principais achados histológicos e seu impacto na Taxa de Filtração Glomerular estimada (TFGe), chama atenção que o achado de rejeição mediada por anticorpos (ABMR), seja na biópsia protocolar renal precoce, seja na biópsia por indicação clínica, está associado à menor TFGe em 1 ano e em 3 anos de seguimento no pós-transplante ($p < 0,05$). Por outro lado, o achado de alterações histológicas mais incipientes relacionadas à inflamação microvascular e vistas isoladamente, sem o componente imunológico, como glomerulite e/ou pericapilarite, não foi associado à queda da TFGe no mesmo período, conforme demonstrado na tabela 7 e no gráfico 7.

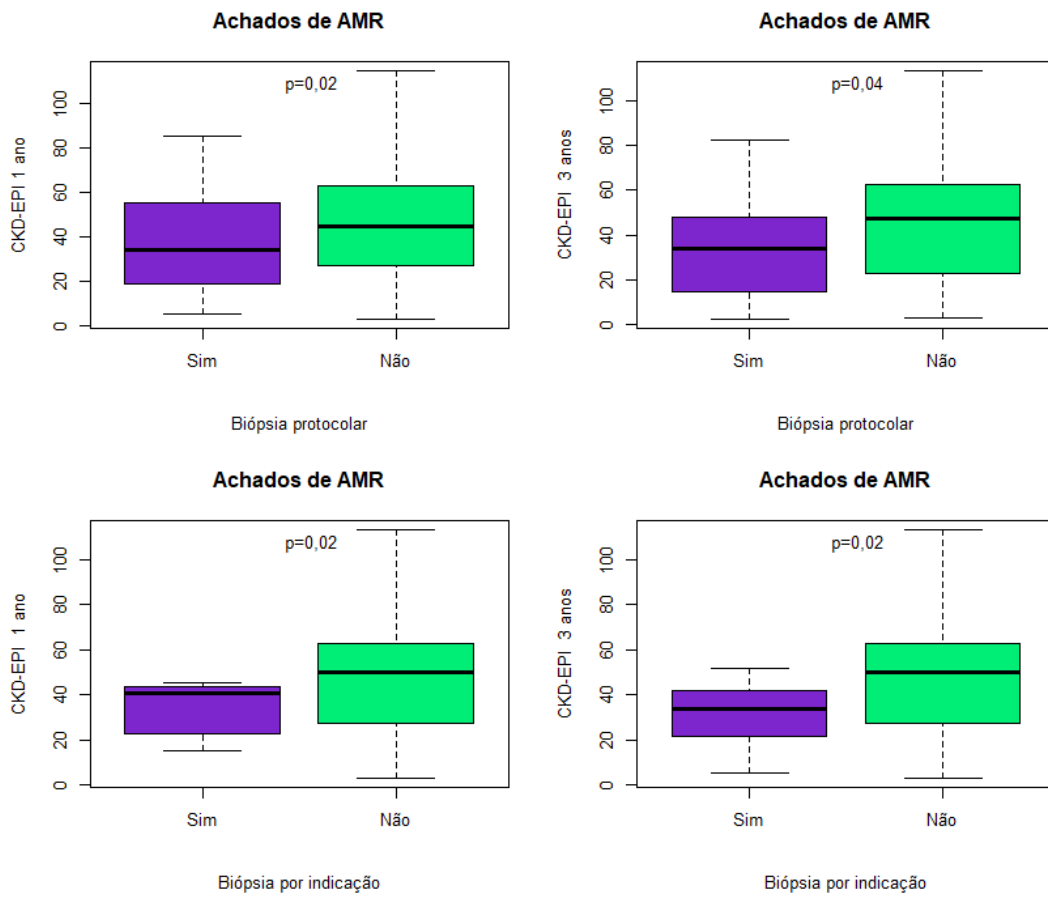
Tabela 7: Taxa de Filtração Glomerular (TFG estimada por CKD-EPI) de acordo com achados histológicos nas biópsias protocolar e por indicação

TFGe (mL/min/1,73m ²) em 1 ano			
Achados histológicos	Sim	Não	Valor-p
ABMR – biópsia protocolar	37 (22)	47 (24)	0,02
ABMR – biópsia por indicação	34 (11)	48 (24)	0,02
g e/ou ptc - biópsia protocolar	47 (25)	46 (23)	0,81
g e/ou ptc - biópsia por indicação	38 (19)	35 (22)	0,89
IFTA – biópsia protocolar ¹	-	-	-
IFTA – biópsia por indicação	39 (18)	38 (22)	0,94
TFGe (mL/min/1,73m ²) em 3 anos			
Achados histológicos	Sim	Não	Valor-p
ABMR – biópsia protocolar	35 (24)	47 (25)	0,04
ABMR – biópsia por indicação	32 (14)	48 (25)	0,02
g e/ou ptc - biópsia protocolar	46 (24)	46(25)	0,94
g e/ou ptc - biópsia por indicação	36 (22)	36 (23)	0,87
IFTA – biópsia protocolar	-	-	-
IFTA – biópsia por indicação	35 (20)	36 (23)	0,84

ABMR: rejeição mediada por anticorpos; g: glomerulite; ptc: pericapilarite; IFTA: fibrose intersticial e atrofia tubular

¹Na amostra analisada (N=324) a frequência de IFTA na biópsia protocolar foi igual a 1.

Gráfico 7: Gráfico em boxplots para Taxa de Filtração Glomerular (TFG estimada por CKD-EPI) de acordo com presença ou não de ABMR nas biópsias protocolar e por indicação



4.5.2. Associação entre proteinúria e histologia nas biópsias protocolar e por indicação

Com relação à detecção de proteinúria e sua associação com achados histológicos, apenas o diagnóstico de ABMR na biópsia por indicação, e não na protocolar, foi associado ao aumento da relação proteína/creatinina urinária (P/C), no seguimento de 1 ano e de 3 anos após o transplante ($p < 0,05$), como pode ser visualizado na tabela 8 e no gráfico 8.

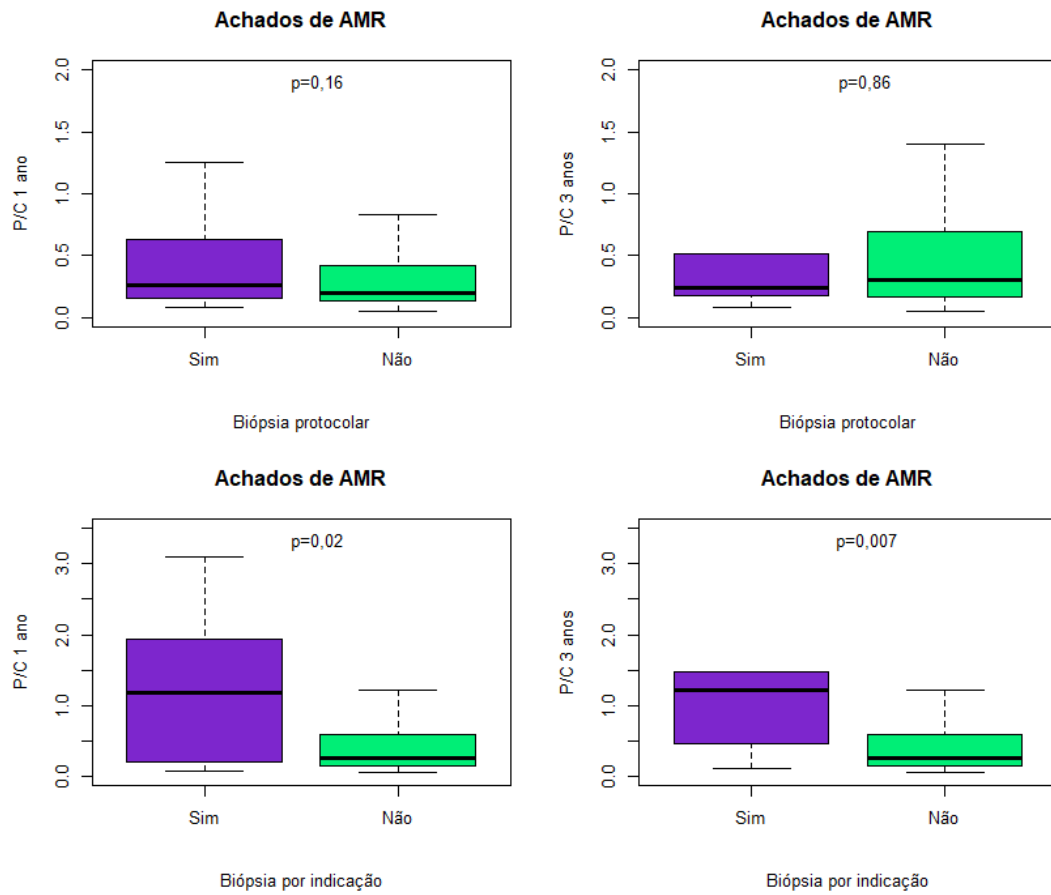
Os demais achados histológicos, a citar glomerulite e/ou pericapilarite (g e/ou ptc) e fibrose intersticial e atrofia tubular (IFTA), tanto na biópsia protocolar, quanto na biópsia por indicação, não tiveram associação estatisticamente significativa com o aumento da proteinúria em 1 e em 3 anos de seguimento. Tabela 8 e gráfico 8.

Tabela 8: Relação proteína/creatinina (P/C) de acordo com achados histológicos nas biópsias protocolar e por indicação

Relação P/C em 1 ano			
Achados histológicos	Sim	Não	Valor-p
ABMR – biópsia protocolar	0,9 (2)	0,5 (0,8)	0,16
ABMR – biópsia por indicação	1,2 (1)	0,5 (0,8)	0,02
g e/ou ptc - biópsia protocolar	0,5 (1)	0,6 (0,7)	0,70
g e/ou ptc - biópsia por indicação	0,5 (1)	0,8 (0,8)	0,28
IFTA – biópsia protocolar	-	-	-
IFTA – biópsia por indicação	0,3 (0,2)	0,5 (0,8)	0,80
Relação P/C em 3 anos			
Achados histológicos	Sim	Não	Valor-p
ABMR – biópsia protocolar	0,8 (1,4)	0,6 (0,9)	0,83
ABMR – biópsia por indicação	1,4 (1,2)	0,6 (0,9)	0,007
g e/ou ptc - biópsia protocolar	0,6 (0,4)	0,4 (0,7)	0,62
g e/ou ptc - biópsia por indicação	0,8 (0,6)	0,6 (1,3)	0,61
IFTA – biópsia protocolar	-	-	-
IFTA – biópsia por indicação	0,85 (0,97)	0,77 (1,33)	0,05

ABMR: rejeição mediada por anticorpos; g: glomerulite; ptc: pericapilarite; IFTA: fibrose intersticial e atrofia tubular

Gráfico 8: Gráfico em boxplots para relação proteína/creatinina (P/C) de acordo com o achado histológico de ABMR nas biópsias protocolar e por indicação



4.5.3. Associação entre a deposição de C4d nas biópsias protocolar e por indicação e indicadores de função renal

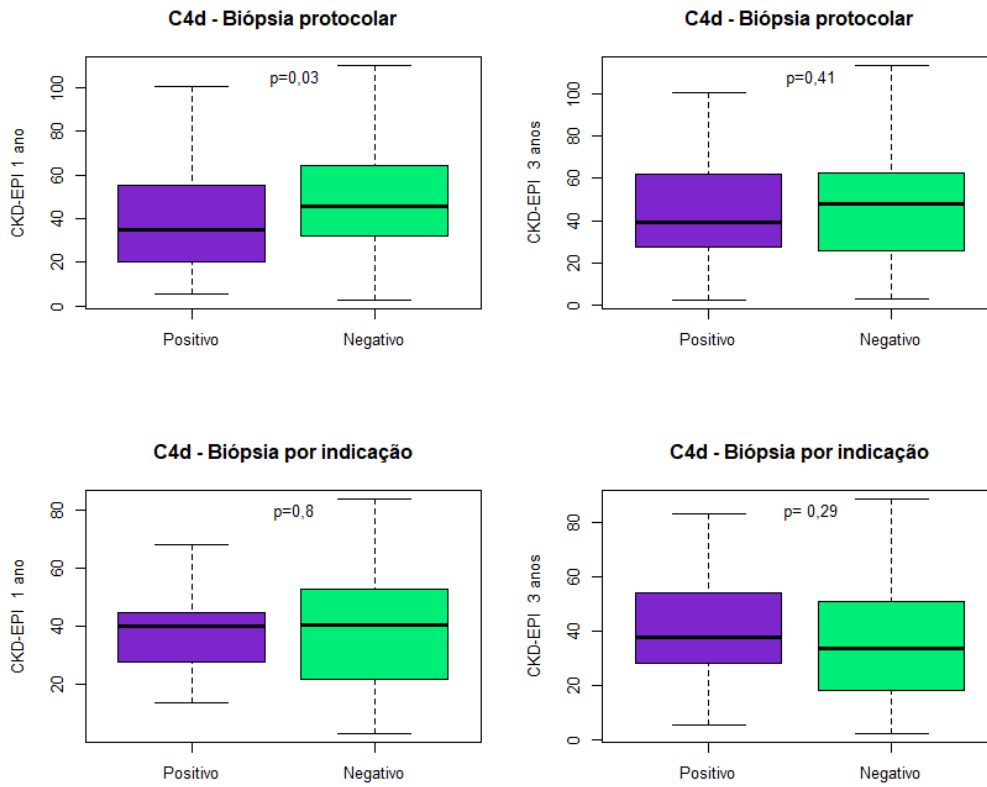
Ao analisar a deposição de C4d nos capilares peritubulares das biópsias protocolar e por indicação, nota-se que apenas a positividade do C4d na biópsia protocolar esteve associada à menor TFGe em 1 ano de seguimento ($p < 0,05$), porém esse resultado não permaneceu significativo no seguimento de 3 anos ou no achado de C4d positivo na biópsia por indicação clínica, o que pode ser visto na tabela 9 e gráfico 9. A positividade do C4d tanto na biópsia protocolar, como naquela por indicação, não foi associada à piora da proteinúria nesse mesmo período de acompanhamento.

Tabela 9: Indicadores de função renal (TFG por CKD-EPI e P/C) de acordo com a deposição de C4d nas biópsias protocolar e por indicação

	C4d - Biópsia protocolar (N=324)		
	Negativo	Positivo	Valor-p
CKD-EPI 1 ano	48,04 (24,14)	39,62 (23,53)	0,03
CKD-EPI 3 anos	46,99 (25,62)	42,95 (25,92)	0,41
P/C 1 anos	0,46 (0,75)	0,81 (1,93)	0,33
P/C 3 anos	0,62 (0,94)	0,68 (1,21)	0,87
	C4d - Biópsia por indicação (N=220)		
	Negativo	Positivo	Valor-p
CKD-EPI 1 ano	39,03 (21,04)	38,60 (16,61)	0,80
CKD-EPI 3 anos	35,41 (20,75)	40,18 (20,59)	0,29
P/C 1 anos	0,61 (0,93)	1,00 (2,13)	0,73
P/C 3 anos	0,78 (1,19)	0,85 (1,02)	0,62

P/C: relação proteína/creatinina

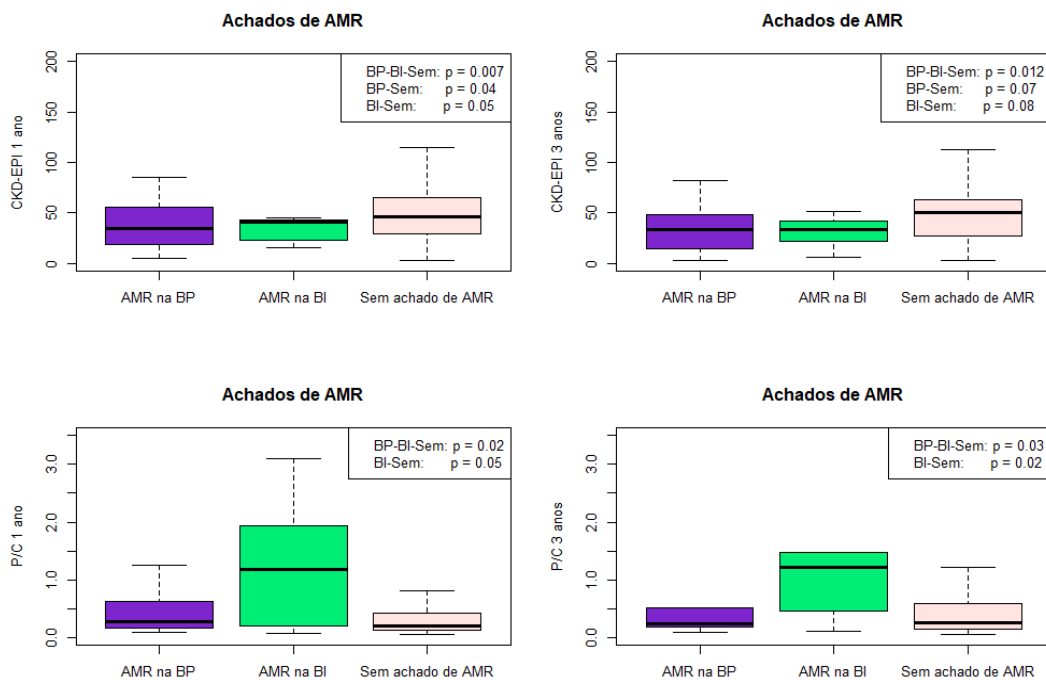
Gráfico 9: Gráfico em boxplots para Taxa de Filtração Glomerular (TFG estimada por CKD-EPI) de acordo com a deposição de C4d nas biópsias protocolar e por indicação



4.5.4. Comparação da TFGe entre pacientes com ABMR na biópsia protocolar, na biópsia por indicação e sem ABMR

Quando comparada a função renal entre os pacientes que apresentaram ABMR na biópsia protocolar, aqueles que tiveram ABMR na biópsia por indicação e aqueles que não apresentaram ABMR em nenhum momento, percebe-se que a presença de ABMR tanto na biópsia protocolar, como na biópsia por indicação conferiu menor TFGe e maior P/C em 1 ano de seguimento do pós-transplante ($p < 0,05$). Ao se comparar os grupos de pacientes com ABMR na biópsia renal precoce em relação àqueles que tiveram ABMR diagnosticada apenas na biópsia por indicação clínica, percebe-se uma tendência à menor TFGe e maior P/C no grupo que teve seu diagnóstico histológico de ABMR mais tardiamente, na biópsia por indicação, o que pode ser visualizado no gráfico 10.

Gráfico 10: Gráfico em boxplots para Taxa de Filtração Glomerular (TFG estimada por CKD-EPI) e Proteinúria (P/C) em 1 ano de acordo com o achado histológico de ABMR nas biópsias protocolares e por indicação e ausência do achado. BP: biópsia protocolar. BI: biópsia por indicação



4.6. Análises de risco

4.6.1 Fatores de risco implicados na redução da TFGe

4.6.1.1. Análise univariada

No que concerne aos achados histológicos, na análise univariada de risco, a um nível de significância de 20%, o diagnóstico de ABMR seja na biópsia protocolar, seja na biópsia por indicação clínica, reduziu a média da TFGe em 1 ano em 21% (IC: 0,60 – 0,99, $p < 0,05$) e em 30% (IC: 0,55 – 0,86, $p < 0,05$), respectivamente. Ademais, o diagnóstico de ABMR na biópsia por indicação teve efeito de diminuir a TFGe em 35% (IC: 0,46 – 0,85r, $p < 0,05$) em 3 anos de seguimento. As variáveis utilizadas na análise univariada de risco podem ser visualizadas na tabela 10.

Nenhum dos indicadores de inflamação microvascular, como glomerulite e/ou pericapilarite, vistos isoladamente, ou deposição C4d nos capilares peritubulares, seja na biópsia protocolar, seja na biópsia por indicação, foi associado a impacto negativo na função renal no período de 1 e de 3 anos de seguimento. Esses dados podem ser vistos na tabela 10.

Tabela 10: Análise univariada de risco para redução da TFGe em 1 ano e 3 anos de seguimento

TFGe (mL/min/1,73m ²) em 1 ano				
	Efeito	IC 95 inf	IC 95 sup	Valor-p
Sexo feminino	1,043	0,885	1,201	0,583
Idade	0,997	0,993	1,002	0,418
Doador falecido	0,971	0,837	1,105	0,681
Achado ABMR BP sim	0,799	0,609	0,990	0,006
Achado ABMR BI sim	0,706	0,552	0,860	0,001
Achado g e/ou ptc BP sim	1,030	0,840	1,220	0,749
Achado g e/ou ptc BI sim	0,916	0,649	1,184	0,560
C4d BP positivo	0,824	0,655	0,993	0,065
DSA positivo pré transplante	0,926	0,808	1,043	0,235
TFGe (mL/min/1,73m ²) em 3 anos				
	Efeito	IC 95 inf	IC 95 sup	Valor-p
Sexo feminino	0,966	0,802	1,130	0,692
Idade	0,994	0,989	1,000	0,005
Tipo de doador falecido	0,991	0,823	1,159	0,918
Achado ABMR BP sim	0,760	0,503	1,018	0,112
Achado ABMR BI sim	0,657	0,465	0,849	0,004
Achado g e/ou ptc BP sim	0,998	0,782	1,214	0,991
Achado g e/ou ptc BI sim	0,991	0,614	1,368	0,966
C4d BP positivo	0,914	0,685	1,142	0,480
DSA positivo pré transplante	0,902	0,760	1,045	0,204

ABMR: rejeição mediada por anticorpos

BP: biópsia protocolar

BI: biópsia por indicação

g: glomerulite

ptc: pericapilarite

DSA: donor specific antibody

Na análise univariada de risco para a ocorrência de proteinúria, apenas o diagnóstico histológico de ABMR, na biópsia por indicação, aumentou o risco para a elevação da relação P/C em 2,6 vezes (IC: 1,0 – 4,2, $p < 0,05$) em 1 ano de seguimento e em 2,4 vezes (IC: 0,91 – 3,9, $p < 0,05$) em 3 anos de acompanhamento. Da mesma forma que para a TFGe, os achados histológicos que denotam inflamação microvascular (glomerulite e/ou pericapilarite), analisados isoladamente, não tiveram efeito de piorar a proteinúria nesse tempo de seguimento. Esses resultados e as variáveis utilizadas na análise univariada de risco podem ser vistos na tabela 11.

Chama atenção o fato de a presença de DSA positivo no pré-transplante, analisado também isoladamente, não ter sido associada a qualquer impacto seja na TFGe, seja na P/C, em 1 ano e em 3 anos de seguimento dessa coorte.

Tabela 11: Análise univariada de risco para proteinúria em 1 ano e 3 anos de seguimento

Relação P/C em 1 ano				
	Efeito	IC 95 inf	IC 95 sup	Valor-p
Sexo feminino	0,652	0,250	1,053	0,173
Idade	0,992	0,968	1,016	0,554
Tipo de doador falecido	1,711	0,957	2,465	0,016
Achado ABMR BP sim	1,998	0,135	3,862	0,145
Achado ABMR BI sim	2,610	1,029	4,190	0,001
Achado g e/ou ptc BP sim	1,227	0,425	2,030	0,538
Achado g e/ou ptc BI sim	1,724	0,128	3,320	0,428
C4d BP positivo	1,764	0,250	3,274	0,195
DSA pré transplante +	1,091	0,551	1,630	0,728
Relação P/C em 3 anos				
	Efeito	IC 95 inf	IC 95 sup	Valor-p
Sexo feminino	0,812	0,403	1,221	0,419
Idade	1,004	0,990	1,018	0,507
Tipo de doador falecido	0,960	0,370	1,551	0,898
Achado ABMR BP sim	1,357	0,034	2,680	0,538
Achado ABMR BI sim	2,435	0,909	3,962	0,0005
Achado g e/ou ptc BP sim	0,721	0,408	1,033	0,319
Achado g e/ou ptc BI sim	0,740	0,031	1,448	0,537
C4d BP positivo	1,099	0,167	2,030	0,827
DSA pré transplante +	1,363	0,742	1,983	0,182

ABMR: rejeição mediada por anticorpos

BP: biópsia protocolar

BI: biópsia por indicação

g: glomerulite

ptc: pericapilarite

DSA: donor specific antibody

4.6.1.2. Análise multivariada

Ao realizar a análise multivariada de risco, o diagnóstico histológico de ABMR na biópsia por indicação, mas não na biópsia protocolar, constituiu fator independente de risco para a diminuição da TFGe em 1 ano e em 3 anos de seguimento no pós-transplante. A ocorrência de ABMR na biópsia por indicação teve o efeito de reduzir em 22% (IC: 0,61 – 0,96, $p < 0,05$) a TFGe em 1 ano e em 29% (IC: 0,54 – 0,89) em 3 anos de acompanhamento. O diagnóstico de ABMR na biópsia renal protocolar e a existência prévia de DSA não se mostraram fatores de risco independentes para a perda de TFGe nessa coorte de pacientes sensibilizados. Esses dados podem ser observados na tabela 12.

Tabela 12: Análise multivariada de risco para diminuição da TFGe em 1 ano e 3 anos de seguimento

TFGe (mL/min/1,73m ²) em 1 ano				
	Efeito	IC 95 inf	IC 95 sup	Valor-p
Sexo feminino	1,03	0,865	1,190	0,732
Achado ABMR BP sim	0,85	0,487	1,208	0,441
Achado ABMR BI sim	0,78	0,607	0,959	0,033
C4d BP positivo	0,92	0,561	1,287	0,695
DSA positivo pré transplante	0,98	0,840	1,119	0,782
TFGe (mL/min/1,73m ²) em 3 anos				
	Efeito	IC 95 inf	IC 95 sup	Valor-p
Sexo feminino	1,02	0,868	1,182	0,744
Idade	0,99	0,991	1,001	0,194
Achado ABMR BP	0,82	0,599	1,033	0,134
Achado ABMR BI	0,72	0,542	0,889	0,006
DSA positivo pré transplante	0,96	0,830	1,090	0,556

ABMR: rejeição mediada por anticorpos

BP: biópsia protocolar

BI: biópsia por indicação

DSA: donor specific antibody

Em relação ao efeito sobre a proteinúria, novamente apenas o diagnóstico histológico de ABMR na biópsia por indicação se mostrou como fator de risco independente para o aumento da relação P/C, tendo o efeito de aumentá-la em 2,7 vezes (IC: 1,0 – 4,4, $p < 0,05$) em 3 anos de seguimento, o que pode ser visualizado na tabela 13.

Tabela 13: Análise multivariada de risco para proteinúria em 1 ano e 3 anos de seguimento

Relação P/C em 1 ano				
	Efeito	IC 95 inf	IC 95 sup	Valor-p
Sexo feminino	0,87	0,396	1,345	0,618
Tipo de doador falecido	1,24	0,649	1,824	0,380
Achado ABMR BP	2,19	0,112	4,259	0,106
Achado ABMR BI	1,39	0,426	3,207	0,620
C4d positivo BP	0,60	0,157	1,045	0,176
Relação P/C em 3 anos				
	Efeito	IC 95 inf	IC 95 sup	Valor-p
Sexo feminino	0,76	0,329	1,191	0,344
Achado ABMR BI	2,72	1,051	4,399	0,001
DSA pré transplante	1,10	0,611	1,588	0,673

ABMR: rejeição mediada por anticorpos

BP: biópsia protocolar

BI: biópsia por indicação

DSA: donor specific antibody

4.7. Evolução

4.7.1. Análises da frequência e das causas de perda do enxerto

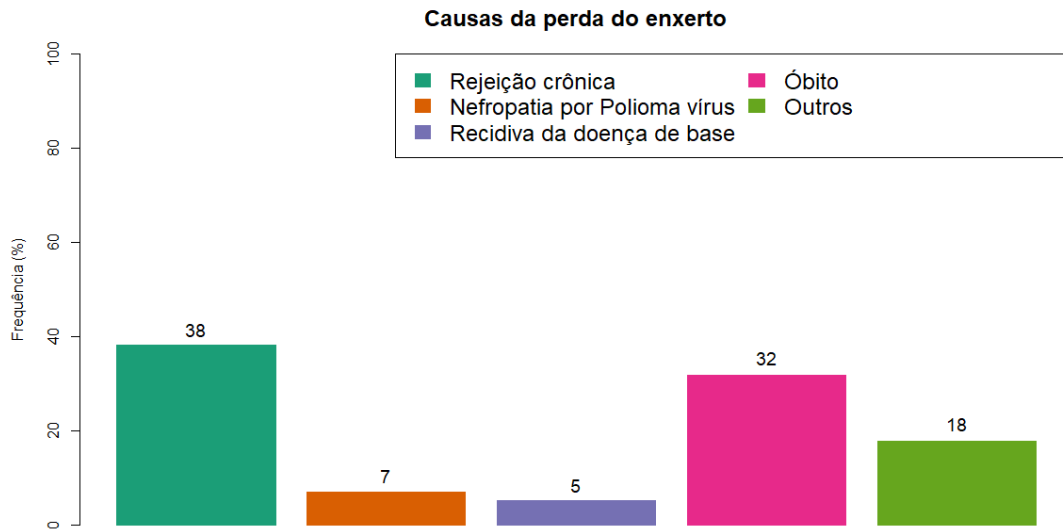
Durante o acompanhamento dessa coorte (324 pacientes), foram observadas 157 (48%) perdas do enxerto, como pode ser visto na tabela 14. O tempo médio para a perda do enxerto foi de 6,2 anos e a mediana foi de 6,4 anos. Na maioria dos casos, a causa da perda do enxerto se deveu à ocorrência de rejeição crônica (38%), seguida em frequência por óbito com enxerto funcionante (32%). A nefropatia por poliovírus (7%) e a recidiva da doença de base (5%) também foram causas observadas de perda do enxerto nessa população, conforme demonstrado na tabela 15 e gráfico 11.

Tabela 14: Frequência absoluta e percentuais de perda de enxerto na coorte observada (N=324)

Perdas de enxerto durante o acompanhamento	Frequência (%)
Sim	157 (48)
Não	167 (52)
Total	324 (100)

Tabela 15: Frequência absoluta e percentuais de causas da perda do enxerto na coorte observada (N=157)

Causas da perda do enxerto	Frequência (%)
Rejeição crônica	60 (38)
Nefropatia por Poliovírus	11 (7)
Recidiva da doença de base	8 (5)
Óbito com enxerto funcionante	50 (32)
Outros	28 (17)
Total	157 (100)

Gráfico 11: Distribuição percentual das causas de perda do enxerto

4.7.2. Análises de sobrevida do enxerto em 1, 3 e 5 anos de acompanhamento

Para a análise de probabilidade de sobrevida do enxerto em 1, 3 e 5 anos, definiu-se o tempo de sobrevida do enxerto censurada para óbito como o tempo entre a biópsia protocolar até a perda do enxerto; e o tempo de sobrevida do paciente como o tempo entre a biópsia protocolar até a ocorrência do óbito. Especificou-se um tempo máximo de acompanhamento para a observações dos eventos de interesse em: 31/12/2022. Nesse caso, eventos observados após esse período, são considerados observações censuradas. A probabilidade de sobrevida do enxerto em 1 ano foi de 85%.

Em 3 anos, foi de 78% e em 5 anos, foi de 72%. Esses resultados podem ser visualizados na tabela 16 e na figura 6.

Tabela 16: Sobrevidas do enxerto censurada para óbito estimadas em 1 ano, 3 anos e 5 anos e respectivos intervalos de confiança de 95%

Sobrevida estimada do enxerto censurada para óbito (IC 95%)		
1 ano	3 anos	5 anos
0.85 (0.81; 0.89)	0.78 (0.74; 0.83)	0.72 (0.67; 0.77)

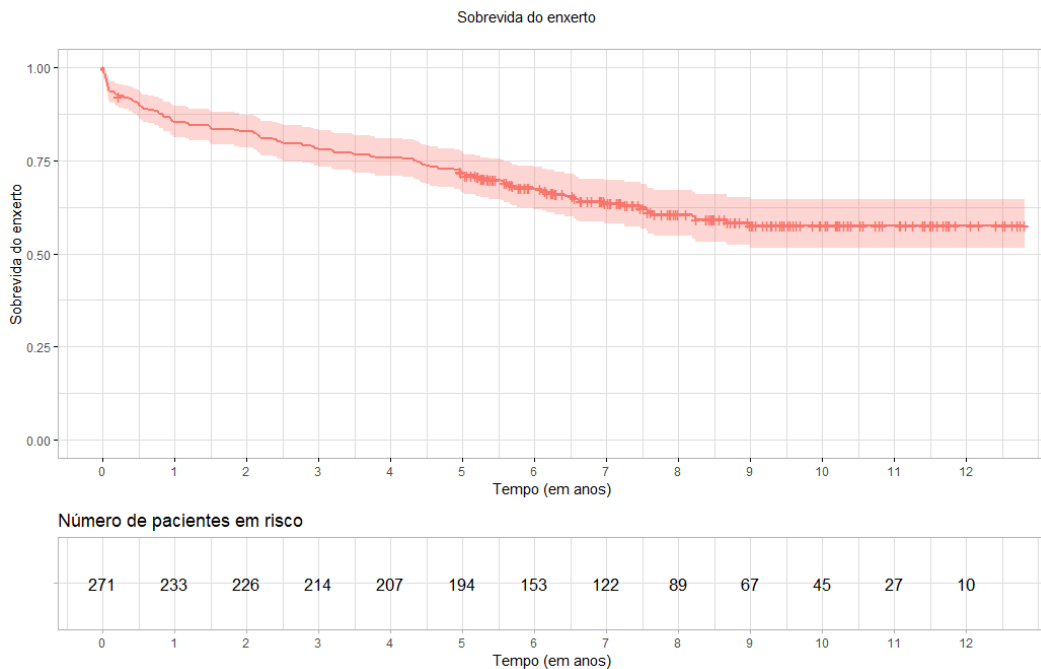


Figura 6: Sobrevida estimada do enxerto dos pacientes em estudo

4.7.3. Análises de fatores associados à probabilidade de menor sobrevida do enxerto

Foi realizada uma análise de risco, através do teste *log-rank* para se identificar variáveis associadas a uma probabilidade de menor sobrevida do enxerto nos tempos de 1, 3 e 5 anos de seguimento pós-transplante. Foram observados que alguns fatores presentes no pré-transplante apresentavam impacto na sobrevida do enxerto, assim como alguns achados histológicos e imunopatológicos nas biópsias protocolares.

4.7.3.1. Dados clínicos

Dentre as variáveis demográficas do pré-transplante, o número de transplantes prévios e a realização prévia de transfusão sanguínea tiveram um efeito de reduzir a sobrevida do enxerto, sendo que apenas a realização prévia de transfusão sanguínea atingiu significância estatística. A probabilidade estimada de sobrevida do enxerto em 1 ano, 3 anos e 5 anos foi de 79%, 69% e 64%, respectivamente, para os pacientes com 2 ou mais transplantes, em comparação com a probabilidade de 87%, 81% e 74%, respectivamente, para os pacientes que estavam em seu primeiro transplante ($p=0,07$), figura 7. Da mesma forma, a probabilidade estimada de sobrevida do enxerto em 1, 3 e 5 anos foi de 84%, 77% e 69%, respectivamente, para os pacientes que já haviam realizado transfusão sanguínea previamente, em comparação a probabilidade de 89%, 82% e 77%, respectivamente, para aqueles que nunca haviam realizado transfusão sanguínea ($p=0,02$), figura 8.

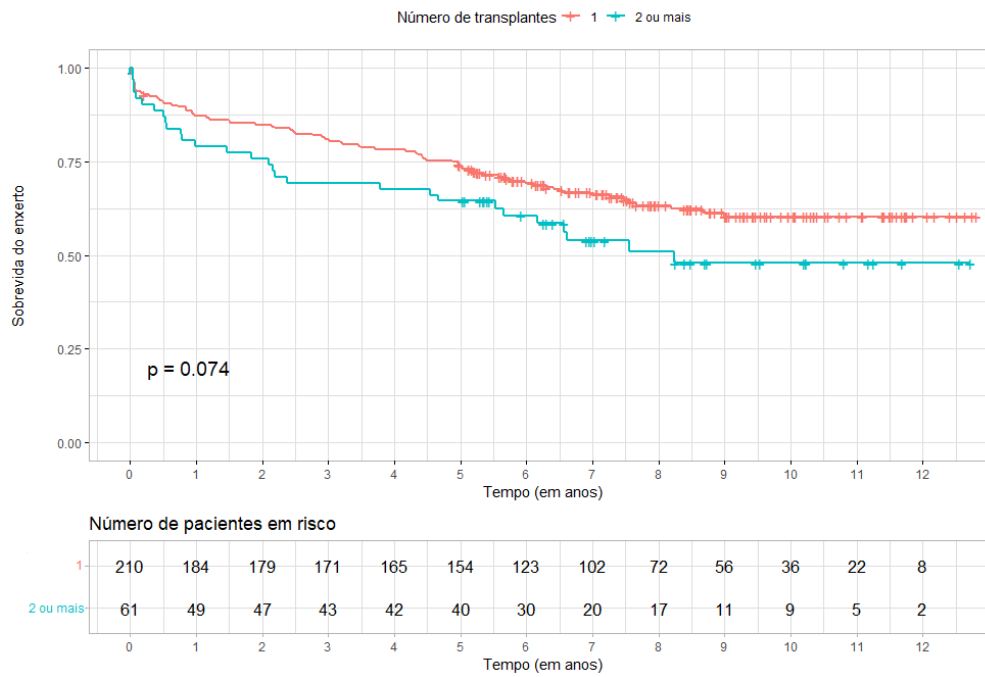


Figura 7: Probabilidade estimada de sobrevivência do enxerto de acordo com o número de transplantes

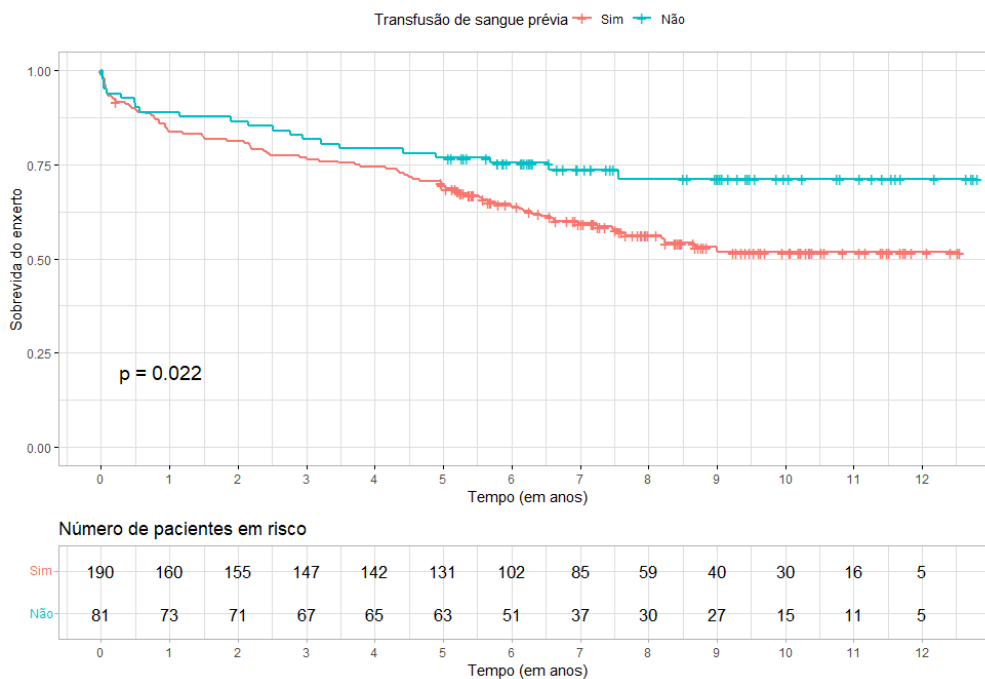


Figura 8: Probabilidade estimada de sobrevivência do enxerto de acordo com a realização prévia de transfusão sanguínea

O tipo de doador também foi uma variável com impacto na sobrevivência do enxerto. Os pacientes com doador falecido tiveram uma probabilidade estimada de sobrevivência do enxerto em 1 ano, 3 anos e 5 anos de 82%, 74% e 67%, respectivamente, enquanto os pacientes que tiveram doador vivo apresentaram uma probabilidade de 97%, 92% e 86%, respectivamente ($p < 0,001$), figura 9.

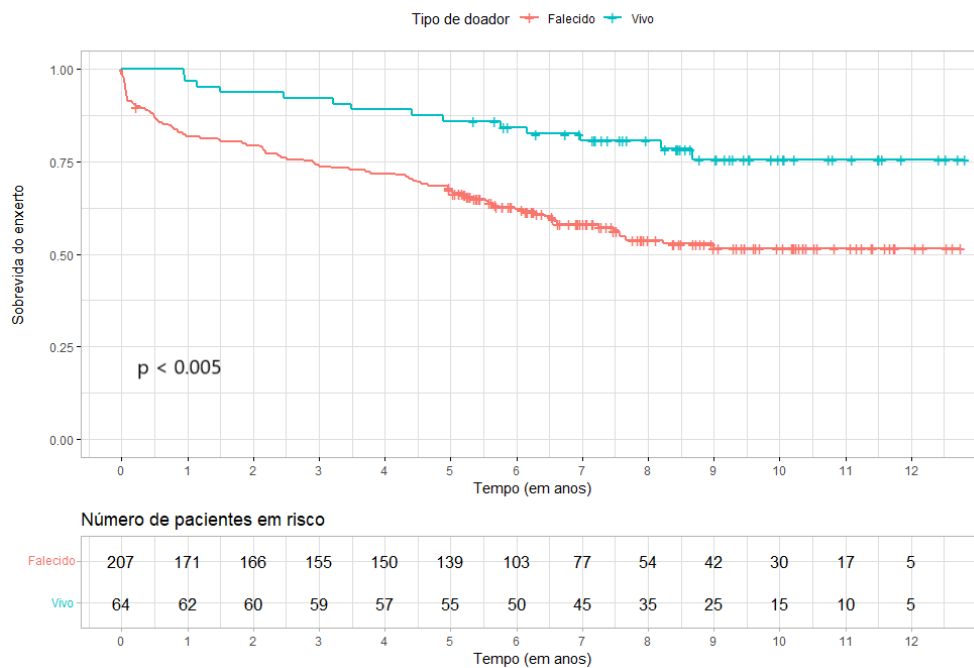


Figura 9: Probabilidade estimada de sobrevivência do enxerto de acordo com o tipo de doador

4.7.3.2. Dados histológicos

Em relação aos achados histológicos da biópsia protocolar, apenas a presença de ABMR demonstrou um efeito de reduzir a sobrevida do enxerto. A probabilidade estimada de sobrevida do enxerto em 1 ano, 3 anos e 5 anos foi de 78%, 61% e 43%, respectivamente, para os pacientes que apresentaram ABMR na biópsia protocolar, em comparação com 86%, 80% e 75%, respectivamente, para os pacientes com biópsia normal ou apenas com NTA como achado histológico ($p=0,01$), figura 10. O outro achado histológico de interesse no estudo, inflamação microvascular, observado pela presença de glomerulite e/ou pericapilarite isoladamente não mostrou significância estatística para a probabilidade de redução da sobrevida do enxerto. A probabilidade estimada de sobrevida do enxerto em 1, 3 e 5 anos foi de 86%, 84% e 76%, respectivamente para os pacientes com esse achado na biópsia protocolar, em comparação com 86%, 80% e 75%, respectivamente, para os pacientes com biópsia protocolar normal ou apenas achado de NTA ($p=0,46$), figura 11.

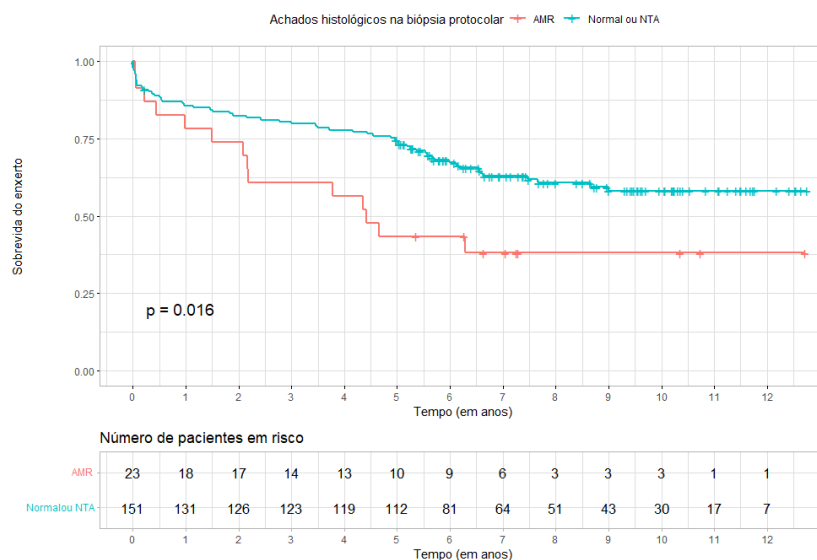


Figura 10: Probabilidade estimada de sobrevida do enxerto de acordo com o achado histológico de ABMR na biópsia protocolar

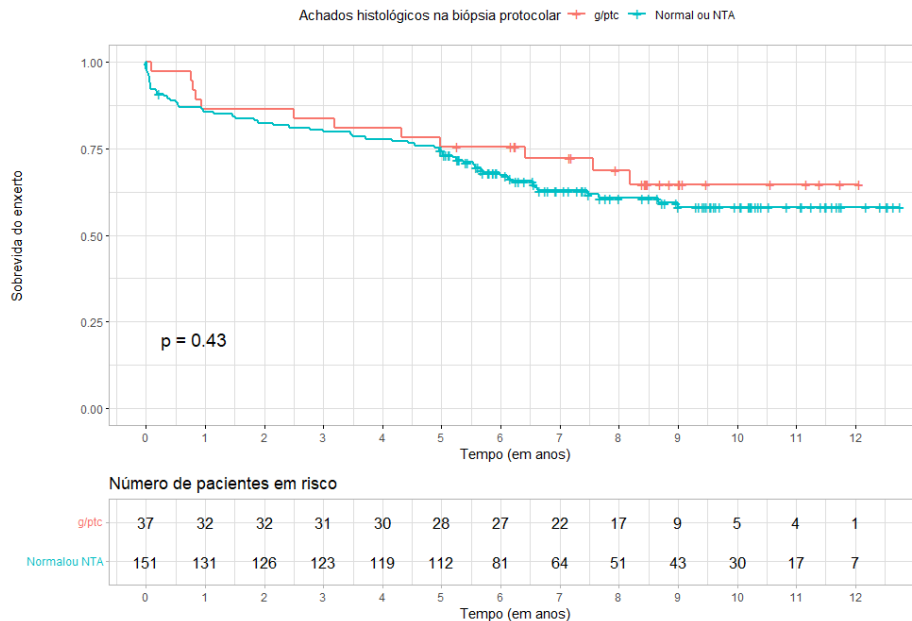


Figura 11: Probabilidade estimada de sobrevida do enxerto de acordo com o achado histológico de g/ptc na biópsia protocolar

4.7.3.3. Dados imunológicos e imunopatológicos

Finalmente, algumas variáveis imunológicas e imunopatológicas tiveram associação com a redução da sobrevida do enxerto. Apesar de não ter atingido significância estatística, percebeu-se uma tendência a uma probabilidade de sobrevida do enxerto menor para os pacientes com DSA positivo pré-transplante. A probabilidade estimada de sobrevida do enxerto para esses pacientes em 1 ano, 3 anos e 5 anos foi de 82%, 73% e 66%, respectivamente, enquanto aqueles pacientes com DSA negativo pré-transplante apresentaram probabilidades de 88%, 82% e 76%, respectivamente ($p=0,17$), figura 12.

Por outro lado, a presença de C4d positivo na biópsia protocolar foi um fator associado à redução da sobrevida do enxerto de forma estatisticamente significativa. A probabilidade estimada de sobrevida do enxerto em 1, 3 e 5 anos foi de 77%, 64% e 55%, respectivamente, para os pacientes com C4d

positivo na biópsia protocolar, enquanto foi de 87%, 81% e 74%, respectivamente, para os pacientes com C4d negativo ($p=0,004$), figura 13.

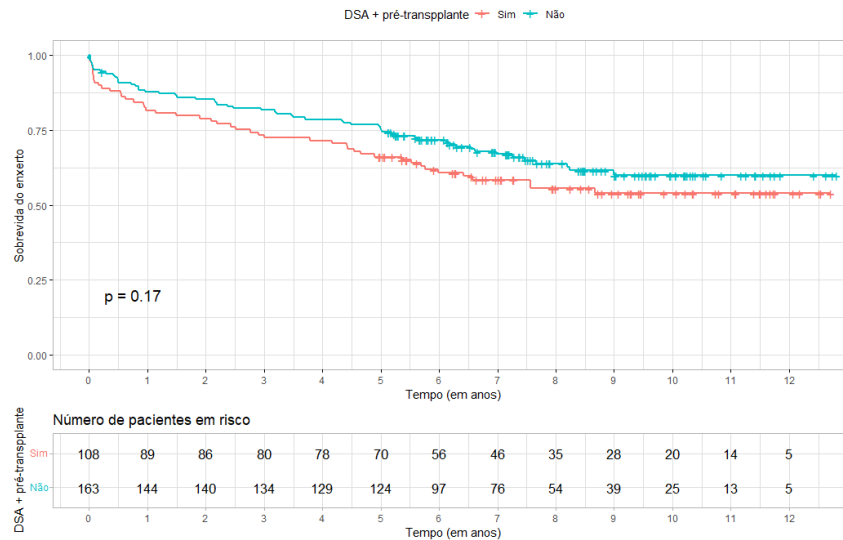


Figura 12: Probabilidade estimada de sobrevida do enxerto de acordo com a presença de DSA positivo pré-transplante

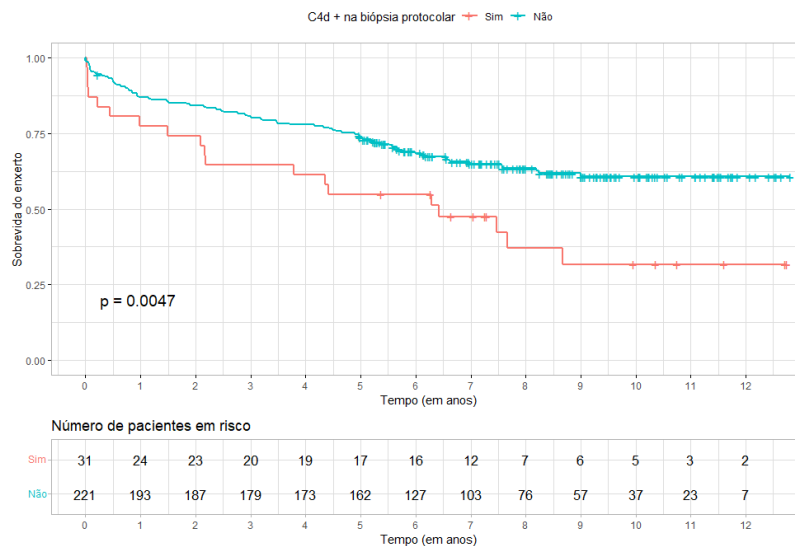


Figura 13: Probabilidade estimada de sobrevida do enxerto de acordo com a presença de C4d positivo na biópsia protocolar

Todos os resultados relacionados às probabilidades estimadas de sobrevida do enxerto de acordo com as covariáveis estudadas podem ser observados na tabela 17.

Tabela 17: Probabilidades estimadas de sobrevida do enxerto em 1 ano, 3 anos e 5 anos e respectivos intervalos de confiança de 95%, de acordo com covariáveis selecionadas

	Probabilidade de sobrevida estimada do enxerto (IC 95%)			p-valor
	1 ano	3 anos	5 anos	
Dados demográficos do receptor				
Número de transplantes				
1	0.87 (0.829; 0.919)	0.81 (0.760; 0.865)	0.74 (0.683; 0.801)	0,074
2 ou mais	0.79 (0.695; 0.898)	0.69 (0.588 ;0.818)	0.64 (0.536 ;0.776)	
Transfusão de sangue				
Sim	0.84 (0.788; 0.892)	0.77 (0.713; 0.832)	0.70 (0.634; 0.765)	0,022
Não	0.89 (0.825; 0.961)	0.82 (0.738; 0.905)	0.77 (0.682; 0.865)	
Dados do doador				
Tipo do doador				<0,001
Falecido	0.82 (0.768; 0.873)	0.74 (0.685; 0.804)	0.67 (0.614; 0.742)	
Vivo	0.97 (0.927; 1.000)	0.92 (0.858; 0.990)	0.86 (0.778; 0.949)	
Achados histológicos na biópsia protocolar				
ABMR				
Sim	0.78 (0.631; 0.971)	0.61 (0.439; 0.845)	0.43 (0.273; 0.693)	0,016
Outros (Normal ou NTA)	0.86 (0.803; 0.914)	0.80 (0.744; 0.870)	0.75 (0.680; 0.818)	
g/ptc				
Sim	0.86 (0.761; 0.982)	0.84 (0.727; 0.965)	0.76 (0.630; 0.908)	0,46
Outros (Normal ou NTA)	0.86 (0.803; 0.914)	0.80 (0.744; 0.870)	0.75 (0.680; 0.818)	
Dados imunopatológicos				
DSA positivo pré - transplante				
Sim	0.82 (0.747; 0.893)	0.73 (0.656 ;0.822)	0.66 (0.577; 0.756)	0,17
Não	0.88 (0.830; 0.930)	0.82 (0.760; 0.879)	0.76 (0.693; 0.825)	
C4d positivo na biópsia protocolar				
Sim	0.77 (0.640; 0.936)	0.64 (0.497; 0.838)	0.55 (0.398; 0.755)	0,004
Não	0.87 (0.826; 0.915)	0.81 (0.756; 0.860)	0.74 (0.683; 0.799)	

ABMR: rejeição mediada por anticorpos

NTA: necrose tubular aguda

g: glomerulite

ptc: pericapilarite

4.7.4. Análises das frequências e causas de óbito na coorte

Durante o período de acompanhamento foram observados 118 óbitos (36%) contra 206 casos para os quais o óbito não foi observado (64%), em

um total de 324 participantes do estudo, o que pode ser observado na tabela 18. A média de seguimento desses pacientes foi de 7 anos e a mediana foi de 7,4 anos.

Tabela 18: Frequência absoluta e percentuais de óbitos durante o período de acompanhamento (N=324)

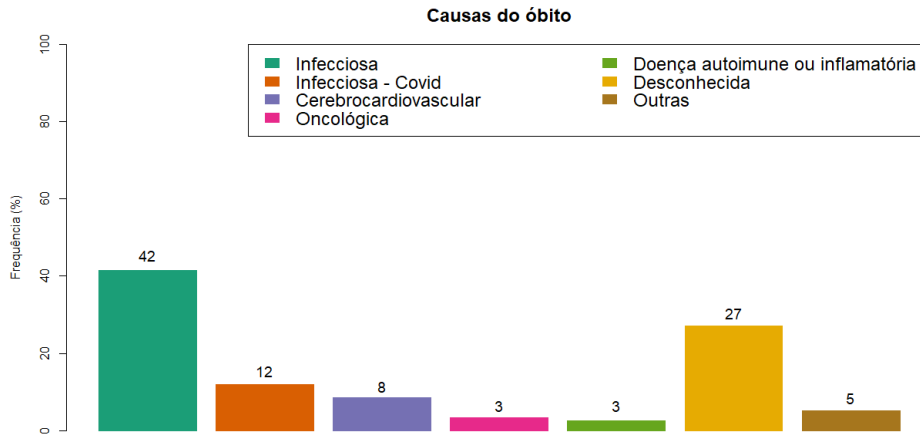
Óbitos durante o acompanhamento	Frequência (%)
Sim	118 (36)
Não	206 (64)
Total	324 (100)

Para os casos de óbito, a maior parte das mortes foi decorrente de causas infecciosas (42%), seguida por causas desconhecidas (27%), infecciosa COVID-19 (12%), cerebrocardiovascular (8%), outras causas (5%), oncológica (4%) e doença autoimune ou inflamatória (3%). A distribuição das causas de óbito dessa coorte pode ser vista na tabela 19 e gráfico 12.

Tabela 19: Frequência absoluta e percentuais de causas de óbito na coorte observada (N=118)

Causas do óbito	Frequência (%)
Infecciosa	49 (42)
Infecciosa COVID-19	14 (12)
Cerebrocardiovascular	10 (8)
Oncológica	4 (4)
Doença autoimune ou inflamatória	3 (3)
Desconhecida	32 (27)
Outras	6 (5)
Total	118 (100)

Gráfico 12: Distribuição percentual das causas de óbito (N=118)



4.7.5. Análises de sobrevida do paciente em 1, 3 e 5 anos de acompanhamento

A probabilidade de sobrevida dos pacientes, assim como a do enxerto, foi decrescente com o passar dos anos de acompanhamento. Em 1 ano foi de 93%, em 3 anos, foi de 85% e em 5 anos, foi de 78%, conforme pode ser observado na tabela 20 e na figura 14.

Tabela 20: Probabilidade de sobrevida dos pacientes em 1 ano, 3 anos e 5 anos e respectivos intervalos de confiança de 95%

Probabilidade de sobrevida estimada do paciente (IC 95%)		
1 ano	3 anos	5 anos
0.93 (0.898; 0.955)	0.85 (0.817; 0.894)	0.78 (0.734; 0.824)

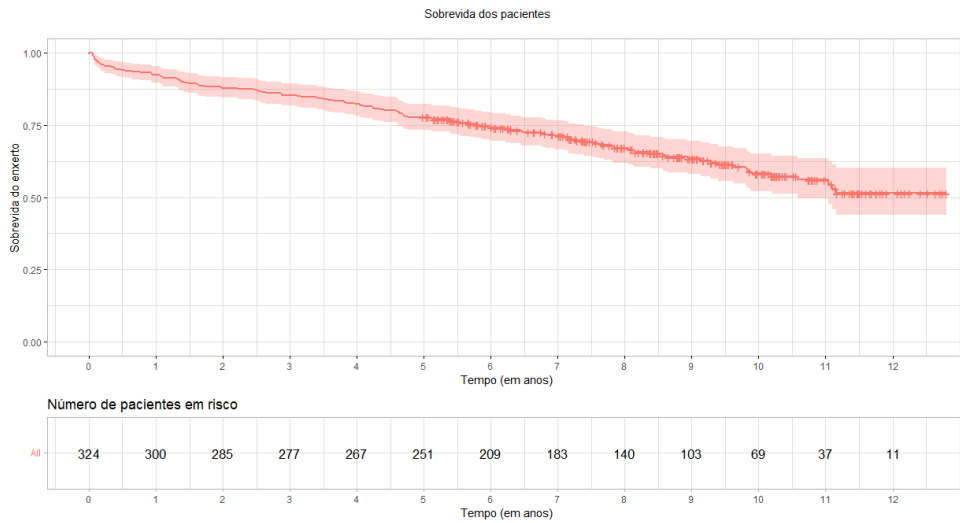


Figura 14: Sobrevida estimada dos pacientes do estudo

4.7.6. Análises de fatores associados à probabilidade de menor sobrevida do paciente

4.7.6.1. Dados clínicos

Em relação aos fatores associados a uma probabilidade estimada de menor sobrevida do paciente, os mesmos fatores demográficos, histológicos e imunológicos foram avaliados. Dentre os fatores demográficos do pré-transplante, apenas o tipo de doador demonstrou ter efeito sobre a sobrevida do paciente. A probabilidade estimada de sobrevida do paciente em 1 ano, 3 anos e 5 anos foi de 92%, 84% e 75%, respectivamente, para os pacientes que tiveram doador falecido, em comparação à probabilidade de 93%, 89% e 87%, respectivamente, para os pacientes com doador vivo ($p=0,002$), figura 15.

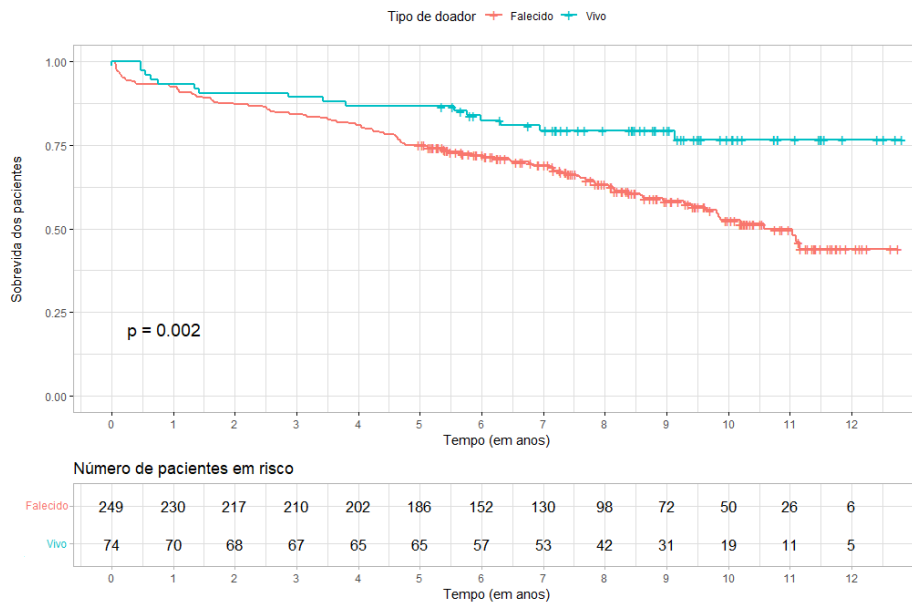


Figura 15: Probabilidade estimada de sobrevida do paciente de acordo com o tipo de doador

4.7.6.2. Dados histológicos

Em relação aos achados histológicos na biópsia protocolar, a presença de ABMR também teve efeito na sobrevida do paciente. A probabilidade estimada de sobrevida do paciente em 1 ano, 3 anos e 5 anos foi de 94%, 73% e 64%, respectivamente, para os pacientes com esse achado histológico na biópsia protocolar, em comparação com a probabilidade de 92%, 84% e 75%, respectivamente, para os pacientes com biópsia protocolar normal ou apenas com achado de NTA ($p=0,05$), figura 16.

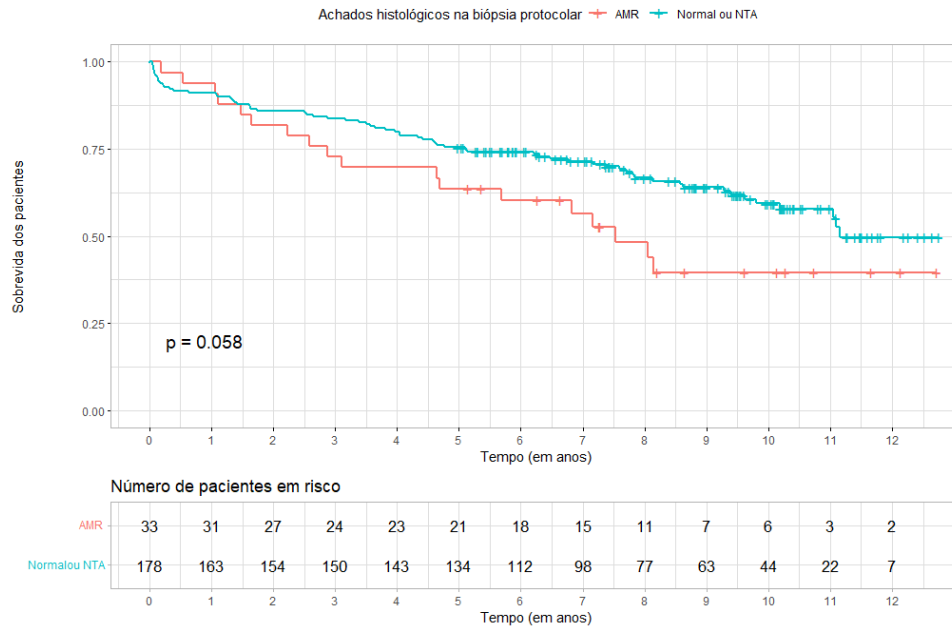


Figura 16: Probabilidade estimada de sobrevivência do paciente de acordo com o achado histológico de ABMR na biópsia protocolar

4.7.6.3. Dados imunológicos

Em relação às variáveis imunológicas, a probabilidade estimada de sobrevivência do paciente em 1 ano, 3 anos e 5 anos foi de 92%, 83% e 72%, respectivamente, para os pacientes com DSA positivo pré-transplante, em comparação à probabilidade de 93%, 87% e 82%, respectivamente, para os pacientes com DSA negativo pré-transplante ($p=0,05$), figura 17.

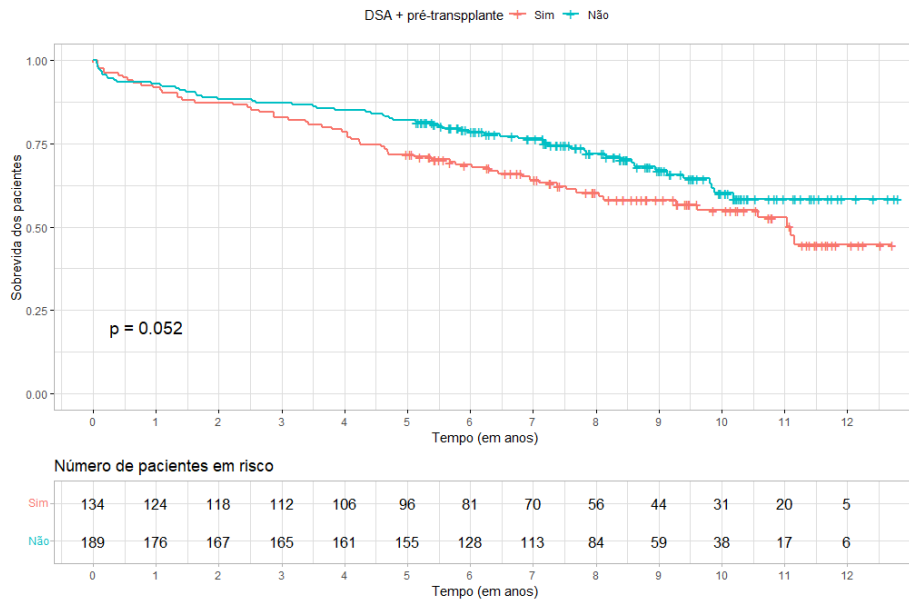


Figura 17: Probabilidade estimada de sobrevivência do paciente de acordo com a presença de DSA pré-transplante positivo

Todos os resultados relacionados às probabilidades estimadas de sobrevivência do paciente de acordo com as covariáveis estudadas podem ser observados na tabela 21.

Tabela 21: Sobrevidas dos pacientes transplantados estimadas em 1 ano, 3 anos e 5 anos e respectivos intervalos de confiança de 95%, de acordo com covariáveis selecionadas

	Sobrevida estimada (IC 95%)			p-valor
	1 ano	3 anos	5 anos	
Dados demográficos do receptor				
Primeiro transplante				
Sim	0.92 (0.890; 0.955)	0.84 (0.796; 0.886)	0.75 (0.699; 0.805)	0,069
Não	0.94 (0.887; 0.999)	0.91 (0.847; 0.982)	0.88 (0.809; 0.962)	
Número de transplantes				
1	0.92 (0.889; 0.955)	0.84 (0.795; 0.886)	0.75 (0.702; 0.808)	0,100
2 ou mais	0.94 (0.888; 0.999)	0.91 (0.849; 0.982)	0.87 (0.794; 0.953)	
Transfusão de sangue				
Sim	0.92 (0.882; 0.954)	0.85 (0.803; 0.896)	0.77 (0.717; 0.826)	0,210
Não	0.95 (0.903; 0.993)	0.87 (0.807; 0.942)	0.80 (0.721; 0.883)	
Dados do doador				
Tipo do doador				
Falecido	0.92 (0.891; 0.957)	0.84 (0.799; 0.890)	0.75 (0.699; 0.807)	0,002
Vivo	0.93 (0.879; 0.992)	0.89 (0.826; 0.966)	0.87 (0.793; 0.947)	
Achados histológicos na biópsia protocolar				
ABMR				
Sim	0.94 (0.861; 1.000)	0.73 (0.590; 0.896)	0.64 (0.492; 0.824)	0,058
Outros (Normal ou NTA)	0.91 (0.870; 0.953)	0.838 (0.786; 0.894)	0.75 (0.694; 0.820)	
g/ptc				
Sim	0.96 (0.897; 1.000)	0.93 (0.863; 1.000)	0.82 (0.718; 0.942)	0,85
Outros (Normal ou NTA)	0.91 (0.870; 0.953)	0.84 (0.786; 0.894)	0.75 (0.694; 0.820)	
Dados imunopatológicos				
DSA positivo pré - transplante				
Sim	0.92 (0.874; 0.966)	0.83 (0.769; 0.896)	0.72 (0.647; 0.799)	0,052
Não	0.93 (0.896; 0.968)	0.87 (0.827; 0.922)	0.82 (0.767; 0.877)	
C4d positivo na biópsia protocolar				
Sim	0.93 (0.854; 1.000)	0.76 (0.643; 0.902)	0.69 (0.564; 0.845)	0,69
Não	0.94 (0.917; 0.973)	0.90 (0.866; 0.939)	0.82 (0.773; 0.868)	

ABMR: rejeição mediada por anticorpos

NTA: necrose tubular aguda

g: glomerulite

ptc: pericapilarite

DSA: donor specific antibodies

Segunda parte do estudo

Observamos que alguns pacientes apresentavam achados histológicos incipientes de lesão mediada por anticorpo na biópsia protocolar, porém tais achados não preenchiam todos os critérios para o diagnóstico de ABMR, porém apresentavam ABMR na biópsia por indicação, como pode ser observado na tabela 22. Tais pacientes foram divididos em subgrupos conforme critérios abaixo e comparados quanto ao desfecho de função renal e sobrevida do enxerto,

Critérios para definição dos subgrupos de interesse:

- **Grupo Controle:** Pacientes que nunca desenvolveram nenhum sinal de atividade humoral na biópsia protocolar e nem evoluíram para rejeição na biópsia por indicação – Normal/DSA-/C4d-; NTA/DSA-/C4d; G+Ptc<2/ DSA-/C4d- (n=94)
- **Grupo ABMR:** Pacientes que fechavam critério Banff para diagnóstico de ABMR na biópsia protocolar e também evoluíram com rejeição na biópsia por indicação (n=37)
- **Antibody activity sem diagnóstico de ABMR** – Pacientes com achados histológicos incipientes que não fechavam critério para ABMR na biópsia protocolar, porém apresentavam atividade humoral e evoluíram para rejeição na biópsia por indicação - G+Ptc<2/DSA+, G+Ptc<2/C4d+, NTA/DSA+, NTA/C4d+ (n=27)

Tabela 22: Frequência de rejeição na biópsia por indicação segundo subgrupos, C4d e DSA pré-transplante na biópsia protocolar.

Achado histológico na biópsia protocolar	Total por subgrupo, n (%)	DSA pré-transplante / C4d na biópsia protocolar	Evolução dos achados histológicos na biópsia por indicação		
			AMR n (%)	TCMR n (%)	Sem rejeição n (%)
NTA	86 (100)	DSA-/C4d-	3 (4)	9 (10)	74 (86)
	5 (100)	DSA-/C4d+	2 (40)	0 (0)	3 (60)
	46 (100)	DSA+/C4d-	8 (17)	7 (15)	31 (68)
	2 (100)	DSA+/C4d+	2 (100)	0 (0)	0 (0)
	139 (100)	Total, N (%)	15(11)	16(12)	108(77)
G+Ptc<2	26 (100)	DSA-/C4d-	1 (4)	11 (42)	14 (54)
	0 (0)	DSA-/C4d+	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	12 (100)	DSA+/C4d-	4 (33)	3 (25)	5 (41)
	1 (100)	DSA+/C4d+	1 (100)	0 (0)	0 (0)
	39 (100)	Total, N (%)	6 (15)	14 (36)	19 (49)
ABMR	0 (0)	DSA-/C4d-	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	8 (21)	DSA-/C4d+	8 (21)	0 (0)	0 (0)
	6 (15)	DSA+/C4d-	5 (13)	1 (2)	0 (0)
	25 (64)	DSA+/C4d+	23 (59)	0 (0)	2 (5)
	39 (100)	Total, N (%)	36 (93)	1 (2)	2 (5)

NTA: necrose tubular aguda; G/ptc: glomerulite/pericapilarite; ABMR: rejeição mediada por anticorpos

Percebemos que a presença de DSA pré-transplante nesses pacientes com lesões histológicas incipientes na biópsia protocolar estava associada a uma aceleração da perda de TFGe ao longo do tempo, o que pode ser visualizado na figura 18. Os pacientes com presença de DSA pré-transplante também apresentavam evolução com mais rejeição na biópsia por indicação, seja no grupo com NTA, seja naqueles com G/Ptc na biópsia protocolar.

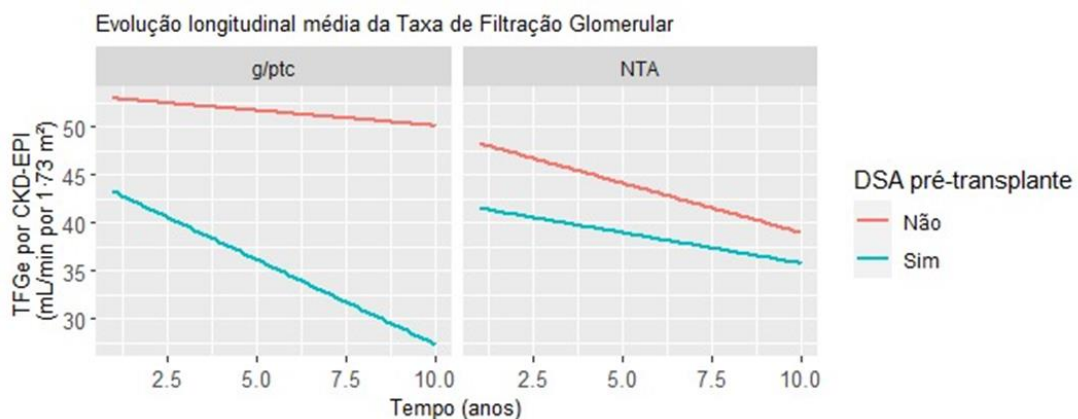


Figura 18: Correlação entre a presença de DSA pré-transplante e a intensidade de perda da TFGe em pacientes que não fecham critério para ABMR na biópsia protocolar.

Na comparação entre os três grupos de interesse, observou-se que o grupo *AB activity* teve comportamento semelhante ao grupo ABMR em relação ao declínio progressivo da TFGe ao longo de 5 anos de acompanhamento, com significância estatística em relação ao grupo controle, conforme pode ser observado nas tabelas 23 e 24. Esses resultados também podem ser visualizados no gráfico 13.

Tabela 23: TFGe nos grupos *AB activity*, ABMR e Controle em 1, 3 e 5 anos de acompanhamento.

TFGe (CKD-EPI, mL/min per 1.73 m ²)	Grupos (N = 158)			p-valor
	<i>AB activity</i>	ABMR	Controle	
N (%)	27 (17)	37 (24)	94 (59)	-
1 ano, média (DP)	35,0 (20,6)	36,6 (21,7)	51,5 (24,1)	0,0005
3 anos, média (DP)	34,9 (16,9)	37,0 (24,1)	50,9 (25,6)	0,005
5 anos, média (DP)	30,7 (17,6)	35,8 (21,55)	49,9 (27,4)	0,010

AB activity: atividade mediada por anticorpos; ABMR: rejeição mediada por anticorpos

Tabela 24: Comparação pós-hoc da TFGe entre os grupos *AB activity*, ABMR e Controle em 1, 3 e 5 anos de acompanhamento.

	Grupos		
TFGe (CKD-EPI, mL/min per 1.73 m ²)	<i>AB activity</i>	Controle	p-valor
1 ano, média (DP)	35,0 (20,6)	51,5 (24,1)	0,0038
3 anos, média (DP)	34,9 (16,9)	50,9 (25,6)	0,0077
5 anos, média (DP)	30,7 (17,6)	49,9 (27,4)	0,0066
	Grupos		
TFGe (CKD-EPI, mL/min per 1.73 m ²)	ABMR	Controle	p-valor
1 ano, média (DP)	36,6 (21,7)	51,5 (24,1)	0,0014
3 anos, média (DP)	37,0 (24,1)	50,9 (25,6)	0,0170
5 anos, média (DP)	35,8 (21,55)	49,9 (27,4)	0,0732
	Grupos		
TFGe (CKD-EPI, mL/min per 1.73 m ²)	<i>AB activity</i>	ABMR	p-valor
1 ano, média (DP)	35,0 (20,6)	36,6 (21,7)	0,96
3 anos, média (DP)	34,9 (16,9)	37,0 (24,1)	0,79
5 anos, média (DP)	30,7 (17,6)	35,8 (21,55)	0,49

AB activity: atividade mediada por anticorpos; **ABMR**: rejeição mediada por anticorpos

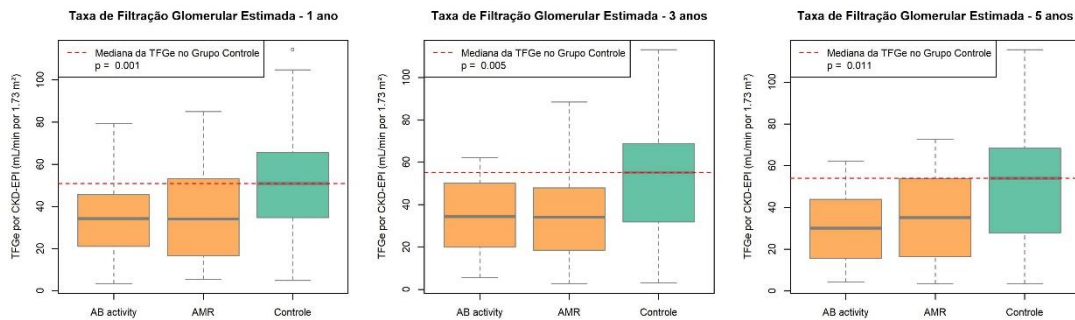


Gráfico 13: Box-plot de comparação da TFGe entre os grupos de interesse em 1, 3 e 5 anos de acompanhamento.

Em uma análise multivariada dos subgrupos de interesse que não fechavam critério para ABMR na biópsia protocolar, porém que evoluíram com rejeição na biópsia por indicação (grupo *AB activity*), a presença de DSA pré-transplante ou de C4d positivo em pacientes com NTA ou glomerulite e/ou pericapilarite na biópsia protocolar foi um fator preditivo significativo para a perda de TFGe quando comparado ao grupo controle. O declínio de TFGe foi de 15,38 mL/min/1,73 m² (95% CI: -26,46 – -4,30, p= 0,007) em 1 ano, de 14,93 mL/min/1,73 m² (95% CI: -26,69 – -3,18, p= 0,013) em 3 anos, e de 17,24 mL/min/1,73 m² (95% CI: -31,24 – -3,23, p= 0,017) em 5 anos, como pode ser observado na tabela 25. Outros fatores, incluindo o número de transplantes, história de transfusão sanguínea e doador falecido não se mostraram estatisticamente significativo na redução da função renal ao longo do acompanhamento, com exceção da variável doador falecido que alcançou significância estatística no terceiro ano de acompanhamento. A TFGe do grupo controle representa uma estimativa de função renal dos pacientes quando tais fatores não estavam presentes.

Tabela 25: Variáveis associadas com o declínio da TFGe em 1 ano, 3 anos e 5 anos em uma análise multivariada do subgrupo de pacientes com NTA ou glomerulite e/ou pericapilarite que não fecharam critério para ABMR na biópsia protocolar.

TFGe (CKD-EPI, mL/min per 1.73 m ²) - 1 ano			
Variáveis	Estimativa	95% IC	P-valor
Controle	60.61	45.47 – 75.75	<0.001
DSA pré-transplante ou C4d positivo na BP	-15.38	-26.46 – -4.30	0.007
Número de transplantes – 2 ou mais	-0.54	-12.10 – 11.02	0.926
Transfusão sanguínea - <i>sim</i>	2.76	-6.77 – 12.29	0.567
Tipo de doador - falecido	-12.40	-26.73 – 1.93	0.089
TFGe (CKD-EPI, mL/min per 1.73 m ²) - 3 anos			
Variáveis	Estimativa	95% IC	P-valor
Controle	67.58	49.87 – 85.29	<0.001
DSA pré-transplante ou C4d positivo na BP	-14.93	-26.69 – -3.18	0.013
Número de transplantes – 2 ou mais	0.25	-12.61 – 13.11	0.969
Transfusão sanguínea - <i>sim</i>	-0.09	-10.44 – 10.26	0.986
Tipo de doador - falecido	-18.67	-35.33 – -2.00	0.029
TFGe (CKD-EPI, mL/min per 1.73 m ²) - 5 anos			
Variáveis	Estimativa	95% IC	P-valor
Controle	68.86	48.49 – 89.23	<0.001
DSA pré-transplante ou C4d positivo na BP	-17.24	-31.24 – -3.23	0.017
Número de transplantes – 2 ou mais	-2.86	-18.56 – 12.84	0.717
Transfusão sanguínea - <i>sim</i>	-4.53	-17.50 – 8.45	0.488
Tipo de doador - falecido	-18.15	-37.20 – 0.91	0.062

DSA: donor specific antibodies

Em relação à comparação da sobrevida do enxerto entre os subgrupos de interesse, observa-se uma propabilidade estimada de sobrevida do enxerto significativamente menor para os grupos *AB activity* e ABMR em comparação ao grupo controle ao longo de 1, 3 e 5 anos de acompanhamento. No longo-prazo, os pacientes do grupo ABMR tiveram probabilidade de sobrevida do enxerto de 54% em 5 anos, o grupo *AB activity* teve probabilidade de sobrevida do enxerto de 63%, enquanto o grupo controle teve probabilidade de sobrevida de 81% no mesmo período ($p=0,007$). Esses resultados podem ser vistos na tabela 26. As curvas da figura 19 demonstram uma sobrevida do

enxerto significativamente menor para os grupos *AB activity* e ABMR em comparação ao grupo controle (p= 0,007).

Tabela 26: Probabilidade estimada de sobrevida do enxerto nos grupos *AB activity*, ABMR e Controle em 1, 3 e 5 anos de acompanhamento.

Grupos	Sobrevida estimada do enxerto (95% CI)			p-valor
	1 ano	3 anos	5 anos	
<i>AB activity</i>	0.77 (0.63-0.95)	0.74 (0.59-0.92)	0.63 (0.47-0.84)	0.007
ABMR	0.80 (0.68-0.94)	0.67 (0.53-0.85)	0.54 (0.39-0.74)	
Controle	0.91 (0.85-0.97)	0.87 (0.81-0.94)	0.81 (0.74-0.90)	

***AB activity*: atividade mediada por anticorpos; ABMR: rejeição mediada por anticorpos**

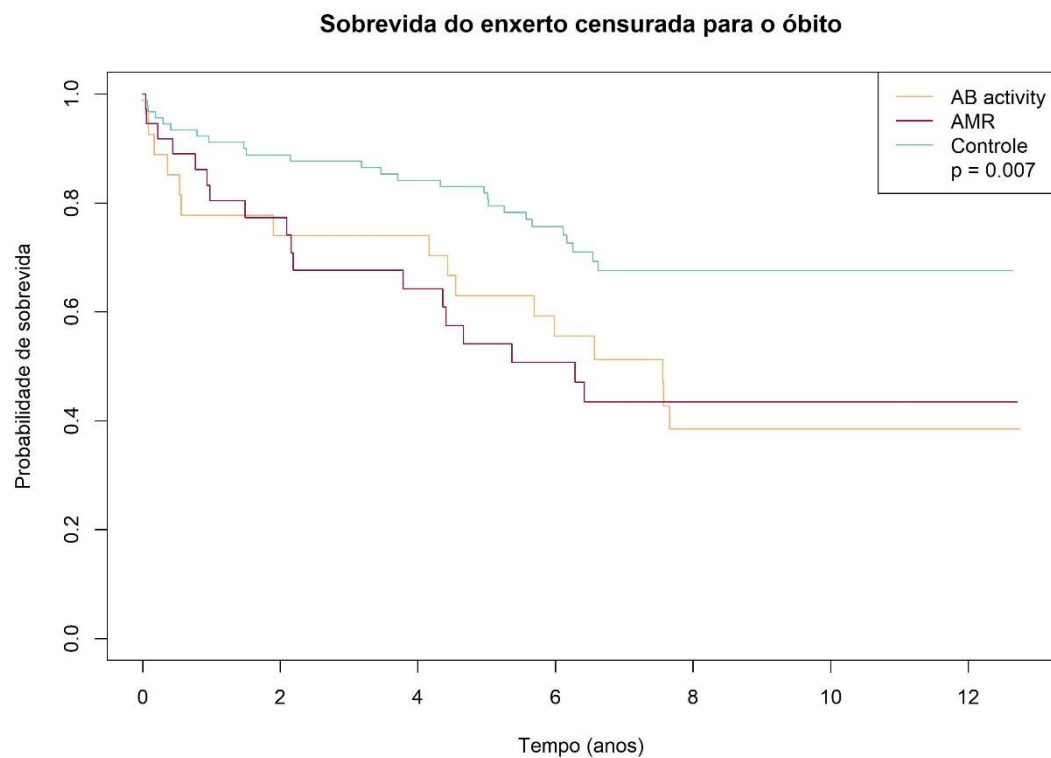


Figura 19: Curvas de sobrevida estimada do enxerto nos grupos *AB activity*, ABMR e Controle.

Em outra análise multivariada, foram identificados os fatores independentes que levaram a um aumento de risco para a perda do enxerto no grupo *AB activity* – pacientes com NTA ou glomerulite e/ou pericapilarite

como achado histológico na biópsia protocolar e presença de DSA pré-transplante e/ou C4d positivo – em comparação com o grupo controle. A atividade imunológica refletida pela presença de DSA pré-transplante ou de C4d positivo na biópsia protocolar nesse grupo de pacientes que não fechavam critério para diagnóstico de ABMR aumentou o risco de perda do enxerto em quase 2 vezes quando comparados ao grupo controle (HR: 1,99; 95% IC: 1,06-3,76, p: 0,03). De forma similar, o número de transplantes (2 ou mais) também aumentou o risco de perda do enxerto em 2 vezes nos pacientes do grupo *AB activity* em relação ao grupo controle (HR: 2,22; 95% CI: 1,16-4,22, p: 0,01). Esses resultados podem ser observados na tabela 27.

Tabela 27: Variáveis associadas a risco de perda do enxerto em uma análise multivariada nos subgrupos de interesse e grupo controle.

Variáveis	Hazard Ratio	IC 95%	P-valor
Presença de DSA pré-transplante ou C4d positivo na biópsia protocolar	1,99	1.06-3.76	0.03
Número de transplantes – 2 ou mais	2,22	1.16-4.22	0.01
História de transfusão sanguínea - sim	1,75	0.85-3.60	0.13
Tipo de doador - falecido	1,65	0.49-5.39	0.43

DSA: donor specific antibodies

Por fim, quando comparamos o MFI do DSA pré-transplante entre os grupos *AB activity* e ABMR, percebe-se uma tendência a maiores valores de MFI nos pacientes que tiveram diagnóstico de ABMR na biópsia protocolar em relação àqueles que não fecharam critério para esse diagnóstico, mas apresentavam atividade imunológica quando da biópsia (grupo *AB activity*), porém essa diferença não atingiu significância estatística (p: 0,3). Esse resultado pode ser visualizado na tabela 28 e no gráfico 14.

Tabela 28: Median Immunofluorescence Intensity (MFI) of pre-transplant DSA in AB activity and ABMR groups.

Grupos	Mínimo	Máximo	Mediana	Intervalo Inter-quartil	Média	DP	P-valor
AB activity	920	14600	3143	920-14600	4931	3870	
ABMR	1604	17509	5359	1604-17509	6511	4263	0,3

AB activity: atividade mediada por anticorpos; **ABMR:** rejeição mediada por anticorpos

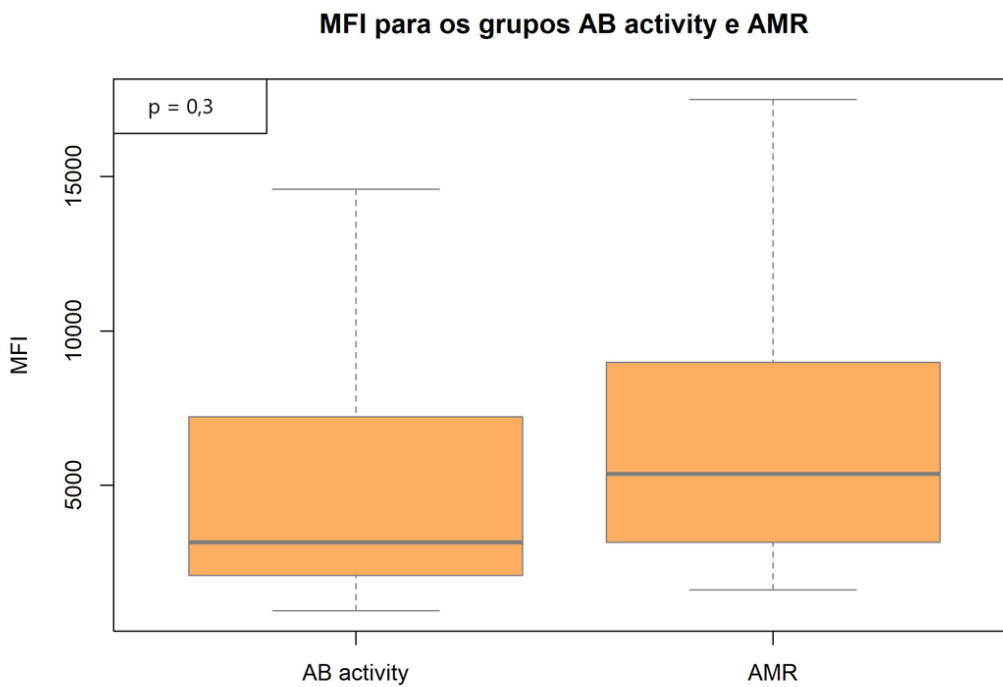


Gráfico 14: MFI do DSA pré-transplante dos pacientes dos grupos AB activity e ABMR

5. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços alcançados em relação aos desfechos de curto prazo do transplante renal, os receptores de transplantes renais continuam a apresentar falência tardia do enxerto e poucas mudanças relacionadas ao desfecho de longo prazo foram vistas nos últimos quinze anos^{5,6,25}. Pacientes previamente sensibilizados e que mantêm DSA positivo no pós-transplante, seja DSA preexistente, seja formado *de novo*, estão sob maior risco de desenvolverem rejeição mediada por anticorpos (ABMR) no curso do transplante renal^{9,10}.

Esse estudo tem como base uma coorte de pacientes sensibilizados e por isso com maior risco de ocorrência de ABMR. Mesmo tendo conhecimento de extensa literatura que comprova a associação entre características do doador e do procedimento de transplante com a função tardia, disfunção e falência do enxerto²⁶⁻³², pouco se sabe sobre o valor preditivo da apresentação histológica do enxerto renal em biópsias de vigilância realizadas precocemente no pós-transplante^{33,34}. Correlacionar os dados histológicos de biópsia precoce com os desfechos do transplante é o objetivo final desse estudo.

Lesões inflamatórias precoces e aloimunidade no transplante renal

Em seu estudo observacional de coorte de centro único, Van Loon E *et al* demonstraram que lesões inflamatórias estão frequentemente presentes em biópsias por indicação realizadas precocemente no pós-transplante. Além disso, tais lesões inflamatórias foram associadas muito mais a fatores aloimunes que a fatores não imunes como idade do doador, tipo de doador e tempo de isquemia fria³³. Apesar de estudos pré-clínicos evidenciarem que o tempo de isquemia fria induz uma resposta inflamatória através do mecanismo de lesão de isquemia e reperfusão, aumentando assim o risco para a ocorrência futura de rejeição do enxerto renal³⁵⁻³⁷, estudos clínicos não

conseguiram comprovar um efeito significativo da lesão do enxerto renal pelo mecanismo de isquemia e reperfusão na aparição de lesões inflamatórias em biópsias precoces do enxerto. Os mesmos estudos clínicos conseguiram demonstrar apenas uma associação entre os fatores pré-clínicos causadores da isquemia e reperfusão com a ocorrência de função retardada do enxerto^{33,38}.

Por outro lado, sabe-se que fatores relacionados à aloimunidade, como o número de incompatibilidades HLA e a presença de DSA pré-transplante são rotineiramente identificados como fatores de risco para a ocorrência de rejeição do enxerto renal, tanto mediada por células, como mediada por anticorpos⁷⁻⁹. Foi ainda demonstrado posteriormente que fatores aloimunes eram os maiores responsáveis pelas lesões histológicas inflamatórias em biópsias de enxerto renal nos primeiros 14 dias de pós-transplante³³. De forma semelhante, nosso estudo demonstrou que lesões inflamatórias são frequentes nas biópsias de vigilância precoce (biópsias protocolares), as quais são majoritariamente imuno-mediadas. A maior prevalência de NTA na biópsia protocolar, também presente na biópsia de tempo zero, e sua redução de frequência na biópsia por indicação clínica, sugere um papel importante da lesão renal por isquemia e reperfusão nesse período precoce de pós-transplante. Por outro lado, os achados frequentes de inflamação microvascular (glomerulite e/ou pericapilarite) e especialmente de rejeição mediada por anticorpos na biópsia protocolar nos mostram que o processo de imunoativação desencadeado por fatores aloimunes está presente de forma precoce no transplante renal, similarmente ao que foi demonstrado em estudo prévio³³.

Inflamação microvascular

A lesão histológica mediada pelos anticorpos anti-HLA específicos contra o doador (DSA) tem como alvo principalmente a microvasculatura e endotélio do enxerto renal. Frequentemente, a inflamação microvascular vem

acompanhada de inflamação túbulo-intersticial, e a presença dessas lesões inflamatórias é usada como preditor da perda futura da função do enxerto renal³⁹. O consórcio de Banff provê, desde 2001, uma classificação internacional para rejeição aguda/ativa mediada por anticorpos (RAMA ou AMR ou ABMR). Ao longo desses anos, os critérios de Banff foram sendo atualizados à luz de novos conhecimentos. Em 2013, dentre outras mudanças, a classificação Banff reconheceu a existência de ABMR com C4d negativo, o que ampliou a possibilidade desse diagnóstico nas biópsias de enxerto renal. Em 2017, seus critérios foram revisados de forma importante mais uma vez. Primeiramente, a evidência de inflamação microvascular isolada, excluindo-se a presença de rejeição mediada por células (RMC), alterações limítrofes ou ainda infecção, foi introduzida como critério morfológico para diagnóstico de ABMR. Em segundo lugar, o aumento da expressão de genes foi ampliado de apenas transcritos associados à injúria endotelial (do inglês ENDATs) para todos os genes validados relacionados à ABMR. Finalmente, a positividade do C4d e o aumento da expressão gênica associada à ABMR foram aceitos como substitutos para a presença de DSA como critério sorológico nos casos de DSA negativo. Entretanto, Callemeyn *J et al* demonstraram em seu estudo que a versão da classificação Banff de 2017 não contribuiu em relação à de 2013 para uma melhor estratificação de performance preditiva da sobrevida do enxerto renal⁴⁰. Nesse mesmo estudo, ficou demonstrado que os critérios diagnósticos para ABMR associados à pior sobrevida do enxerto eram a presença de DSA 3 meses após o transplante, e a gravidade da inflamação microvascular tanto nas biópsias protocolares de três meses, como nas de um ano pós-transplante. Por outro lado, o escore de C4d não teve significância estatística para predizer o prognóstico de sobrevida do enxerto renal⁴⁰. Discute-se que a eliminação da categoria *suspeita* de ABMR na revisão de 2017 possivelmente contribuiu para essa piora preditiva, ao simplificar em demasia a heterogeneidade clínica e histológica dessa condição⁴⁰. A classificação Banff foi então alterada na revisão de 2019 com o objetivo principal de fornecer dados prognósticos em relação ao grau de

atividade e cronicidade de lesões histológicas compatíveis com rejeição crônica mediada por anticorpos²⁴.

O achado histológico de inflamação microvascular tem sido indicado como um padrão frequente de lesão em pacientes com rejeição crônica mediada por anticorpos⁴¹⁻⁴³. Tsuji T *et al*, em seu estudo, avaliaram quais achados em biópsia protocolar precoce de enxerto renal eram preditores histopatológicos do desenvolvimento de rejeição crônica mediada por anticorpos. Na análise retrospectiva de sua coorte de 379 pacientes transplantados renais submetidos a biópsias protocolares, escores mais altos de g + ptc foram exibidos como achados histológicos do grupo de pacientes que desenvolveu rejeição crônica mediada por anticorpos⁴⁴. Loupy A *et al* já haviam demonstrado em seu estudo que a presença de inflamação microvascular e de DSA circulante nos pacientes transplantados renais submetidos à biópsia protocolar nos primeiros três meses pós-transplante constituíam fatores de risco para rejeição crônica mediada por anticorpos, independentemente do resultado do C4d²¹.

Halloran PF e colaboradores, ainda na década de 1990, reconheceram que as características centrais, associadas à rejeição aguda mediada por anticorpos, nos primeiros dias ou semanas do pós-transplante, eram fundamentadas na injúria endotelial da microvasculatura do enxerto renal. Entretanto a presença de anticorpos na microvasculatura só poderia ser demonstrada por imunofluorescência em uma minoria de casos^{45,46}. O espectro de alterações histopatológicas dos episódios precoces (média de onze dias após o transplante) de ABMR associados à presença de DSA foi reportado por Trpkov *et al* anos mais tarde. As características encontradas que mais distinguem a ABMR com DSA positivo da ABMR com DSA negativo eram: necrose arterial fibrinóide, marginação neutrofílica nos capilares peritubulares, e glomerulite aguda nos casos de DSA positivo. Por outro lado, tubulite linfocítica moderada a grave e arterite intimal leve foram alterações mais vistas nos casos de ABMR com DSA negativo⁴⁷. Entretanto, apesar

dessas alterações histológicas terem se mostrado úteis no diagnóstico de casos de rejeição mediada por anticorpos, nenhuma delas é específica da condição, podendo também ser encontradas em outros tipos de etiologias de lesão do enxerto renal em fase precoce do pós-transplante⁴⁸.

Ativação da via clássica da cascata de complemento

Em relação ao C4d à imunofluorescência (IF), sabe-se que episódios de ABMR podem ocorrer sem a ligação desse produto de clivagem da via clássica da cascata de complemento à microvasculatura renal^{16,40}. Outros estudos evidenciaram que a positividade para C3d, outro produto de clivagem do complemento, que também se liga de forma covalente ao tecido do enxerto renal, pode ser útil na identificação de casos particularmente agressivos de ABMR^{49,50}. Sund *et al* demonstraram a associação entre C3d positivo e gravidade da ABMR em sua coorte de biópsias protocolares de enxerto renal realizadas precocemente na primeira semana de pós-transplante⁴⁹. Já Kuypers *et al* comprovaram em seu estudo que os casos de ABMR com C3d positivo estavam associados à maior incidência de perda do enxerto no primeiro ano de transplante⁵⁰. Em estudo prévio do nosso centro, a pesquisa de C4d em biópsia de tempo zero, 1 hora pós-reperfusão do enxerto, não foi preditiva de ocorrência de ABMR em pacientes que tinham CDC-XM negativo⁵¹. Por outro lado, o estudo de Djamali A *et al* demonstrou que a positividade do C4d em biópsias pós-reperfusão do enxerto e um aumento precoce do DSA após o transplante são fatores de risco para rejeição em pacientes moderadamente sensibilizados⁵². Já em nosso estudo atual, a presença de C4d positivo na biópsia protocolar, dias após o transplante, teve associação com uma menor sobrevida do enxerto.

Avaliação prognóstica do transplante renal

Até recentemente, um sistema de estratificação prognóstica robusto e amplamente validado em diferentes populações para avaliação do risco de

falência do enxerto renal não estava disponível⁵³. Frente a essa necessidade não atendida, a qual permitiria uma melhor estratificação de pacientes transplantados renais entre diferentes grupos de risco para perda do enxerto e, dessa forma, guiar o seu manejo de forma mais individualizada, Loupy *et al* desenvolveram um escore de estratificação de risco em sua coorte prospectiva e multicêntrica, com validação externa, o qual pode ser utilizado para identificar pacientes com alto risco de perda futura do enxerto⁵⁴. Com o objetivo de otimizar a capacidade preditiva do prognóstico do enxerto renal, foram avaliados em conjunto parâmetros como a TFGe, proteinúria, histologia na biópsia do enxerto renal e os perfis de HLA, gerando um sistema prognóstico prático de estratificação de risco para avaliação da probabilidade futura de perda do enxerto⁵³. A avaliação de risco após o transplante renal foi conduzida no momento da realização da biópsia de enxerto, seja ela de vigilância protocolar ou por indicação clínica. Foram avaliados diferentes fatores como características demográficas, incluindo comorbidades dos receptores, idade, sexo e características do transplante renal, parâmetros biológicos como função renal, proteinúria e especificidades dos anticorpos anti-HLA circulantes e suas concentrações, além da análise histopatológica das biópsias de enxerto, incluindo os escores para as lesões elementares e seus diagnósticos histológicos de acordo com a classificação mais atual de Banff⁵³. As mesmas variáveis foram avaliadas individualmente em nosso estudo.

Estudos prévios demonstraram que os transplantes renais ficam essencialmente estáveis após recuperação do estresse relacionado à implantação do enxerto e injúria associada à isquemia e reperfusão, até o desenvolvimento de condições específicas, incluindo dentre elas a ABMR e a recorrência no enxerto de doenças renais⁵⁴⁻⁵⁹. A terapia imunossupressora falha em prevenir o desenvolvimento de DSA pós-transplante *de novo* e a ocorrência de ABMR⁴. Na predição de quais fatores aumentam o risco para a ocorrência futura de ABMR e perda do enxerto, atribuição de causalidade não é o mesmo que diagnóstico histológico por biópsia do enxerto. A atribuição de

causalidade envolve a combinação de todas as evidências – histológicas, imunológicas e clínicas – na decisão da melhor explicação para o curso clínico do transplante renal⁴.

Em um estudo prospectivo de seguimento de uma coorte de pacientes após biópsia por indicação, Einecke G *et al* demonstraram que enxertos renais diagnosticados com ABMR ou glomerulonefrite apresentam probabilidade mais alta de progressão para a falência do enxerto, entretanto muitos casos de ABMR são erroneamente classificados como lesão por toxicidade dos inibidores de calcineurina devido ao C4d negativo na biópsia⁶⁰. O diagnóstico histológico da biópsia de enxerto renal provavelmente tem uma relação complexa com a falência futura do enxerto, pois o diagnóstico de rejeição aguda celular sem positivação do DSA não prediz pior sobrevida do enxerto. Por outro lado, um diagnóstico inicial de rejeição aguda celular, com desenvolvimento posterior de DSA, é um indicativo de provável má aderência ao tratamento imunossupressor, o que desencadeia a produção de DSA, culminando com a ABMR e risco aumentado de perda do enxerto⁴. Além disso, nesse mesmo estudo, viu-se que o momento da biópsia por indicação influencia no seu diagnóstico: as biópsias precoces no período de até um ano do transplante refletiam mais um processo de injúria renal aguda associado à rejeição aguda celular ou alterações limítrofes (*borderline*). Já as biópsias mais tardias, após um ano de transplante, apresentavam um aumento do diagnóstico de ABMR, assim como da suspeita clínica de má adesão ao tratamento. Além disso, o estudo demonstra que o grupo de pacientes que evoluiu com falência do enxerto renal apresentou uma maior frequência de diagnóstico histológico de ABMR que de rejeição aguda celular ou alterações limítrofes (*borderline*) segundo a classificação de Banff⁴.

Similarmente, foi demonstrado em nossa coorte que alguns achados histológicos na biópsia protocolar, como também na biópsia por indicação clínica no primeiro ano de transplante, estão associados à perda de função renal em um período de seguimento de até cinco anos. O achado de rejeição

mediada por anticorpos (ABMR), seja na biópsia protocolar, seja na biópsia por indicação, foi associado à menor TFGe em 1 ano, 3 anos e 5 anos de acompanhamento. Entretanto, o diagnóstico histológico de ABMR na biópsia por indicação pareceu estar associado a uma perda mais acentuada da TFGe que o seu achado na biópsia protocolar, o que sugere que o diagnóstico e intervenção precoces, em tempo hábil, podem proteger o enxerto renal contra a futura perda de função. Corrobora para isso o fato de que apenas o diagnóstico de ABMR na biópsia por indicação, mas não na biópsia protocolar, esteve associado ao aumento da proteinúria em 1 ano e 3 anos de seguimento, mostrando que a vigilância para a ocorrência de rejeição nos primeiros dias de pós-transplante permite o seu tratamento precocemente, trazendo benefício à função renal do enxerto até mesmo a longo prazo.

O fator imunológico também confere risco aumentado para a ocorrência de ABMR e perda do enxerto. Lefaucheur C. *et al* demonstraram em seu estudo que a presença de DSA pré-transplante, detectado pela técnica *Single Antigen*®, confere risco aumentado de pior prognóstico a longo prazo para o enxerto renal. O mesmo estudo ainda evidenciou a existência de uma graduação de risco de ABMR e perda do enxerto de acordo com o MFI de DSA detectados antes do transplante, com um risco 3,8 vezes maior de perda futura do enxerto para os pacientes que apresentam MFI maior que 3000 antes do transplante renal, comparados àqueles com MFI menor que 3000. O grupo sugere uma combinação de técnicas para a avaliação precisa do risco imunológico do paciente previamente sensibilizado⁹. Em nosso estudo, 58% dos pacientes apresentavam DSA positivo pré-transplante, o qual conferiu uma tendência a probabilidade estimada de menor sobrevivência do enxerto, a qual não atingiu significância estatística, quando o fator imunológico foi analisado isoladamente, provavelmente pelo tamanho da amostra.

Em sua coorte multicêntrica com análise de 771 biópsias de enxerto renal com diagnóstico histológico de ABMR, Aubert O. *et al* compararam os

achados relacionados à presença de DSA pré-transplante com aqueles relacionados à presença de DSA *de novo*¹⁰. Foi demonstrado que o grupo com DSA pré-existente apresentou ABMR muito mais precocemente que aquele de pacientes com DSA *de novo*. Por outro lado, os pacientes com ABMR e DSA *de novo* apresentaram mais proteinúria, enquanto aqueles com DSA pré-existente apresentaram mais ABMR subclínica. Algumas diferenças histológicas também foram evidenciadas entre os dois grupos de comparação. Enquanto o grupo de pacientes com ABMR e DSA pré-existente apresentou mais glomerulite, o grupo com ABMR e DSA *de novo* teve maior frequência de duplo contorno de membrana glomerular, mais tubulite, atrofia tubular e hialinose arteriolar. Não houve diferença quanto à presença de inflamação em capilares peritubulares e quanto à positividade de C4d entre os dois grupos²¹. Os resultados dessa coorte também foram claros em demonstrar que pacientes com ABMR e DSA *de novo* apresentavam maior frequência de glomerulopatia do transplante e taxa aumentada de perda do enxerto quando comparados àqueles com ABMR e DSA pré-existente. Nesse mesmo estudo, Aubert O. et al mostraram que os principais fatores associados à perda aumentada do enxerto renal foram: ABMR associada à presença de DSA *de novo*, taxa de filtração glomerular diminuída no momento do diagnóstico de ABMR, presença de proteinúria quando da biópsia com ABMR e a presença de glomerulopatia do transplante como achado histológico²¹. Dessa forma, fica evidenciado que, apesar de tanto DSA pré-existente, quanto DSA *de novo* em pacientes com ABMR conferirem pior prognóstico ao enxerto renal, existe uma gradação de risco entre os grupos, com maior chance de perda do enxerto nos pacientes que desenvolveram DSA *de novo*. Em nosso estudo, dos 220 pacientes que realizaram biópsia de enxerto renal por indicação clínica, 55% tiveram DSA positivo no período da biópsia, 24% tiveram resultado negativo e 21% não tiveram o exame realizado. Não foi possível determinar associação de risco de pior sobrevida do enxerto nos pacientes com DSA *de novo* em relação aos pacientes com DSA pré-transplante, provavelmente devido ao pequeno tamanho da amostra testada, uma vez que

dentre os 121 pacientes com DSA positivo no pós-transplante, apenas 11 (9%) apresentaram de fato DSA *de novo*.

Posteriormente em nosso estudo, foram pesquisadas as principais causas de perda do enxerto e óbito do paciente. Além disso, foram feitas análises de probabilidade de sobrevida do enxerto e do paciente de acordo com covariáveis selecionadas. De acordo com os resultados apresentados, observamos que a rejeição crônica constituiu a principal causa de perda do enxerto em nossa coorte, responsável por 38% dos casos, em linha com os dados já conhecidos da literatura, como mostrado no estudo de Sellàres e colaboradores⁴. A probabilidade estimada de sobrevida do enxerto foi, como esperado, diminuindo ao longo do tempo de acompanhamento, passando de 85% no primeiro ano para 78% em 3 anos e 72% em 5 anos.

Em seu recente estudo, Mehta R.B *et al* demonstraram que o achado de inflamação subclínica em biópsia de vigilância realizada no primeiro ano de transplante foi associado a risco 4 vezes maior de rejeição clínica subsequente e risco 2 vezes maior de perda do enxerto censurada para óbito, independentemente do desenvolvimento de DSA⁶¹. Outro estudo recentemente publicado por Haas M *et al* demonstrou que um índice de cronicidade ≥ 4 em pacientes com diagnóstico de ABMR segundo a classificação de Banff (2019)²⁴ foi fortemente associado com a perda do enxerto renal em duas coortes diferentes de 147 e 61 pacientes com DSA positivo, respectivamente⁶². Desse modo, percebe-se que apesar de todo o debate sobre o valor da realização de biópsia de vigilância precoce no paciente transplantado renal, a análise histológica da biópsia protocolar pode ser um meio de atender a necessidade de predição prognóstica para o enxerto renal de pacientes sensibilizados.

Em nosso estudo, foi demonstrado que a presença de ABMR na biópsia protocolar foi associada a uma probabilidade estimada de sobrevida do

enxerto progressivamente menor ao longo do primeiro ano, 3 anos e 5 anos de acompanhamento, quando comparado ao achado histológico de normalidade ou NTA (apenas histologia analisada) na mesma biópsia. De forma adicional, foi observado que a presença de C4d positivo como achado imunopatológico na biópsia protocolar também foi associada com o risco de menor sobrevida do enxerto, nesse mesmo período de seguimento. A presença de DSA pré-transplante não atingiu significância estatística na predição de menor sobrevida do enxerto, porém demonstrou uma tendência a probabilidades estimadas de sobrevida progressivamente menores com o tempo, em comparação aos pacientes com DSA negativo pré-transplante. Provavelmente, esse resultado não atingiu significância estatística devido ao tamanho da amostra.

Em relação à distribuição das causas de óbito em nossa *coorte*, a causa mais frequente foi infecciosa, responsável por 42% dos casos, não contabilizando os casos de óbito por Covid-19 que representaram 12% dos pacientes que faleceram. A causa cérebro cardiovascular foi responsável por 8% dos óbitos, a oncológica por 4% e doenças inflamatórias ou autoimunes foram a causa de 3% dos óbitos. Chama atenção a grande frequência de causa desconhecida para o óbito do paciente, que contabilizou 27% dos casos, devido à descontinuação do acompanhamento ou morte em outro serviço de saúde. Também houve um decréscimo progressivo na probabilidade estimada de sobrevida dos pacientes incluídos em nosso estudo, passando de 92% no primeiro ano para 85% em 3 anos e 78% em 5 anos. Em nosso estudo, o achado de ABMR na biópsia protocolar precoce não apenas determinou risco de menor sobrevida do enxerto, como também de menor sobrevida do paciente. O grupo de pacientes com ABMR na biópsia protocolar teve uma probabilidade estimada de sobrevida do paciente progressivamente menor que aqueles que tiveram biópsia protocolar normal ou apenas com achado histológico de NTA. Apesar de a presença de DSA pré-transplante não ter apresentado significância estatística na determinação de risco de menor sobrevida do enxerto, ele associou-se significativamente

com a probabilidade estimada de menor sobrevida do paciente em 1 ano, 3 anos e 5 anos de acompanhamento, em relação aos pacientes com DSA negativo pré-transplante, o que mostra que os estudos histológico e imunológico combinados podem trazer informações adicionais na análise prognóstica precoce de pacientes transplantados renais sensibilizados.

Lesões mediadas por anticorpos que não fecham critério para ABMR

Em uma segunda etapa do nosso estudo, após analisar cuidadosamente os achados histológicos das biópsias protocolares que não fechavam diagnóstico para ABMR, observamos que muitos desses casos evoluíram para ABMR na biópsia por indicação. Percebemos que lesões histológicas incipientes, como NTA ou glomerulite e/ou pericapilarite, vistas na biópsia protocolar, quando combinadas ao fator imunológico refletido pela presença de DSA pré-transplante ou C4d positivo, associavam-se não apenas a uma TFGe progressivamente menor ao longo dos anos, como também a uma menor sobrevida do enxerto. Esses dados sugerem que lesões precoces pós-transplante renal, seja NTA, seja inflamação microvascular, associadas à atividade humoral, também podem ativar a cascata do complemento e levar a um prognóstico semelhante aos casos de ABMR diagnosticada já na biópsia protocolar. Quando comparados os grupos *AB activity*, ABMR e controle, observou-se que os grupos *AB activity* e ABMR apresentavam evolução semelhante, ainda que no grupo *AB activity* as lesões histológicas não fechassem critério para ABMR. Ambos os grupos demonstraram uma perda progressiva da TFGe e uma menor sobrevida do enxerto em relação ao grupo controle ao longo de 5 anos de seguimento. O grupo *AB activity* chegou a apresentar risco de perda do enxerto 2 vezes maior que o grupo controle. O número de transplantes (2 ou mais) também foi uma variável independente de risco para a perda do enxerto nesses subgrupos de interesse em comparação com o grupo controle, o que reforça a natureza imunológica do aumento do risco através da sensibilização desses pacientes.

Esses resultados mostram que o processo de imunoativação é complexo e que não apenas o achado de ABMR precocemente no pós-transplante é capaz de ativar a via clássica da cascata de complemento. A presença de NTA ou de inflamação microvascular nos primeiros 10 dias de pós-transplante, quando associada à atividade humoral, também consegue ativar a cascata de complemento, levando à pior evolução da função renal do enxerto e de sua sobrevida, o que evidencia a utilidade da vigilância precoce tanto imunológica como da histologia do enxerto renal para fins prognósticos do transplante de rim. É conhecida a gradação de risco para a perda de enxerto realizada em cima dos valores de MFI, valores mais altos determinando maior risco⁹, em nosso estudo, houve uma tendência a valores maiores de MFI no grupo ABMR em relação ao grupo *AB activity*, porém essa diferença não atingiu significância estatística, corroborando para uma evolução semelhante em termos prognósticos para ambos os grupos.

O processo de imunoativação é também dinâmico, começa com a deposição de anticorpos no enxerto renal, desencadeando a ativação da cascata de complemento, culminando finalmente com as lesões histológicas. Entretanto, quando a biópsia do enxerto é realizada muito precocemente no pós-transplante, ela talvez não consiga mostrar todo o processo de imunoativação subjacente, o qual quando finalizado pode determinar pior prognóstico a longo-prazo. Lesões histológicas incipientes que não fecham critério diagnóstico para ABMR devem despertar a atenção do transplantador, especialmente quando mediadas por anticorpos. Para melhorar a sensibilidade da biópsia protocolar na detecção de alterações histológicas que determinam pior desfecho do transplante renal, especialmente lesões mediadas por anticorpos, nosso centro, após análise desses resultados, decidiu associar o estudo do perfil MFI do DSA, atentando para elevações precoces, ao protocolo de realização da biópsia protocolar até os primeiros 10 dias de pós-transplante renal em pacientes sensibilizados.

Perspectivas futuras

Finalmente, quando se fala de vias imunopatogênicas ativadas no processo de ABMR, Halloran PF e colaboradores concluíram em seu estudo recente que, dentre as 398 biópsias com achado de ABMR analisadas em seu estudo, os casos com DSA negativo aconteceram mais precocemente, foram menos intensos, isto é, com menor expressão de genes associados à ABMR e, em sua maioria, apresentaram C4d negativo. Entretanto, o grupo concluiu que os mecanismos moleculares usados foram idênticos aos casos de ABMR com DSA positivo, e que ambos os tipos de ABMR apresentavam risco semelhante de perda do enxerto⁶³. Em resposta a esse estudo, Naesens M *et al* escreveram uma carta ao editor para salientar que a ausência de maiores diferenças na expressão gênica entre os casos de ABMR com DSA positivo e com DSA negativo não pode levar à conclusão de que todos os casos de inflamação microvascular com expressão aumentada dos transcritos relacionados à imunoativação conferem diagnóstico de ABMR com mesmo risco de perda do enxerto e, portanto, não deveriam receber o mesmo tratamento. Nessa carta, os autores reforçam que o mecanismo por trás da imunoativação e infiltração celular, levando à injúria endotelial e tecidual vista na biópsia de enxerto renal não é necessariamente refletido pela expressão gênica⁶⁴. A tréplica para essa carta, feita por Halloran PF *et al*, reiterou que, apesar dos casos de ABMR com DSA negativo serem um pouco menos ativos em termos moleculares, ainda há a liberação de DNA derivado de doadores livres de células em nível similar aos casos de ABMR com DSA positivo, o que demonstra que mesmo com vias patogênicas similares, existe um espectro de extensiva heterogeneidade para o estágio e intensidade da ABMR⁶⁵.

No campo de técnicas em desenvolvimento, estudos mostram que a detecção de DNA derivado do doador e livre de célula mostra-se promissora como forma de biópsia líquida, sendo proposta como um marcador não

invasivo para diagnóstico de rejeição do enxerto renal⁶⁶. Outros estudos vêm demonstrando que no futuro provavelmente poderá se fazer uso na prática clínica da análise de microRNA e perfil de citocinas na urina como método também não invasivo para discriminação entre rejeição do enxerto e condições estáveis do transplante⁶⁷. A identificação precoce de ABMR através de biomarcadores não invasivos e o uso de modelos de predição para avaliar o risco futuro de falência do enxerto devem ser cada vez mais considerados⁶⁸. Percebe-se assim que os mecanismos patogênicos por trás da inflamação microvascular e da ABMR são complexos e requerem mais estudos para serem completamente elucidados. Na era dos diagnósticos de precisão e da predição individualizada de risco tanto para o paciente como para o enxerto renal, faz-se necessário combinar cada vez mais o estudo dos fatores histológicos, imunológicos e futuramente moleculares no manejo de pacientes transplantados renais sensibilizados.

O presente estudo teve algumas limitações: seu caráter retrospectivo, com avaliação de dados de pacientes a partir de 2010, impossibilitou que alguns exames como tipificação HLA para os locus Cw, DQ e DP, C4d e DSA pós-transplante fossem realizados para todos os pacientes da coorte, uma vez que não estavam disponíveis. A despeito da ausência dos resultados desses testes para alguns pacientes, nossos objetivos foram alcançados, provando-se o valor da biópsia protocolar precoce para fins diagnósticos e prognósticos do transplante renal em pacientes sensibilizados. Em estudo futuro, precisaremos determinar se os casos de lesão mediada por anticorpos que não fecham critério para diagnóstico de ABMR na biópsia protocolar (grupo *AB activity*) devem ser tratados precocemente e se a terapia poderá conferir mudança nos desfechos do transplante e quanto ganharemos de sensibilidade com a associação da biópsia protocolar ao estudo do perfil MFI do DSA.

6. CONCLUSÕES

O diagnóstico de ABMR tanto na biópsia protocolar como na biópsia por indicação impacta negativamente a evolução da função renal do enxerto, com perda progressiva da TFG_e em 5 anos de acompanhamento. O achado de ABMR na biópsia por indicação também foi associado ao aumento da proteinúria a longo-prazo.

Quando comparados subgrupos de interesse, observou-se que pacientes com lesões histológicas incipientes (NTA ou inflamação microvascular) combinadas com atividade humoral (DSA pré-transplante ou C4d positivo) que não fecham critério para ABMR na biópsia protocolar – grupo *AB activity* - comportam-se como os pacientes com diagnóstico precoce de ABMR na biópsia protocolar em termos de perda da TFG_e em relação ao grupo controle ao longo de 5 anos de acompanhamento.

Do mesmo modo, o grupo que não fecha critério para diagnóstico de ABMR na biópsia protocolar, mas apresenta atividade imunológica precocemente pós-transplante, tem menor sobrevida do enxerto em comparação ao grupo controle, evoluindo de forma semelhante ao grupo que teve diagnóstico de ABMR na biópsia protocolar, demonstrando pior prognóstico do transplante renal em relação ao grupo controle.

Em relação à probabilidade estimada de sobrevida do enxerto renal em pacientes sensibilizados, variáveis como transfusão sanguínea prévia, doador falecido, presença de ABMR e de C4d positivo na biópsia protocolar conferem risco aumentado de menor sobrevida do enxerto.

No que concerne a probabilidade estimada de sobrevida do paciente transplantado renal sensibilizado, variáveis como doador falecido, ABMR como achado histológico na biópsia protocolar e presença de DSA positivo pré-transplante conferem maior risco para menor sobrevida do paciente.

Finalmente, o estudo da atividade mediada por anticorpo, através da análise da presença de DSA pré-transplante, MFI do DSA e positividade do C4d, associado ao estudo histológico da biópsia protocolar tem o potencial de aumentar a sensibilidade do exame para diagnóstico precoce de ABMR.

Conclui-se assim que a combinação do estudo imunológico com o estudo histológico, bem como a análise de variáveis clínico-demográficas, realizada precocemente no pós-transplante de pacientes sensibilizados constitui estratégia válida na determinação do prognóstico do transplante renal e que a biópsia protocolar tem lugar no acompanhamento desses pacientes tanto para fins de diagnóstico e tratamento precoces, como para predição de risco futuro de menor função renal e menor sobrevida do enxerto e do paciente.

7. REFERÊNCIAS*

1. 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. *NEJM*. 1999;341(23): 1725-30.
2. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, et al. Evidence of antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation* 2010;90:68-74
3. Nankivell BJ, Kuypers DR. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet* 2011;378: 1428-37.
4. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* 2012;12: 388-99.
5. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 2004;4: 1289-95.
6. 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.
7. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969;280: 735-9.
8. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 2004;4: 438-43.
9. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010;21: 1398-406.
10. Aubert O, Loupy A, Hidalgo L et al. Antibody-mediated rejection due to preexisting versus *de novo* donor-specific antibodies in kidney allograft recipients. *J Am Soc Nephrol* 2017;28: 1912-23.
11. Demirci C, Sen S, Sesak M et al. Incidence and Importance of C4d deposition in renal allograft dysfunction. *Transplant Proc*. Jan-Feb 2008;40(1):174-7.
12. Chapman JR, Wavamunno M, O'Connell PJ and Nankivell BJ. Unravelling the connections between donor specific antibodies and renal allograft pathology. *Clin Transpl* 2013; 361-5

13. Reed EF; Rao P, Zhang Z et al. Comprehensive assessment and standardization of solid phase multiplex-bead arrays for detection of antibodies to HLA. *Am J Transplant* 2013; 13: 1859-70.
14. Lefaucheur C, Viglietti D, Mangiola M et al. From humoral theory to performant risk stratification in kidney transplantation. *J Immunol Res* 2017;2017: 5201098.
15. Tait BD, Susal C, Gebel HM et al. Consensus Guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA a non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013;95(1): 19-47.
16. Haas M, Sis B, Racusen LC et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014, 14(2): 272-83.
17. David-Neto E, Souza PS, Panajotopoulos N et al. The impact of pretransplant donor-specific antibodies on graft outcome in renal transplantation: a six-year follow-up study. *Clinics (São Paulo)* 2012;67(4):355-61.
18. Viglietti D, Loupy A, Vernerey D et al. Value of donor-specific anti-HLA antibody monitoring and characterization for risk stratification of kidney allograft loss. *J Am Soc Nephrol* 2017, 28: 702-15.
19. de Castro MCR, Barbosa EA, Souza RP, Agena F, de Souza PS, Maciel G, Rodrigues H, Panajotopoulos N, David DS, de Paula FJ, David-Neto E. The Kinetics of Anti-HLA Antibodies in the First Year after Kidney Transplantation: In Whom and When Should They Be Monitored? *J Transplant.* 2018 Apr 23;2018:8316860.
20. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney allograft survival. *N Engl J Med* 2013; 369 (13): 1215-26.
21. Loupy A, Hill GS, Suberbielle C et al. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *Am J Transplant* 2011; 11: 56-65.
22. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S et al. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009; 9: 2312-23.
23. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C 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: 293-307.
24. Loupy A, Haas M, Roufousse C, et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T-cell and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2020 Sep;20(9):2318-2331.
25. Coemans M, Süsal C, Döhler B, et al. Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney Int* 2018;94:964-73.

26. Summers DM, Watson CJ, Pettigrew GJ, Johnson RJ, Collett D, Neuberger JM, Bradley JA: Kidney donation after circulatory death (DCD): State of the art. *Kidney Int* 88: 241–249, 2015
27. Mirshekar-Syahka B, Summers D, Bradbury LL, Aly M, Bardsley V, Berry M, Norris JM, Torpey N, Clatworthy MR, Bradley JA, Pettigrew GJ: Local expansion of donation after circulatory death kidney transplant activity improves waitlisted outcomes and addresses inequities of access to transplantation. *Am J Transplant* 17: 390–400, 2017
28. Denecke C, Yuan X, Ge X, Kim IK, Bedi D, Boenisch O, Weiland A, Jurisch A, Kotsch K, Pratschke J, Reutzel-Selke A, Tullius SG: Synergistic effects of prolonged warm ischemia and donor age on the immune response following donation after cardiac death kidney transplantation. *Surgery* 153: 249–261, 2013
29. Summers DM, Johnson RJ, Hudson A, Collett D, Watson CJ, Bradley JA: Effect of donor age and cold storage time on outcome in recipients of kidneys donated after circulatory death in the UK: A cohort study. *Lancet* 381: 727–734, 2013
30. Locke JE, Segev DL, Warren DS, Dominici F, Simpkins CE, Montgomery RA: Outcomes of kidneys from donors after cardiac death: Implications for allocation and preservation. *Am J Transplant* 7: 1797–1807, 2007
31. Heylen L, Jochmans I, Samuel U, Tieken I, Naesens M, Pirenne J, Sprangers B: The duration of asystolic ischemia determines the risk of graft failure after circulatory-dead donor kidney transplantation: A eurotransplant cohort study. *Am J Transplant* 18: 881–889, 2018
32. Schaapherder A, Wijermars LGM, de Vries DK, de Vries APJ, Bemelman FJ, vandeWetering J, van Zuilen AD, Christiaans MHL, Hilbrands LH, Baas MC, Nurmohamed AS, Berger SP, Alwayn IP, Bastiaannet E, Lindeman JHN: Equivalent long-term transplantation outcomes for kidneys donated after brain death and cardiac death: Conclusions from a nationwide evaluation. *E Clinical Medicine* 4–5: 25–31, 2018
33. Van Loon E, Lerut E, Senev A et al, *Clin J Am Soc Nephrol* 2020 Oct 7;15(10):1484-1493.
34. Souza PS, Machado D, Aguirre AR et al, Diagnosis of antibody-mediated rejection through early protocol biopsies in sensitized patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, Volume 28, Issue suppl_1, May 2013, Page i70.
35. Uehara M, Solhjou Z, Banouni N, Kasinath V, Xiaqun Y, Dai L, Yilmam O, Yilmaz M, Ichimura T, Fiorina P, Martins PN, Ohori S, Guleria I, Maarouf OH, Tullius SG, McGrath MM, Abdi R: Ischemia augments alloimmune injury through IL-6-driven CD41 alloreactivity. *Sci Rep* 8: 2461, 2018
36. Alegre ML, Florquin S, Goldman M: Cellular mechanisms underlying acute graft rejection: Time for reassessment. *Curr Opin Immunol* 19: 563–568, 2007
37. Tilney NL, Guttman RD: Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney. *Transplantation* 64: 945–947, 1997

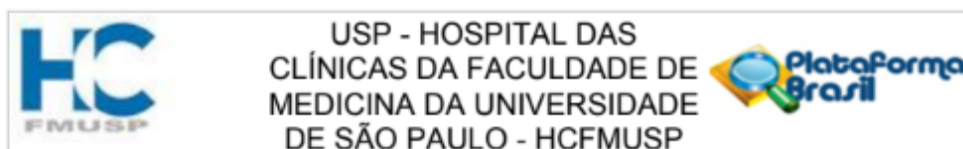
38. de Fijter JW, Mallat MJ, Doxiadis II, Ringers J, Rosendaal FR, Claas FH, Paul LC: Increased immunogenicity and cause of graft loss of old donor kidneys. *J Am Soc Nephrol* 12: 1538–1546, 2001
39. Ouali N, Audouin M, Rondeau E, Xu-Dubois YC: Markers of graft microvascular endothelial injury may identify harmful donor-specific anti-HLA antibodies and predict kidney allograft loss. *Am J Transplant* 19: 2434–2445, 2019
40. Callemeyn J, Ameye H, Lerut E et al. Revisiting the changes in the Banff classification for antibody-mediated rejection after kidney transplantation *Am J Transplant* 2021;00:1–11.
41. Haas M, Montgomery RA, Segev DL et al. Subclinical acute antibody-mediated rejection in positive crossmatch renal allografts. *Am. J. Transplant.* 2007; 7: 576–85.
42. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS et al. Outcome of subclinical antibody mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am. J. Transplant.* 2009; 9: 2561–70.
43. Miura M, Harada H, Fukasawa Y et al. Long-term histopathology of allografts in sensitized kidney recipients. *Clin. Transplant.* 2012; 26 (Suppl 24): 32–6.
44. Tsuji T, Yanai M, Itami H et al. Microvascular inflammation in early protocol biopsies of renal allografts in cases of chronic active antibody-mediated rejection *Nephrology* 20, Suppl. 2 (2015) 26–30
45. Halloran PF, Wadgyamar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS: The significance of the anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I-mediated rejection. *Transplantation* 49: 85–91, 1990
46. Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS: The significance of the anti-class I antibody response. II. Clinical and pathological features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation* 53: 550–555, 1992
47. Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF: Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody. *Transplantation* 61: 1586–1592, 1996
48. Racusen LC, Haas M. Antibody-Mediated Rejection in Renal Allografts: Lessons from Pathology. *Clin J Am Soc Nephrol* 1: 415–420, 2006
49. Sund S, Hovig T, Reisaeter AV, Scott H, Bentdal O, Mollnes TE: Complement activation in early protocol kidney graft biopsies after living-donor transplantation. *Transplantation* 75: 1204–1213, 2003
50. Kuypers DR, Lerut E, Evenepoel P, Maes B, Vanrenterghem Y, Van Damme B: C3D deposition in peritubular capillaries indicates a variant of acute renal allograft rejection characterized by a worse clinical outcome. *Transplantation* 76: 102–108, 2003

51. David-Neto E, David DS, Ginani GF et al. C4d staining in post-reperfusion renal biopsy is not useful for early detection of antibody-mediated rejection when CDC crossmatching is negative. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Apr;26(4):1388-92.
52. Djamali A, Muth BL, Ellis TM, et al. Increased C4d in post-reperfusion biopsies and increased donor specific antibodies at one-week post-transplant are risk factors for acute rejection in mild to moderately sensitized kidney transplant recipients. *Kidney Int*. 2013;83(6):1185-1192.
53. Loupy A, Aubert O, Orandi Bj et al. Prediction system for risk of allograft loss in patients receiving kidney transplants: international derivation and validation study *BMJ* 2019;366:4923.
54. Perl J. Kidney transplant failure: failing kidneys, failing care? *Clin J Am Soc Nephrol* 2014;9:1153-5
55. Halloran PF. Call for revolution: A new approach to describing allograft deterioration. *Am J Transplant* 2002; 2: 195–200.
56. Haas M, Kraus ES, Samaniego-Picota M, Racusen LC, Ni W, Eustace JA. Acute renal allograft rejection with intimal arteritis: Histologic predictors of response to therapy and graft survival. *Kidney Int* 2002; 61: 1516–1526.
57. Macdonald FI, Ashraf S, Picton M, et al. Banff criteria as predictors of outcome following acute renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1692–1697.
58. Briganti EM, Russ GR, McNeil JJ, Atkins RC, Chadban SJ. Risk of renal allograft loss from recurrent glomerulonephritis. *N Engl J Med* 2002; 347: 103–109.
59. El Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant* 2009; 9: 527–535.
60. Einecke G, Sis B, Reeve J, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009; 9: 2520–2531.
61. Mehta RB, Melgarejo I, Viswanathan V, et al. Long-term immunological outcomes of early subclinical inflammation on surveillance kidney allograft biopsies. *Kidney Int*. 2022 Dec;102(6):1371-1381.
62. Haas M, Mirocha J, Huang E, et al. A Banff-based histologic chronicity index is associated with graft loss in patients with a kidney transplant and antibody-mediated rejection. *Kidney Int*. 2023 Jan;103(1):187-195.
63. Halloran PF, Madill-Thomsen KS, Pon S, et al. Molecular diagnosis of ABMR with or without donor-specific antibody in kidney transplant biopsies: Differences in timing and intensity but similar mechanisms and outcomes. *Am J Transplant*. 2022 Aug;22(8):1976-1991.

64. Naesens M, Thaunat O, Mengel M. Microvascular inflammation: Gene expression changes do not necessarily reflect pathogenesis. *Am J Transplant.* 2022 Dec;22(12):3180-3181.
65. Halloran PF, Madill-Thomsen KS. Letter to the Editor Re: Letter by Naesens et al. Microvascular inflammation: Gene expression changes do not necessarily reflect pathogenesis. *Am J Transplant.* 2022 Dec;22(12):3182-3183.
66. Novotný M, Kment M, Viklický O et al. Antibody-mediated rejection of renal allografts: diagnostic pitfalls and challenges. *Physiol Res* 2021 Dec 30;70(Suppl4): S551-S565.
67. Gielis EM, Anholts JDH, Beelen EV et al. A combined microRNA and chemokine profile in urine to identify rejection after kidney transplantation. *Transplant Direct* 2021 Jun 10;7(7):e711.
68. Rodriguez-Ramirez S, Jurdi AAI, Konvalinka A et al. Antibody-mediated rejection: prevention, monitoring and treatment dilemmas. *Curr Opin Organ Transplant* 2022 Oct 1;27(5):405-414.

* De acordo com: Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

APÊNDICE

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Correlação entre os achados histológicos em biópsia de vigilância precoce do enxerto renal e a ocorrência de rejeição humoral no primeiro ano de transplante de pacientes sensibilizados.

Pesquisador: Elias David Neto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30132819.3.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.169.976

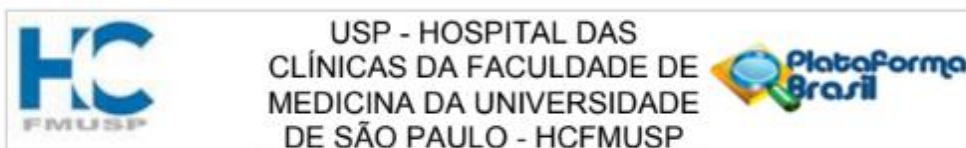
Apresentação do Projeto:

Projeto de Doutorado da aluna Isabelle Malbouisson Menezes, sob orientação do Prof. Dr. Elias David Neto. Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional de análise de uma coorte de 330 pacientes sensibilizados submetidos a transplante renal isolado de doador vivo ou falecido submetidos à biópsia de vigilância do enxerto precoce nos primeiros 7-10 dias de transplante. O objetivo primário do estudo é correlacionar achados histológicos da biópsia renal de vigilância precoce e a presença de DSA (anticorpos anti-HLA específicos contra o doador) com a ocorrência de rejeição humoral aguda e a sobrevida do enxerto em um ano de transplante. Esses pacientes foram submetidos ao transplante na Unidade de Transplante Renal no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (UTR HC-FMUSP) entre 2010 e 2017, com avaliação dos dados de prontuário até 12 meses de transplante ou até a perda do enxerto.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo principal: Correlacionar achados da biópsia renal de vigilância precoce e a presença de DSA com a ocorrência de rejeição humoral aguda e a sobrevida do enxerto em um ano de transplante.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.169.976

Objetivos secundários:

- Correlacionar achados histológicos da biópsia renal precoce com a ocorrência de rejeição mediada por anticorpos no primeiro ano de transplante.
- Determinar a presença de DSA pré-transplante.
- Determinar se há associação entre a caracterização desses anticorpos e alterações histológicas definidoras de rejeição humoral, segundo a Classificação de Banff de 2015, revisada em 2017.-Avaliar o impacto da presença de DSA-C1q sobre a ocorrência de rejeição humoral aguda.
- Determinar a presença de DSA no momento de biópsia por indicação clínica.
- Avaliar a subclasse de anticorpos anti-HLA específicos contra o doador na evolução do transplante.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de um estudo observacional, não oferecendo riscos aos pacientes.

Benefícios:

Caracterizar alterações histológicas precoces do enxerto renal capazes de predizer a ocorrência futura de rejeição mediada por anticorpos, possibilitando intervenção terapêutica precoce com melhora do desfecho do transplante renal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, de interesse para a área. Cronograma exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador encaminhou resposta aos questionamentos anteriores, esclarecendo que trata-se de projeto exclusivamente retrospectivo, apenas com análise de dados de prontuários. Não haverá nenhum procedimento laboratorial e, portanto, não haverá participação do Laboratório de Imunologia do Incor, como questionado.

Encaminhado nova versão do projeto com correções.

Recomendações:

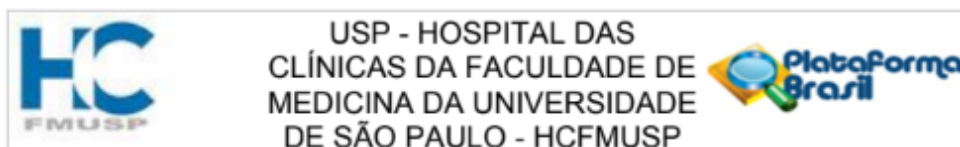
Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.169.976

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1461150.pdf	13/07/2020 11:29:40		Aceito
Outros	Carta_Pendencias_assinada.PDF	28/05/2020 16:01:36	ISABELLE MALBOUISSON MENEZES	Aceito
Outros	Carta_compromisso_rev.pdf	05/04/2020 17:28:03	ISABELLE MALBOUISSON MENEZES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_final.pdf	05/04/2020 17:26:47	ISABELLE MALBOUISSON MENEZES	Aceito
Folha de Rosto	FR_ELIAS_DAVID_NET0_12416.pdf	19/03/2020 14:47:48	ISABELLE MALBOUISSON MENEZES	Aceito
Outros	Carta_Aprovacao_Departamento_Clinica_Medica_Isabelle.pdf	06/03/2020 10:10:56	ISABELLE MALBOUISSON MENEZES	Aceito
Outros	Dados_digitais_Isabelle.pdf	06/03/2020 10:09:38	ISABELLE MALBOUISSON MENEZES	Aceito
Outros	Custos_projetodoutorado_Isabelle.pdf	06/03/2020 10:08:05	ISABELLE MALBOUISSON MENEZES	Aceito
Cronograma	Cronograma_projetodoutorado_Isabelle.pdf	06/03/2020 10:04:08	ISABELLE MALBOUISSON MENEZES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Assinada_Carta_de_Participacao_InCor.pdf	24/11/2019 12:10:59	ISABELLE MALBOUISSON MENEZES	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura_pesquisa.pdf	24/11/2019 12:06:13	ISABELLE MALBOUISSON	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.169.976

Brochura Pesquisa	Brochura_pesquisa.pdf	24/11/2019 12:06:13	MENEZES	Aceito
-------------------	-----------------------	------------------------	---------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 23 de Julho de 2020

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br