



Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thais de Andrade Almeida

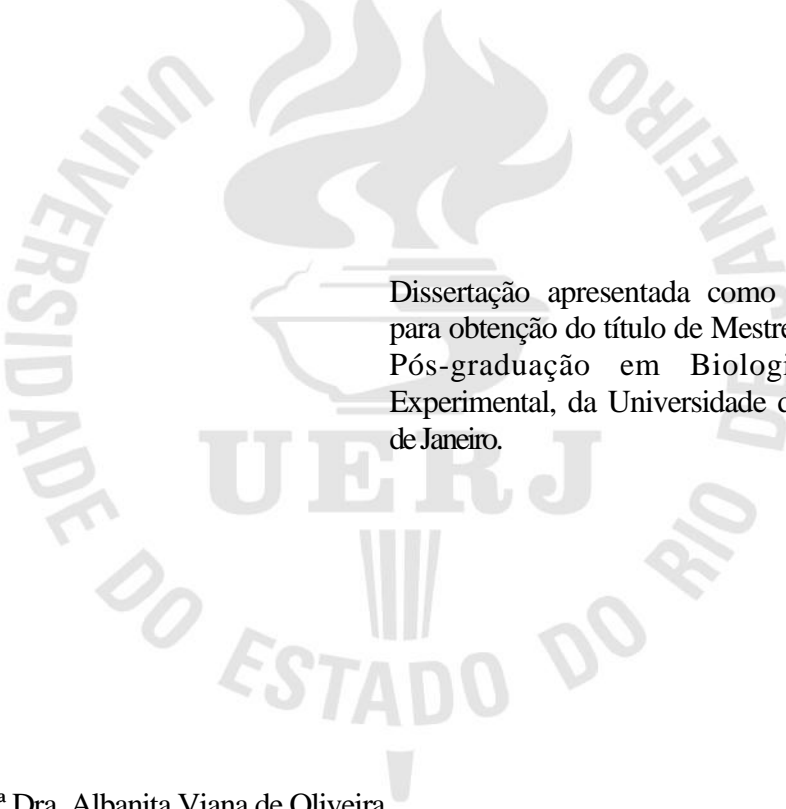
**Expressão de marcadores imuno-histoquímicos em biópsias renais de  
pacientes transplantados**

Rio de Janeiro

2012

Thais de Andrade Almeida

**Expressão de marcadores imuno-histoquímicos em biópsias renais de pacientes  
transplantados**



Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Albanita Viana de Oliveira

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> M.<sup>a</sup> Andréa Rodrigues Cordovil Pires

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

A447 Almeida, Thais Andrade.  
Expressão de marcadores imuno-histoquímicos em biópsias renais de  
pacientes transplantados / Thais Andrade Almeida. – 2012.  
63 f.

Orientadora: Albanita Viana de Oliveira.

Coorientadora: Andréa Rodrigues Cordovil Pires.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação  
em Biologia Humana e Experimental.

1. Rejeição de enxertos – Teses. 2. Rim – Transplante – Teses. 3.  
Imunoistoquímica. I. Oliveira, Albanita Viana de. II. Pires, Andréa  
Rodrigues Cordovil. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.61-089.84

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta  
dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Thais de Andrade Almeida

**Expressão de marcadores imuno-histoquímicos em biópsias renais de pacientes  
transplantados**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre ao Programa de  
Pós-graduação em Biologia Humana e  
Experimental, da Universidade do Estado do Rio  
de Janeiro.

Aprovada em 27 de julho de 2012.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> M.<sup>a</sup> Andréa Rodrigues Cordovil Pires  
Universidade Federal Fluminense

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Albanita Viana de Oliveira (Orientadora)  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. Maurício Younes-Ibrahim  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Vera Lucia Nunes Pannain  
Faculdade de Medicina - UFRJ

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmã pelo constante incentivo.

Aos meus sobrinhos, Igor, Nina e Diego, pelo carinho inocente.

À amiga Bárbara Fernandes de Sousa, por compartilhar minhas angústias e minimizá-las.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Albanita Viana de Oliveira, por acreditar em minha capacidade e fornecer subsídios para a concretização deste sonho.

À minha co-orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Ms. Andréa Rodrigues Cordovil Pires, pelo suporte técnico e intelectual.

Ao Prof. Ms. Vinícius Novaes Rocha, cujo auxílio paciente e despretensioso amenizou as dificuldades da finalização deste trabalho.

À Ana Paula Pessanha Pinto, pela amizade e ajuda profissional.

Ao Laboratório Fonte Medicina Diagnóstica e seus funcionários, por viabilizarem a execução do trabalho.

À amiga Prof<sup>ª</sup>. Bárbara Fernandes de Sousa pela cuidadosa revisão, editoração e apoio emocional.

## RESUMO

ALMEIDA, Thais de Andrade. *Expressão de marcadores imuno-histoquímicos em biópsias renais de pacientes transplantados*. 2012. 63f. Dissertação de Mestrado em Biologia Humana e Experimental - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

A partir da década de 60, com a utilização do transplante renal em larga escala como terapia substitutiva para pacientes com falência do órgão, surgiu a preocupação quanto ao desenvolvimento do processo de rejeição do enxerto. Tal intercorrência, em geral, cursa com sinais e sintomas clínicos apenas quando o evento está bem estabelecido, ou mesmo quando lesões irreversíveis já se instalaram. Assim, é fundamental um acompanhamento rigoroso, visando detectar os casos subclínicos. O presente trabalho, a fim de fornecer novas ferramentas que auxiliem o diagnóstico precoce de rejeição do enxerto, avaliou a expressão imuno-histoquímica dos anticorpos CD3, CD5, CD20, CD68, CD25, FoxP3 e C4d em biópsias renais realizadas entre os anos de 2007 e 2009 em pacientes transplantados acompanhados pelo Serviço de Nefrologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ - RJ, correlacionando os resultados obtidos com o diagnóstico histológico. Para tal, as biópsias foram reavaliadas por três médicos patologistas que as classificaram, segundo Critérios de Banff 2007, quanto à presença ou não de rejeição do enxerto e seu tipo, aguda ou crônica. A partir de então, os blocos de parafina foram processados pela técnica Tissue Microarray *for all* (Pires, ARC. e cols.) e submetidos à imuno-histoquímica. A positividade dos marcadores foi avaliada e graduada e os resultados encontrados foram correlacionados, em um primeiro momento, com a presença ou ausência de rejeição. Posteriormente, os casos com diagnóstico histológico de rejeição tiveram seu perfil imuno-histoquímico analisado em função da positividade para C4d, marcador definidor de rejeição humoral. Neste momento, buscou-se averiguar se os anticorpos estudados seriam úteis em detectar, neste grupo, rejeição humoral e celular. Após a análise estatística, realizada pelo Teste Exato de Fisher, pode-se, então, concluir que o comportamento do marcador CD3 é capaz de inferir a presença de rejeição e que os anticorpos CD5 e CD25 permitem sugerir rejeição celular e humoral, respectivamente. Foi observado também que casos sem diagnóstico histológico de rejeição podem apresentar marcação para C4d em mais de 10% de seus capilares peritubulares.

Palavras-chaves: Transplante renal. Rejeição do enxerto. Critérios de Banff. Perfil imuno-histoquímico. Rejeição humoral e celular.

## ABSTRACT

From the 60's, with the use of renal transplantation on a large scale as replacement therapy for patients with organ failure, came out the concern about the development process of graft rejection. This interurrence, generally, evolves with clinical signs and symptoms only when the event is well established, or even when irreversible damage has already been installed. So, is essential a close monitoring, looking forward to detect subclinical cases. The present work, in order to provide new tools that help in the early diagnosis of rejection of the graft, evaluated the immunohistochemical expression of CD3, CD5, CD20, CD68, CD25, FoxP3 and C4d in renal biopsies performed between the years 2007 and 2009 in transplanted patients accompanied by the Department of Nephrology of Pedro Ernesto University Hospital, UERJ - RJ, correlating the results with the histological diagnosis. To this, the biopsies were evaluated by three pathologists who classified them, according to Banff 2007 Criteria, for the presence or absence of graft rejection and its type, acute or chronic. Thereafter, the paraffin blocks were processed by Tissue Microarray *for all* technique (Pires, ARC. & cols.) and submitted to immunohistochemistry. The positivity of the markers was evaluated and graded and the results were correlated, at first, with the presence or absence of rejection. Later, cases with histological diagnosis of rejection had their immunohistochemical profile considered according to the positivity for C4d, a defining marker of humoral rejection. At this point, we sought to determine whether the antibodies would be useful in detecting, in this studied group, humoral and cellular rejection. After statistical analysis, performed by Fisher's Exact Test, it could be, therefore, concluded that the behavior of the CD3 marker is able to infer the presence of rejection and that CD5 and CD25 antibodies may suggest cellular and humoral rejection, respectively. It was also observed that cases without histological diagnosis of rejection may have markings for C4d in more than 10% of their peritubular capillaries.

**Keywords:** Renal transplantation. Graft rejection. Banff Criteria. Immunohistochemical profile. Humoral and cellular rejection.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Biópsia 8451/08. Rejeição aguda: infiltrado inflamatório intersticial e tubulite.....	23
Figura 2 –	Biópsia 0454/09. Fibrose intersticial e atrofia tubular.....	23
Quadro 1 –	Critérios quantitativos segundo Banff 2007.....	26
Figura 3 –	Biópsia 2522/07. O infiltrado inflamatório acomete mais de 50% do parênquima cortical (i3).....	27
Figura 4 –	Biópsia 2259/07. Endotelite: infiltrado inflamatório misto circundando uma arteríola e agredindo seu endotélio.....	27
Figura 5 –	Biópsia 2259/07. Infiltrado inflamatório mononuclear transmural.....	27
Figura 6 –	Biópsia 3076/07. Glomerulite: alargamento mesangial e aumento da celularidade à custa de um infiltrado inflamatório misto.....	27
Figura 7 –	Biópsia 3439/07. Tubulite: dois linfócitos permeando parede tubular (t1).....	27
Figura 8 –	Biópsia 6353/07. Tubulo renal destruído por infiltrado inflamatório mononuclear acentuado (t3).....	27
Figura 9 –	Biópsia 5872/09. Marcação imuno-histoquímica para C4d em mais de 50% dos capilares peritubulares. Marcação circunferencial e linear.....	35
Figura 10 –	Biópsia 8530/09. Positividade imuno-histoquímica moderada para CD68.....	35
Quadro 2 –	Casos sem diagnóstico histológico de rejeição.....	42
Quadro 3 –	Casos suspeitos de rejeição.....	43
Quadro 4 –	Casos suspeitos de rejeição com marcação para C4d maior que 10%.....	44
Quadro 5 –	Casos suspeitos de rejeição com marcação para C4d menor que 10%.....	44
Tabela 1 –	Comportamento dos anticorpos em função do diagnóstico histoquímico	46
Tabela 2 –	Comportamento dos anticorpos em função da marcação do C4d.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCTT	<i>Cooperative Clinical Trials in Transplantation</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
DAB	Diaminobenzidina
FoxP3	<i>forkhead box P3</i>
H0	Hipótese Zero
HE	Hematoxilina e Eosina
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IL-2	Interleucina-2
NIH	<i>National Institute of Health</i>
PAS	Ácido Periódico de Schiff
RA	Rejeição Aguda
RC	Rejeição Crônica
RCA	Rejeição Celular Aguda
RHA	Rejeição Humoral Aguda
RCC	Rejeição Celular Crônica
RHC	Rejeição Humoral Crônica
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
Tregs	T reguladores
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
1.1	<b>Terapia anti-rejeição</b> .....	13
1.2	<b>A biópsia renal</b> .....	14
1.3	<b>Rejeição do enxerto</b> .....	16
1.3.1	<u>Rejeição hiperaguda</u> .....	16
1.3.2	<u>Rejeição aguda</u> .....	17
1.3.3	<u>Rejeição celular aguda</u> .....	18
1.3.4	<u>Rejeição humoral aguda</u> .....	19
1.3.5	<u>Rejeição crônica</u> .....	21
1.3.6	<u>Rejeição humoral crônica</u> .....	22
1.3.7	<u>Rejeição celular crônica</u> .....	23
1.4	<b>Diagnósticos diferenciais de rejeição</b> .....	24
1.5	<b>Classificação de Banff</b> .....	25
1.6	<b>Marcadores imuno-histoquímicos</b> .....	28
1.6.1	<u>CD3 e CD5</u> .....	28
1.6.2	<u>CD20</u> .....	28
1.6.3	<u>C4d</u> .....	29
1.6.4	<u>CD68</u> .....	31
1.6.5	<u>CD25 e FoxP3</u> .....	31
2	<b>OBJETIVO</b> .....	33
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
3.1	<b>Tissue Microarray (TMA) <i>for all</i></b> .....	36
3.2	<b>Imuno-histoquímica</b> .....	38
3.3	<b>Análise estatística</b> .....	40
3.4	<b>Comitê de ética em pesquisa</b> .....	40
4	<b>RESULTADOS</b> .....	41
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	48
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	51
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
	<b>APÊNDICE A – Casos sem diagnóstico histológico de rejeição</b> .....	59

<b>APÊNDICE B</b> – Casos suspeitos de rejeição.....	60
<b>APÊNDICE C</b> – Casos suspeitos de rejeição com marcação para C4d maior que 10%.....	62
<b>APÊNDICE D</b> – Casos suspeitos de rejeição com marcação para C4d menor que 10%.....	63

## INTRODUÇÃO

A primeira demonstração de sucesso em transplante renal ocorreu em 1902, quando Emerich Ullmann apresentou, em Viena, um cão com autotransplante no pescoço de um rim que se manteve funcionando por cinco dias (Ullmann, E. 1902). Pouco tempo depois, Ullmann enxertou pela primeira vez em humanos o rim de um porco, porém o procedimento cirúrgico foi mal sucedido (Druml, W. 2002).

Utilizando novas técnicas de sutura de vasos desenvolvidas pelo cirurgião Alexis Carrel, Mathieu Jaboulay, em 1906, implantou um rim de porco e outro de cabra em dois pacientes com falência renal crônica, entretanto os órgãos perderam a função dentro de uma hora (Jaboulay, M. 1906). Outras tentativas foram então realizadas por alguns pesquisadores até que, em 1936, na Ucrânia, Yuriy Yurievich Voronoy transplantou o primeiro rim humano. O órgão era ABO-incompatível e nunca funcionou, todavia seus vasos se mantiveram patentes, o que foi verificado durante a necropsia, dois dias após (Hamilton, DN. 1984).

Em 1945, um grupo de urologistas de Boston e um cirurgião, David Hume, implantaram um rim de cadáver humano na axila de uma jovem mulher comatosa, com falência renal aguda devido à septicemia. O rim manteve-se funcionando por vários dias e foi então retirado quando a paciente recuperou a atividade de seu órgão (Murray, J. 1994). Tal fato permitiu a realização de outros implantes temporários subsequentes.

Dando continuidade aos seus estudos, interessado em compreender o papel do sistema imune, Dr. Hume realizou, entre 1951 a 1953, nove transplantes renais em pacientes sem imunossupressão. Um destes enxertos permaneceu viável por seis meses (Hume, DM. 1955).

Com o tempo, ficava cada vez mais clara a participação do sistema imunológico no processo de rejeição. Assim, em 1955, a equipe de médicos de Boston, chefiada por Joseph Murray, realizou os primeiros transplantes renais entre gêmeos idênticos, sem a necessidade da utilização de imunossupressores. Tal procedimento, contudo, não se mostrou isento de complicações. Um grande problema observado neste momento foi a recorrência da doença de base, principal causa de insucesso no transplante entre gêmeos univitelinos. Décadas mais tarde, em 1990, Dr. Murray recebeu o Prêmio Nobel por esse fato (Murray, J. 1994; Stefoni, S. 2004).

Paralelamente aos avanços ocorridos em transplante renal, vários estudos eram realizados na tentativa de minimizar a ação da auto-imunidade contra outros órgãos

enxertados, como, por exemplo, a pele. Foram, então, desenvolvidas novas drogas e estabelecidos esquemas terapêuticos capazes de modular a resposta imune do receptor.

No Brasil, o primeiro transplante renal ocorreu em 1964, no Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro, em um jovem de dezoito anos. Três anos após, em Ribeirão Preto, ocorreu o primeiro transplante com doador vivo no país. Desde então, novos centros transplantadores foram criados e inúmeros procedimentos passaram a ser realizados (Coelho, JC. 2010).

Assim, a partir da década de 60, o transplante renal passou a ser utilizado em todo o mundo como terapia substitutiva em larga escala para pacientes com falência do órgão. A partir desse momento, uma preocupação constante tem sido quanto ao surgimento da rejeição, a mais temida intercorrência, levando à necessidade de uma vigilância rigorosa e à busca de sua prevenção.

Nesse sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos que permitam detectar precocemente o evento, de modo a postergar ou mesmo retardar a perda do enxerto.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Terapia anti-rejeição

Desenvolvidos a partir de 1959, os agentes imunossupressores aumentaram substancialmente a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes. Nos últimos 10 anos, o uso desses fármacos, particularmente os inibidores da calcineurina, permitiu expressiva diminuição da rejeição aguda, de uma taxa de 50% a 10%, na atualidade (Sementilli, A. 2008). Entretanto, a imunossupressão à qual esses pacientes precisam ser submetidos traz consigo um largo espectro de efeitos indesejados, que varia desde a toxicidade medicamentosa até a predisposição a processos infecciosos, inclusive acometendo o próprio órgão transplantado. Deste modo, um grande desafio é estabelecer a terapêutica adequada de modo a prevenir a rejeição do enxerto promovendo, ao mesmo tempo, o menor efeito colateral possível.

A maioria dos protocolos indica os inibidores da calcineurina, como a ciclosporina e o tacrolimus, associados ou não a corticosteróides e micofenolato de mofetil ou azatioprina, como esquema imunossupressor de primeira linha. Porém, todas essas drogas possuem grande potencial de complicações, sendo algumas inclusive nefrotóxicas.

Graças à terapia anti-rejeição e à redução das complicações infecciosas, a sobrevida do paciente transplantado, bem como a do enxerto, aumentou drasticamente nas últimas três décadas, especialmente no primeiro ano pós-transplante. Todavia, a queda da incidência da perda do enxerto em longo prazo se mostrou menos significativa durante esse período (Lasmar, EP. 2005; Towns, G. 2011).

## 1.2. A biópsia renal

A despeito do uso de uma terapia imunossupressora adequada, é mandatório o acompanhamento clínico rigoroso do paciente transplantado. É imprescindível a vigilância quanto aos indícios de rejeição do enxerto que consistem, na maioria dos casos, em febre, dor no local da cirurgia, diminuição da diurese e aumento da creatinina sérica. Entretanto, estes geralmente são sintomas e sinais tardios, o que torna necessário o rastreamento mais precoce desta condição. Para tal, sabe-se que a biópsia renal é o exame padrão-ouro (Colvin, RB. 2007; Rajan, P. 2008).

Com base nos achados anatomopatológicos é possível o diagnóstico diferencial entre os episódios de rejeição e outras condições, tais como toxicidade medicamentosa, processos infecciosos, recorrência da doença inicial e necrose tubular aguda. Além disso, o procedimento ajuda a adequar a terapia anti-rejeição a cada caso.

Segundo critérios de adequação (Racusen, LC. 1999), uma amostra com menos de sete glomérulos e nenhuma secção de artéria é considerada insatisfatória e adequada quando contar com 10 ou mais glomérulos e pelo menos duas secções arteriais. Os casos intermediários são classificados como marginais.

Visando uma adequada avaliação, é utilizada a coloração Hematoxilina e Eosina (HE) além de corantes especiais, como Ácido Periódico de Schiff (PAS), Prata Metenamina de Jones e Tricromia de Masson ou variantes, em cortes histológicos com espessuras de 3 a 4 µm. É necessário um mínimo de sete lâminas (três coradas em HE, três em PAS ou Prata de Jones e uma em Tricromia de Masson), com quatro ou mais cortes por lâmina (Sementilli, A. 2008).

Realiza-se também, rotineiramente, o estudo das amostras através da microscopia de imunofluorescência e, quando necessário, técnicas de imuno-histoquímica, ambas capazes de caracterizar os tipos de rejeição e excluir diagnósticos diferenciais, além de permitir a detecção de processos infecciosos associados. Outras ferramentas úteis em algumas situações específicas são a hibridização *in situ* e a microscopia eletrônica, que disponibilizam observações mais detalhadas e específicas.

A coleta do material deve ser guiada por ultrassonografia, utilizando agulhas de calibre 16 ou 18 e ser realizado por profissional habilitado, para garantir maior segurança e permitir uma amostragem adequada do material (Mahoney, MC. 1993).



No contexto do transplante renal, é comum realizar-se biópsia do enxerto antes de seu implante ou imediatamente após o descamplamento de seus vasos (biópsia de “tempo zero”), a fim de se avaliar a adequabilidade do órgão e identificar lesões do doador, e a critério clínico, no acompanhamento do paciente. Neste último caso, a realização da biópsia ocorre quando há aumento nos valores da creatinina sérica do paciente, um preditor, embora tardio, de disfunção do enxerto (Racusen, LC. 2006).

Entretanto, os episódios de rejeição aguda e a rejeição crônica podem ser eventos subclínicos. Além disso, a persistência do processo inflamatório após surtos de rejeição pode resultar em disfunção renal. Assim, faz-se necessário a realização de biópsias protocolares, realizadas periodicamente, independentemente da evolução clínica do paciente.

### 1.3. Rejeição do enxerto

Além da técnica cirúrgica e da terapia anti-rejeição, o sucesso do transplante depende de alguns fatores, como as condições do enxerto avaliadas pela biópsia de “tempo zero”, a doença de base, as características do doador (cadáver, vivo aparentado ou vivo não aparentado), a histocompatibilidade entre este e o receptor, idade e cor da pele de ambos e a ocorrência ou não de episódios prévios de rejeição aguda, dentre outros (Colvin, RB. 2007).

Considerando-se seu tempo de evolução e as alterações histopatológicas, o processo de rejeição é classificado como agudo, incluindo rejeição hiperaguda, ou crônico. Quanto à sua etiologia, o agravo pode ser mediado por anticorpos presentes na circulação sanguínea do receptor contra antígenos do doador (Terasaki, PI. 2003) ou pela ação celular. Estas células, linfócitos T, agredem o parênquima do órgão de forma direta ou através da produção e liberação de citocinas.

#### 1.3.1. Rejeição hiperaguda

A rejeição hiperaguda desenvolve-se de forma abrupta, frequentemente minutos ou horas após o transplante, e ocorre devido à oclusão trombótica de grandes vasos do enxerto. Anticorpos do receptor, previamente formados, atacam o endotélio do órgão transplantado ativando o sistema complemento e a cascata de coagulação e promovendo sua isquemia. É uma intercorrência rara, porém extremamente grave por causar inevitavelmente a perda precoce do enxerto (Puttarajappa, C. 2012).

Considera-se a rejeição hiperaguda como uma variação da rejeição humoral aguda, na qual os níveis séricos excessivamente elevados de anticorpos contra aloantígenos da superfície do endotélio renal são capazes de desencadear uma reação imediata, ainda no momento da reperusão do órgão.

Clinicamente, observa-se o surgimento de febre elevada, anúria e baixa perfusão renal. As alterações laboratoriais mostram trombocitopenia e aumento dos produtos da degradação da fibrina (Kohler, TR. 1982).

O enxerto torna-se cianótico e amolecido ainda na sala de cirurgia, apesar da boa pulsação dos vasos hilares (Williams, GM. 1968). Posteriormente, o órgão mostra-se inchado, com necrose hemorrágica cortical difusa e congestão medular. É comum a presença de focos de calcificação distrófica no parênquima e trombos em grandes vasos (Williams, GM. 1968).

Microscopicamente, as alterações são semelhantes àquelas vistas na rejeição humoral aguda grave. Ocorre acúmulo de neutrófilos e plaquetas no endotélio de capilares glomerulares e peritubulares, cujas luzes mostram-se preenchidas por restos celulares e fibrina (Williams, GM. 1968). O interstício é edemaciado e hemorrágico. Em doze a quatorze horas, a camada cortical sofre necrose, enquanto a medular encontra-se relativamente preservada, até que o processo de necrose se dissemina (Kissmeyer-Nielsen, F. 1966). Notam-se microtrombos em arteríolas e glomérulos por todo o órgão, porém o infiltrado mononuclear intersticial é escasso.

### 1.3.2. Rejeição aguda

A rejeição aguda (RA) é evento comum no pós-transplante recente e tardio, sendo a forma mais frequente de rejeição nas primeiras semanas após o procedimento. Sua incidência cai depois dos primeiros seis meses, entretanto a reincidência não é incomum. Atualmente, em decorrência dos avanços científicos das últimas décadas, a RA ocorre em menos de 10% dos transplantes realizados (Towns, G. 2011).

Caracteriza-se histopatologicamente pela presença de endotelite, arterite e inflamação de túbulos e do interstício em resposta a mecanismos algumas vezes distintos. Inúmeros estudos mostram que as diferentes lesões histológicas da RA, especialmente quanto à localização do infiltrado inflamatório, correlacionam-se com a reversibilidade do quadro após o uso de corticosteróides e com a sobrevida do enxerto (Haas, M. 2002).

Quando expressa por fatores humorais, a RA está associada à presença de anticorpos específicos circulantes contra o endotélio capilar do doador, capazes de ativar a cascata do sistema complemento. A rejeição celular, por sua vez, é baseada no achado histológico de linfócitos T CD4 + e, em menor proporção, CD8 + em túbulos e no interstício (Hippen, 2005). Estas células atacam diretamente o parênquima e o endotélio renal ou promovem a liberação de citocinas, que desencadeiam resposta inflamatória e recrutam anticorpos.

A coexistência da ação humoral e celular, entretanto, não é um fato incomum (Colvin, RB. 2007).

### 1.3.3. Rejeição celular aguda

A rejeição celular aguda (RCA) ocorre mais comumente nas primeiras semanas após o transplante e tem como principais fatores predisponentes a histocompatibilidade entre o receptor e o doador e a ocorrência de exposição antigênica prévia, seja por transplantes, gravidezes ou transfusões sanguíneas anteriores (Cecka, JM. 2003; Lorenz, M. 2004). Afeta o interstício, túbulos, vasos e glomérulos, isoladamente ou em conjunto.

Macroscopicamente, a RCA é responsável pelo aumento em até três vezes da massa do órgão, que se torna descorado e inchado devido à isquemia e ao edema. Aos cortes, o córtex é pálido e a medula congesta. É comum a presença de petéquias e áreas corticais de infarto. O ureter pode exibir edema e necrose hemorrágica (Porter, KA. 1965).

À microscopia óptica, observa-se infiltrado de linfócitos T ativados e monócitos em um interstício edemaciado, nos túbulos e, nos casos mais severos, nos glomérulos e na camada íntima das arteríolas. Hemorragia e necrose também podem estar presentes.

O acometimento glomerular ocorre em algum grau em 10% das biópsias com diagnóstico de RCA (Trpkov, K. 1996), recebendo o nome de *glomerulite do transplante*. O glomérulo mostra-se hiper celular, com alargamento das células endoteliais e infiltrado mononuclear. Não ocorre a formação de crescentes e trombos são raros.

Os túbulos mostram macrófagos e linfócitos entremeados às células epiteliais, destacando-se por apresentarem núcleos menores e mais escuros, o que caracteriza a tubulite. Tal achado pode ser melhor evidenciado pela coloração PAS, que delimita a membrana basal tubular, em combinação com a imunomarcagem para CD3 ou CD5, capaz de destacar os linfócitos T (Resch, L. 2002). Apesar de qualquer porção tubular poder ser afetada, é mais comum o envolvimento dos túbulos distais.

O infiltrado intersticial é composto por células T ativadas e macrófagos, quase exclusivamente. Porém, podem ser encontrados plasmócitos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, além de neutrófilos. Estes últimos, quando presentes, indicam atividade do processo e, se em grande quantidade, devem chamar a atenção para a possibilidade de rejeição

humoral ou pielonefrite. A presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup> é mais comum permeando difusamente o córtex renal, enquanto células T CD4<sup>+</sup> se dispõem em agregados perivasculares.

O acúmulo de células mononucleares no endotélio de artérias e arteríolas é a lesão patognomônica da RCA (Racusen, LC. 1999; Nickleit, V. 1998). É composto predominantemente por linfócitos T, monócitos e macrófagos, sendo incomum a presença de linfócitos B. Pode ocorrer na ausência de infiltrado intersticial ou de tubulite, o que indica ser resultado de um mecanismo patogênico distinto. Está presente entre 18% e 56% dos casos de rejeição celular aguda (Nickleit, V. 1998) e acomete preferencialmente grandes artérias, apesar de vasos de todos os calibres poderem estar envolvidos.

A lesão vascular da RCA promove ruptura e levantamento do endotélio arterial de sua membrana basal devido à deposição de linfócitos T e macrófagos. A célula endotelial mostra-se ativada, com um citoplasma aumentado e basofílico. Segundo critérios de Banff e do *National Institute of Health (NIH) Cooperative Clinical Trials in Transplantation (CCTT)*, apenas uma célula mononuclear sob o endotélio é suficiente para o diagnóstico (Racusen, LC. 1999). Necrose fibrinóide está frequentemente associada à RCA.

A imunofluorescência mostra pouca ou nenhuma deposição de imunoglobulina. Nota-se a presença de fibrina em interstício e, às vezes, proeminente deposição de C3 na membrana basal tubular.

#### 1.3.4. Rejeição humoral aguda

A rejeição humoral aguda (RHA) ocorre em pacientes sensibilizados que produzem anticorpos específicos antidoador durante ou logo após o transplante, ao contrário do que ocorre na rejeição hiperaguda, que se desenvolve imediatamente após a reperfusão, em resposta à presença de anticorpos pré-existentes. Sua ocorrência pode ser um processo isolado, entretanto não raramente está associada à rejeição mediada por células T (Collins, AB. 1999).

A presença de anticorpos específicos antidoador circulantes está associada ao surgimento de rejeição humoral (Sementilli, A. 2008) e, conseqüentemente, a um pior prognóstico do enxerto (Feucht, HE. 1991; Feucht, HE. 1993). Entretanto, apenas alguns tipos específicos desses anticorpos são capazes de desencadear o processo. Assim, torna-se

evidente a necessidade do desenvolvimento de técnicas que estratifiquem tal risco, permitindo identificar pacientes susceptíveis e adequar o tratamento a cada caso (Mengel, M. 2012).

A RHA se desenvolve mais comumente de uma a três semanas após o transplante, porém pode ser observada em qualquer momento. Em geral, 5 a 7% dos pacientes transplantados apresentam pelo menos um episódio e, entre todos os casos de rejeição aguda, 24% evidenciam causa humoral (Colvin, RB. 2007).

Os principais fatores de risco para o surgimento de RHA, assim como na RCA, são a exposição antigênica prévia, seja por transfusões sanguíneas, gravidezes ou transplantes anteriores, e a ausência de histocompatibilidade entre doador e receptor (Cecka, JM. 2003; Lorenz, M. 2004).

As alterações histopatológicas associadas são muito variáveis e insuficientes isoladamente para definição diagnóstica. Alguns achados morfológicos, tais como presença de necrose fibrinóide, trombos e leucócitos polimorfonucleares em capilares peritubulares são comuns, porém não são indicadores sensíveis ou específicos (Collins, AB. 1999). Assim, a presença do imunomarcador C4d em parede de vasos e a detecção de anticorpos antidoador se fazem necessários para confirmação dos casos (Feucht, HE. 1991; Feucht, HE. 1993; Collins, AB. 1999; Solez, K. 2008).

Macroscopicamente, o rim acometido pela RHA apresenta-se edemaciado e congesto. Por vezes, observa-se hemorragia generalizada e áreas focais de infarto.

À microscopia óptica, observa-se permeação dos capilares glomerulares por neutrófilos em 10 a 55% dos casos e por mononucleares, predominantemente monócitos e macrófagos, em 19 a 90%. Pode-se notar necrose e formação de trombos de fibrina nos capilares (Trpkov, K. 1996).

Dano tubular é comum, podendo ser um evento isolado na RHA. Não rara é a ocorrência de necrose de células tubulares e tubulite, principalmente pela permeação por polimorfonucleares, pode ser notada. Entretanto, a tubulite por mononucleares caracteriza a rejeição mediada por células T.

O interstício apresenta-se edemaciado, com escasso infiltrado mononuclear, sendo que a presença de macrófagos é mais comum nos casos em que o marcador C4d é positivo (Magil, AB. 2003). Agregados de linfócitos B podem ocorrer, porém não está comprovada sua associação com rejeição mediada por anticorpos. Pode-se notar ainda hemorragia intersticial e infarto cortical.

Os capilares peritubulares, assim como na rejeição hiperaguda, podem estar permeados por neutrófilos e estão frequentemente dilatados. Em alguns casos, as arteríolas

mostram acúmulo de material fibrinóide eosinofílico, fragmentação da camada elástica e células mononucleares em adventícia e na íntima.

#### 1.3.5. Rejeição crônica

A rejeição crônica (RC) resulta da continuidade da agressão do enxerto pelo sistema imune do receptor devido à recorrência ou a persistência de episódios de RA e é uma importante causa de falência do órgão em longo prazo (Roufosse, CA. 2012). Cerca de 20% dos enxertos são perdidos devido à RC nos primeiros dez anos após o transplante.

Sua incidência é rara no primeiro ano, em torno de 4%, entretanto 20% dos pacientes desenvolvem esse tipo de rejeição após o quinto ano de transplante (Sementilli, A. 2008). A frequência com que a RC ocorre não tem mostrado uma redução significativa, apesar da expressiva queda no número de episódios de RA observada nos últimos tempos (Townes, G. 2011).

O enxerto rejeitado cronicamente apresenta coloração pálida e aspecto fibrótico, com cápsula espessada e aderente. O peso do órgão está normal, mas pode mostrar-se aumentado, devido à hipertrofia compensatória prévia. Na junção córtico-medular é possível observar espessamento e obliteração das arteríolas arqueada e interlobares. Além disso, os vasos hilares podem exibir fibrose intimal e espessamento parietal.

Microscopicamente, a RC caracteriza-se pelo desenvolvimento de fibrose do parênquima renal, associada à atrofia tubular focal ou difusa, duplicação e espessamento da membrana basal glomerular, denominada glomerulopatia crônica do transplante, e presença de infiltrado mononuclear em quantidade variável (Sementilli, A. 2008; Puttarajjapa, C. 2012). Episódios prévios de RA promovem a proliferação de fibroblastos no interstício e aterosclerose acelerada que resulta em oclusão arterial.

Os túbulos atróficos mostram-se permeados por escassos linfócitos mononucleares e mastócitos, entretanto quando o infiltrado permeia túbulos tróficos, deve-se atentar para rejeição ativa mediada por células T. A mesma suspeita deve ser aventada na evidência de edema e de infiltrado mononuclear extenso em interstício. Esclerose glomerular segmentar ou global também pode ser observada.

É importante atentar para o fato de que fibrose intersticial e atrofia tubular é a via final para todas as doenças renais, independente da etiologia, sendo necessário descartar outras condições que podem ser causas de confusão diagnóstica (Townes, G. 2011).

As alterações arteriais surgem precocemente, às vezes ainda no primeiro mês após o transplante, e consistem em proliferação acentuada e espessamento da camada íntima com estreitamento luminal, associado a leve infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos T CD3+ e macrófagos.

A quantidade de capilares peritubulares mostra-se reduzida, restando apenas traços de suas membranas basais. É comum a presença de infiltrado mononuclear e figuras de apoptose nos capilares remanescentes, fato indicativo de atividade imunológica. O dano em capilares peritubulares está diretamente relacionado com a extensão da fibrose intersticial e com a perda da função do enxerto.

Da mesma forma como ocorre na RA, a RC pode ser mediada por células T ou pela ação de anticorpos.

#### 1.3.6. Rejeição humoral crônica

Para o diagnóstico dessa modalidade de rejeição é imprescindível a coexistência de comprovação histológica de lesão crônica, evidências da ação humoral e a presença de níveis séricos elevados de anticorpos contra antígenos do doador (Sementilli, A. 2008; Sis, B. 2010; Puttarajjapa, C. 2012).

Além dos achados típicos de cronicidade, a rejeição humoral crônica (RHC) difere da RHA devido à ausência de processo inflamatório agudo, caracterizado pela presença de infiltrado neutrofílico e formação de edema, necrose e trombose.

Estudo recente mostra que a multilaminação da membrana basal de capilares peritubulares, avaliada pela microscopia eletrônica, precede o surgimento da glomerulopatia do transplante e, assim, seria um indicador precoce da presença de rejeição humoral crônica (Roufosse, CA. 2012).



### 1.3.7. Rejeição celular crônica

O critério diagnóstico de rejeição celular crônica (RCC) baseia-se no indício de lesão persistente associada à presença de células T no interstício, túbulos, glomérulos e na camada íntima arterial.

Arteriopatia crônica do enxerto, definida pela presença de fibrose íntima arterial com infiltração mononuclear, indica rejeição crônica ativa mediada por células T (Townes, G. 2011).

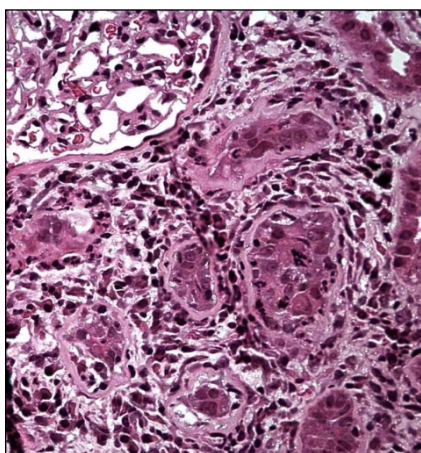


Figura 1 – Biópsia 8451/08. Rejeição aguda: infiltrado inflamatório intersticial e tubulite.

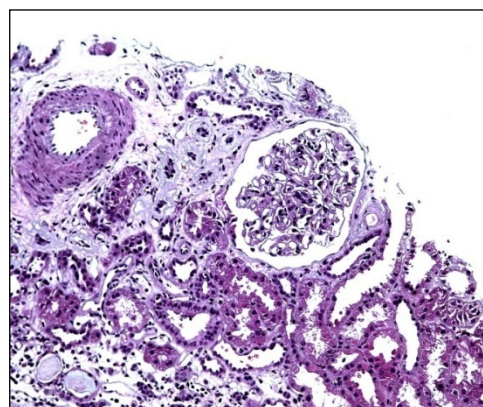


Figura 2 – Biópsia 0454/09. Fibrose intersticial e atrofia tubular.

#### 1.4. Diagnósticos diferenciais de rejeição

Apesar da principal preocupação de clínicos e patologistas ser o surgimento do processo de rejeição, deve-se ter em mente outros mecanismos que também possam resultar em disfunção e perda do enxerto e que, inclusive, podem estar associados à imunossupressão à qual esses pacientes são submetidos.

Os sinais e sintomas, por vezes, podem se confundir, entretanto cabe ao patologista distinguir as diferentes formas de lesão. Deste modo, é imprescindível o contato interdisciplinar, visando o estabelecimento de correlação clínica.

Além da rejeição do órgão transplantado, são causas de disfunção: toxicidade medicamentosa; ocorrência de necrose tubular aguda; lesões por deficiência na perfusão do enxerto, inclusive estenoses e trombozes de artérias e veias de grande calibre; infecções; obstrução urinária; doença linfoproliferativa pós-transplante e recidiva da doença original.

### 1.5. Classificação de Banff

Com o passar do tempo, critérios morfológicos de rejeição aguda e crônica foram definidos e sistemas de classificação criados no intuito de orientar o diagnóstico e a terapêutica imunossupressora. Entretanto, a variedade de critérios e nomenclaturas trazia grande confusão e evidenciava a necessidade da criação de uma linguagem única.

Assim, visando padronizar a interpretação da histopatologia do transplante renal e facilitar a comunicação entre médicos patologistas e destes com os clínicos, foi formulada em 1991, na cidade de Banff, no Canadá, e publicada em 1993, uma classificação que passou a ser utilizada internacionalmente. Composto por nefrologistas e patologistas e aberto a novos participantes, o grupo de estudiosos passou a se reunir periodicamente com o intuito de reformular a classificação, acrescentando novos instrumentos diagnósticos e redefinindo conceitos (Solez, K. 2010).

A revisão realizada no ano de 1997 e publicada em 1999 incorporou os critérios do *National Institute of Health (NIH) Cooperative Clinical Trials in Transplantation (CCTT)*, classificando endarterite em uma categoria a parte, e separou rejeição aguda vascular da túbulo-intersticial (Racusen, L. 1999).

Em 2003, foi conceituada a rejeição mediada por anticorpos (Racusen, L. 2004). Quatro anos após, com publicação em 2008, instituiu-se a pesquisa do marcador C4d na confirmação de rejeição mediada por anticorpos, caracterizou-se mais claramente rejeição celular e humoral e extinguiu-se o termo *nefropatia crônica do enxerto* (Solez, K. 2008).

Os quatro elementos quantificados pela Classificação de Banff são: tubulite (t), infiltrado mononuclear cortical (i), inflamação vascular, incluindo arterite intimal ou inflamação transmural (v) e infiltrado glomerular por células mononucleares (g). O quadro a seguir especifica a graduação de cada categoria.

Quadro 01 – Critérios quantitativos segundo Banff 2007.

<b>Tubulite</b>	
t0	Ausência de mononucleares
t1	1- 4 mononucleares por secção tubular
t2	5-10 mononucleares por secção tubular
t3	>10 mononucleares por secção tubular
<b>Inflamação intersticial</b>	
i0	Ausência de inflamação significativa
i1	10 – 25% de inflamação cortical
i2	26 – 50% de inflamação cortical
i3	>50% de inflamação cortical
<b>Inflamação arterial</b>	
v0	Ausência de inflamação
v1	< 25% do lúmen
v2	> 25% do lúmen
v3	Inflamação transmural ou necrose fibrinóide
<b>Glomerulite</b>	
g0	Ausência de glomerulite
g1	Glomerulite em < 25% dos glomérulos
g2	Glomerulite em 25 - 75% dos glomérulos
g3	Glomerulite em > 75% dos glomérulos

Baseado em Jennette JC, Heptinstall, RH. Pathology of the kidney. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007.

Após avaliação de cada item, classifica-se a biópsia do enxerto em:

1. *normal*;
2. *alterações mediadas por anticorpos*, incluindo marcação positiva para C4d sem alteração histopatológica associada, rejeição aguda e rejeição crônica;
3. *borderline*;
4. *rejeição mediada por células T*;
5. *fibrose intersticial e atrofia tubular sem etiologia definida*;
6. *outras alterações não relacionadas ao processo de rejeição*, como doenças infecciosas, obstrução urinária, toxicidade medicamentosa e hipertensão arterial.

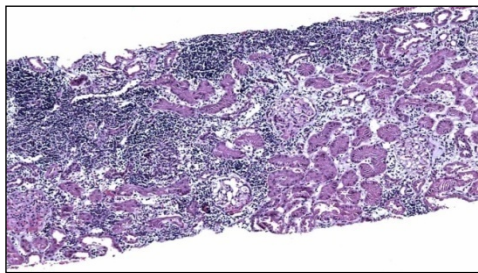


Figura 3 – Biópsia 2522/07. O infiltrado inflamatório acomete mais de 50% do parênquima cortical (i3).

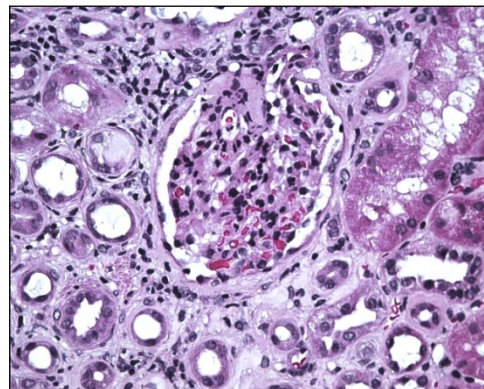


Figura 6 – Biópsia 3076/07. Glomerulite: alargamento mesangial e aumento da celularidade à custa de um infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear.

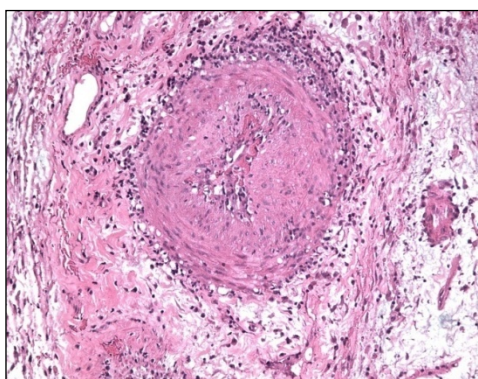


Figura 4 – Biópsia 2259/07. Endotelite: infiltrado inflamatório polimorfo e mononuclear circundando uma arteríola e agredindo seu endotélio.

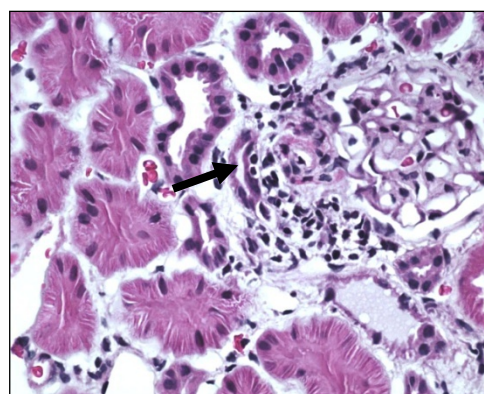


Figura 7 – Biópsia 3439/07. Tubulite: dois linfócitos permeando parede tubular (t1).

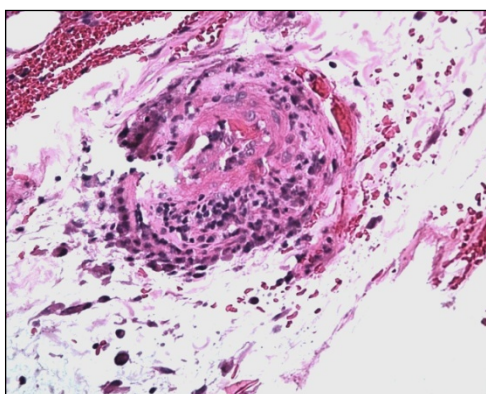


Figura 5 – Biópsia 2259/07. Infiltrado inflamatório mononuclear transmural.

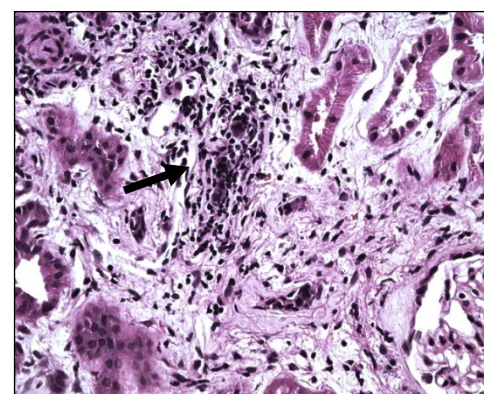


Figura 8 – Biópsia 6353/07. Tubulo renal destruído por infiltrado inflamatório mononuclear acentuado (t3).

## 1.6. Marcadores imuno-histoquímicos

### 1.6.1. CD3 e CD5

São anticorpos utilizados rotineiramente em Anatomia Patológica, especialmente na subtipagem de neoplasias linfóides, ambos capazes de identificar a presença de células T.

Desta forma, em biópsias renais com diagnóstico de rejeição, são ferramentas úteis para indicar a participação celular no processo.

### 1.6.2. CD20

O anticorpo anti-CD20 mostra-se eficaz na demonstração da presença de linfócitos B nos tecidos. No contexto do transplante renal, parece ser indicador da participação celular no processo de rejeição, já que tais células expressam a molécula de MHC classe II, responsável pela apresentação de antígenos aos linfócitos T CD4 + (Zarkhin, V. 2008). Após sua diferenciação em plasmócitos secretores de anticorpos, entretanto, tais células perdem a expressão da molécula CD20 de sua membrana (Sarwal, M. 2003), não sendo mais identificada em reações imuno-histoquímicas.

As células CD20 positivas ocorrem em dois padrões: dispersas no interstício ou em aglomerados. Considera-se sua positividade quando a marcação é expressa em aglomerados celulares intersticiais. Traços de marcação dispersos devem ser considerados negativos.

Além disso, é fundamental para a interpretação desses dados a correlação com a expressão do imunomarcador C4d e com a presença de anticorpos circulantes específicos contra o doador.

Grupamentos de células B CD20 positivas provenientes do receptor são encontrados na rejeição aguda (Sarwal, M. 2003) e correlacionam-se a um pior prognóstico, pois sua presença está associada a uma resposta insatisfatória ao uso de corticóides e, consequentemente, a uma menor sobrevida do enxerto (Hippen, BE. 2005; Sarwal, M. 2003).

Martins, HL e cols. demonstraram, em uma análise de 38 biópsias renais, que todos os casos de rejeição, aguda ou crônica, foram positivos para esse marcador, enquanto rins normais se mostraram negativos. Entretanto, maior positividade foi detectada nos casos com diagnóstico de rejeição aguda e, nestes, houve correlação com o aumento da creatinina sérica (Martins, HL. 2009).

Deste modo, a identificação de linfócitos B CD20 positivos, além de auxiliar na compreensão do processo de rejeição do enxerto, é um recurso de grande importância não apenas em prever o prognóstico, mas também ao orientar a conduta mais adequada.

### 1.6.3. C4d

C4d é o produto da degradação do fator C4 da via clássica da cascata do complemento e deposita-se no endotélio de capilares peritubulares. Foi primeiramente demonstrado por Feucht e colaboradores (Feucht, HE. 1991; Feucht, HE. 1993) e está relacionado a alto risco imunológico para rejeição e, nos casos com diagnóstico confirmado, a um pior prognóstico (Nickeleit, V. 2003; Ranjan, P. 2008). Entretanto, também pode ser expresso independentemente da formação de anticorpos, por uma via alternativa. Essa característica promove sua positividade em biópsia renal em outras condições patológicas, em tecido renal normal e, inclusive, em casos de rejeição mediada por células T. O que define, nestes casos, especificidade para rejeição humoral é o percentual de positividade do marcador nos fragmentos analisados e a presença de anticorpos específicos contra o doador na circulação sanguínea do receptor, além da exclusão das demais situações (Solez, K. 2008).

Na prática histopatológica, sua avaliação é feita através da técnica de imunofluorescência e pela imuno-histoquímica e seu uso é rotineiro nos grandes centros diagnósticos. Toda biópsia de enxerto deve ser corada para C4d (Solez, K. 2008), já que o diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos considera a positividade em imuno-histoquímica ou imunofluorescência para este anticorpo.

Entretanto, algumas diferenças entre os dois métodos devem ser consideradas no momento da interpretação dos resultados. Nesse sentido, alguns estudos mostram que a imuno-histoquímica é menos sensível do que a imunofluorescência (Seemayer, CA. 2007; Nadasdy, GM. 2005). Esta última frequentemente revela um padrão difuso em biópsias



coradas apenas focalmente pelo primeiro método. Deste modo, na presença de positividade focal pela imuno-histoquímica, deve-se, se possível, retestar a amostra utilizando a técnica de imunofluorescência.

Além disso, em tecidos fixados em parafina e submetidos à imuno-histoquímica, o C4d costuma ser positivo em glomérulos normais, ao passo que, nos cortes congelados da imunofluorescência, é o mesângio normal que costuma ser corado.

Em estudos retrospectivos, entretanto, torna-se impraticável a realização da técnica de imunofluorescência, já que esta necessita de cuidados especiais de transporte e manutenção da amostra, restando como único recurso a análise imuno-histoquímica.

A positividade para C4d se correlaciona com o percentual da área da biópsia marcada: quando não há marcação, o método é considerado negativo; 1 a 10% de marcação corresponde a uma positividade mínima; 10 a 50%, focal e, quando maior que 50%, difusa (Solez, K. 2008).

Marcação difusa em capilares peritubulares para C4d é considerada positiva (Racusen, LC. 2003). O significado clínico da marcação focal, todavia, ainda é debatido, mas sabe-se que está relacionada com a presença de capilarite peritubular, bem como glomerulite.

Na RHA, a expressão de C4d se dá de forma difusa, linear e circunferencial na parede de capilares peritubulares, com intensidade variada. A presença de marcação intersticial e intraluminal deve ser interpretada como artefato de fixação (Solez, K. 2008).

Durante a penúltima reunião de Banff, realizada em 2009, convencionou-se que o diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos deve exigir, ao menos, uma positividade para C4d difusa pela imunofluorescência ou focal através da imuno-histoquímica, associada à presença de alterações histológicas sugestivas de agressão humoral e da constatação de anticorpos séricos contra antígenos do doador (Sis, B. 2010).

Após o desaparecimento dos anticorpos circulantes antidoador, a expressão de C4d tende a tornar-se negativa em sete a oito dias.

Assim como na RHA, sua deposição ocorre em capilares peritubulares, com mesmo padrão, e nos glomérulos na rejeição hiperaguda e em até 50% dos casos de rejeição crônica. Nestes casos, entretanto, poucos capilares mostram-se positivos para o marcador.

Atualmente, a existência rejeição mediada por anticorpos cursando com negatividade para C4d tem sido aceita e debatida amplamente (Haas, M. 2011; Mengel, M. 2012).

Pacientes com inflamação sub-clínica persistente da microvasculatura, caracterizada pela presença de capilarite e/ou glomerulite, apesar de submetidos ao processo de remodelamento vascular crônico e, conseqüentemente, com diagnóstico histológico de



rejeição crônica, costumam apresentar-se com C4d negativo. Nesses casos, ainda assim deve-se avaliar a possibilidade de rejeição mediada por anticorpos (Mengel, M. 2012).

Portanto, torna-se clara a necessidade de novos estudos que melhor caracterizem o comportamento deste marcador.

#### 1.6.4. CD68

O marcador imuno-histoquímico CD68 é um instrumento útil na detecção de macrófagos.

Na rejeição celular, estas células dispõem-se ao redor dos túbulos, frequentemente em arranjos lineares, margeando suas bordas, e podem ser o leucócito predominante (Hancock, WW. 1983; Grimm, PC. 1999). Além disso, a presença de macrófagos CD68+ parece estar associada ao surgimento de sintomas, já que é menos expressiva nos casos subclínicos (Grimm, PC. 1999).

#### 1.6.5. CD25 e FoxP3

A tolerância imunológica periférica ocorre, dentre outros fatores, devido à ação supressora que as células T regulatórias (Tregs) exercem sobre as células T efetoras. Assim, com sua ativação e função inibidas, as células T efetoras são incapazes de atacar antígenos.

As células Tregs podem ser naturais, produzidas no timo, ou adaptativas, geradas periféricamente em resposta a estímulos antigênicos. As Tregs naturais apresentam em sua superfície a molécula CD25, que age como receptora da interleucina-2 (IL-2). Ainda como constituinte de sua estrutura, as Tregs possuem o fator nuclear *forkhead box P3* (FoxP3), fundamental para seu desenvolvimento e função (Melo, KM. 2009).

Deste modo, tais moléculas são de grande importância na identificação de linfócitos Tregs, embora tal utilidade seja ainda pouco explorada.

Assim, a positividade desses imunomarcadores em biópsias de enxerto indicaria supressão da reação mediada por linfócitos T e, conseqüentemente, do processo de rejeição celular.

Entretanto, o CD25 não é expresso apenas na superfície de células T regulatórias, podendo estar presente em linfócitos T ativados. Além disso, recentemente foi demonstrado em humanos a existência da molécula FoxP3 também em algumas dessas células efetoras (Tran, DQ. 2007).

Por outro lado, a expressão do fator nuclear parece ser induzida, inclusive, em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> periféricas, sob estímulo de algumas citocinas, fornecendo a esses linfócitos propriedades regulatórias (Naka, EL. 2008).

Portanto, o papel desses mecanismos reguladores no contexto do transplante de órgãos não está totalmente esclarecido e ainda precisa ser melhor elucidado (Naka, EL. 2008). Estudos experimentais com células Tregs demonstraram uma ação protetora ao enxerto, possibilitando o desenvolvimento de um estado de tolerância imunológica (Graca, L. 2002).

O FoxP3, quando positivo, se expressa em quantidade variável no interstício e, algumas vezes, permeando o epitélio tubular. Porém, sua positividade no endotélio e na camada íntima vascular pode ser observada na rejeição mediada por células T.

## 2. OBJETIVO

Avaliar a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos CD3, CD5, CD20, CD68, C4d, CD25, FoxP3 em biópsias renais realizadas entre os anos de 2007 e 2009 em pacientes transplantados acompanhados pelo Serviço de Nefrologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto, correlacionando-a com o diagnóstico histopatológico.

Deste modo, pretende-se fornecer novas ferramentas que permitam a detecção precoce de rejeição do enxerto e a identificação de sua etiologia, visando orientar a conduta terapêutica e então postergar, ou mesmo evitar, a perda do órgão.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo revisou as biópsias renais realizadas entre os anos de 2007 e 2009 em pacientes transplantados acompanhados pelo Serviço de Nefrologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Para tal, foram incluídas no estudo as biópsias renais consideradas satisfatórias ou marginais, segundo os critérios de adequação da amostra citados anteriormente (Racusen, LC. 1999).

Os casos cujas lâminas histológicas, blocos de parafina e/ou formulário médico para solicitação da análise do material não foram encontrados nos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital, bem como as amostras insatisfatórias, foram excluídas. Foram desconsideradas, também, as biópsias denominadas "tempo zero", ou seja, aquelas realizadas no momento do implante do enxerto, considerando-se não ter havido tempo suficiente para o início do processo de rejeição do órgão.

Deste modo, obteve-se um total de 110 biópsias, algumas delas pertencentes a um mesmo paciente em momentos diferentes de seu acompanhamento.

As lâminas das biópsias renais previamente coradas com Hematoxilina e Eosina e pelas colorações especiais rotineiras foram reavaliadas e reclassificadas por três médicos patologistas quanto à presença ou não de rejeição do enxerto e seu tipo, aguda ou crônica, segundo Critérios de Banff 2007 (Solez, K. 2008).

A partir de então, todo o material foi separado em dois grupos: "SEM DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO DE REJEIÇÃO", correspondendo a 51 casos, e "SUSPEITOS DE REJEIÇÃO", no qual foram incluídos casos classificados como rejeição aguda e rejeição crônica, em um total de 59 casos.

Os blocos de parafina foram posteriormente processados utilizando-se a técnica de Tissue Microarray (TMA) modificada - *TMA for all* (Pires ARC, 2006) e submetidos à imuno-histoquímica para os anticorpos CD3, CD5, CD20, CD25, C4d, CD68 e Foxp3.

As lâminas de TMA foram avaliadas por um médico patologista experiente neste tipo de análise e a positividade de cada anticorpo foi graduada.

O marcador C4d teve sua positividade classificada, segundo preconizado pela literatura, em: negativo, positividade em 1 a 10% dos capilares peritubulares, 10 a 50% de capilares marcados e acima de 50%. Da mesma forma, os casos cuja positividade se mostrou

menor do que 10% foram considerados verdadeiros negativos e aqueles com marcação maior do que 10% (positividade focal e difusa) foram considerados verdadeiros positivos.

Os demais marcadores tiveram sua positividade graduada em: negativa, leve (positividade em células esparsas), moderada (pequenos aglomerados celulares positivos) e acentuada (marcação em grupamentos maciços de células).

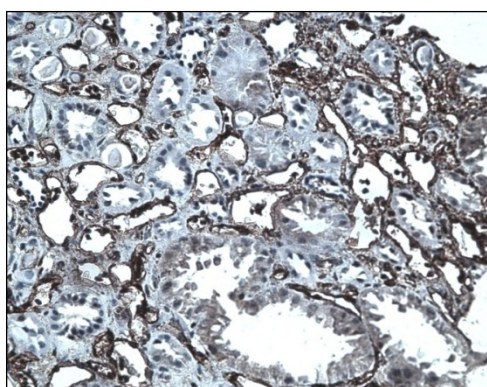


Figura 9 – Biópsia 5872/09. Marcação imuno-histoquímica para C4d em mais de 50% dos capilares peritubulares. Marcação circunferencial e linear.

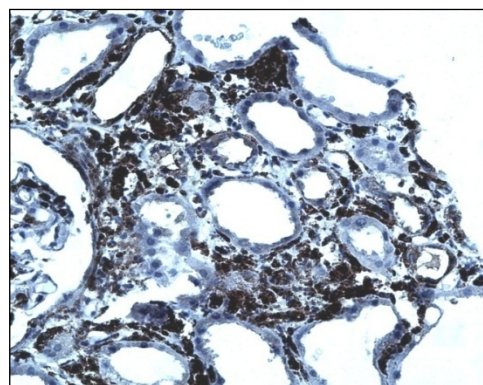


Figura 10 – Biópsia 8530/09. Positividade imuno-histoquímica moderada para CD68.

### 3.1. **Tissue Microarray (TMA) *for all***

A técnica de Tissue Microarray foi descrita pela primeira vez em julho de 1998 por Juha Kononen e cols., na revista *Nature Medicine* (Kononen, J. 1998), e desde então tem se mostrado uma ferramenta de grande utilidade em pesquisas e no controle de qualidade em imuno-histoquímica.

Consiste, basicamente, na retirada de cilindros de tecido medindo entre 0,6 e 2,0 mm de diâmetro de um bloco de parafina “doador”, seguido de sua transferência para um bloco “receptor”, capaz de armazenar até mil amostras de tecidos iguais ou diferentes. Posteriormente, o bloco “receptor” já com seus cilindros enxertados é recortado, lâminas com seus recortes são montadas e segue-se com a técnica padrão de imuno-histoquímica.

Dessa forma, é possível proceder ao estudo concomitante de centenas ou milhares de casos com economia de tempo, tanto no preparo, quanto na interpretação de resultados, e de materiais, já que a área amostrada é bem menor do que a totalidade do tecido estudado.

Entretanto, o método convencional de TMA apresenta um grande empecilho capaz de restringir seu uso a poucos centros de pesquisa: o elevado custo dos aparelhos utilizados.

Buscando alternativas para esse e outros problemas observados na técnica inicialmente descrita, Pires e cols. adaptaram o método convencional de modo a permitir seu uso em qualquer laboratório de Anatomia Patológica, com baixo custo e maior praticidade. Consiste na utilização de agulhas hipodérmicas Becton-Dickinson PrecisionGlide™ de 16 ou 18 gauge modificada para perfuração do bloco “doador” e retirada do fragmento a ser analisado.

Usando-se uma retífica Dremel Multi-Pro™ modelo 395 em baixa velocidade, retira-se o bisel da agulha, retificando sua extremidade. Posteriormente, cria-se uma janela de 8 a 10 mm de comprimento na parede lateral da agulha, utilizando a mesma ferramenta, por onde, com o auxílio de uma pinça anatômica, o fragmento pode ser retirado.

A partir de então, punciona-se manualmente o bloco “doador” com a agulha modificada, retirando-se um cilindro do tecido de uma área previamente selecionada. A seleção é feita através da marcação da região de interesse em uma lâmina do material corada em HE, após sua visualização à microscopia óptica. Feita a marcação das áreas de interesse, pode-se então confrontar a lâmina em HE com o bloco “doador” e, assim, puncionar a região correspondente.

Na presente análise, para cada caso foram selecionadas duas áreas, de acordo com o estudo de validação da técnica TMA em biópsias renais (Monnerat, ALC. 2010). A escolha

das regiões a serem puncionadas visou diversificar a amostra, representando em pelo menos uma das áreas o interstício, túbulos, glomérulos e vasos.

Outra diferença entre o método convencional e a técnica de Pires e cols. é a não utilização de blocos “receptores”. Nesta, utiliza-se um molde convencional de aço inoxidável sobre o qual é inserido uma grade de papel com círculos de 1 mm de diâmetro, afixada por uma fita dupla-face Scotch 3M™, onde é aderido cada cilindro do tecido em linhas e colunas, com o cuidado especial de mantê-los precisamente verticalizados. Ao final de cada linha é acrescentado um cilindro controle, com um tecido conhecido que não se assemelhe ao material estudado, a fim de se fazer um adequado posicionamento do bloco no momento do recorte e da lâmina, durante sua análise.

Optamos em utilizar como controles de posicionamento do bloco, em uma última coluna de cilindros, os seguintes tecidos: placenta, amígdala, pele, intestino delgado, linfonodo, pâncreas e cerebelo.

Em seguida, o molde é preenchido por parafina líquida que posteriormente se solidifica criando, então, um novo bloco com os cilindros a serem avaliados.

A partir de então, o bloco é cortado e lâminas são montadas para a realização da técnica de imuno-histoquímica.

Assim como no método convencional, é imprescindível monitorar a posição de cada cilindro em seu novo bloco. Para tal, monta-se uma tabela de identificação da topografia de cada fragmento, organizada com linhas e colunas, como em um jogo de “batalha naval”, de modo a localizar facilmente cada caso, sem o risco de trocas.

### 3.2. Imuno-histoquímica

Dois blocos de parafina foram construídos através da técnica TMA *for all*. Em um deles foram agrupados os casos “SUSPEITOS DE REJEIÇÃO” (59 casos). No outro, reuniram-se os casos “SEM DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO DE REJEIÇÃO” (51 casos).

Para a realização do estudo imuno-histoquímico foram utilizadas lâmina para microscopia, com silano, de 26mm x 76mm e os seguintes anticorpos primários:

- I. anticorpo policlonal de coelho anti-C4d, Cell Marque™;
- II. anticorpo policlonal de coelho anti-CD3, Cell Marque™;
- III. anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD5, clone 4C7, Cell Marque™;
- IV. anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD20 (Célula B), clone L26, Cell Marque™;
- V. anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD68, clone Kp-1, Cell Marque™;
- VI. anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD25, clone 4C9, Cell Marque™;
- VII. purified anti-human FoxP3, clone 259D, Biolegend™.

Os blocos de TMA foram cortados a uma espessura de 3 µm e novas lâminas foram confeccionadas, uma para cada anticorpo a ser estudado. As lâminas foram posteriormente colocadas em uma estufa aquecida a 60°C, por um período de quarenta minutos. Passado esse tempo, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena do material utilizando-se peróxido de hidrogênio por quinze minutos. Em seguida, realizaram-se a desparafinização, hidratação e recuperação antigênica utilizando-se a solução Trilogy™ do fabricante Cell Marque™ em “banho-maria” a 96 °C, por quarenta minutos, seguida da lavagem em água corrente por mais vinte minutos. Na sequência, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) e foi realizado o bloqueio dos epítomos banhando-se o material em leite de vaca durante quinze minutos.

Os anticorpos primários foram aplicados às lâminas, com o cuidado de escorrer o excesso. As lâminas foram, então, mantidas em uma câmara úmida durante todo o período da noite (*overnight*), em geladeira a 2°C.

No dia seguinte, a câmara foi mantida na bancada do laboratório por aproximadamente vinte minutos, a fim de se igualar a temperatura das lâminas à do ambiente, evitando, assim, choques térmicos prejudiciais às reações. Retirou-se novamente o excesso do anticorpo



primário, efetuaram-se quatro novas lavagens com o tampão PBS e, em seguida, o anticorpo secundário foi aplicado.

Após trinta minutos, foram realizadas quatro lavagens das lâminas com o mesmo tampão, aplicou-se o polímero Kit Mach 4™ do fabricante Biocare Medical™ por trinta minutos, efetuaram-se quatro novas lavagens e, posteriormente, aplicou-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB) por quinze minutos.

Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada, a fim de retirar o excesso do cromógeno, coradas com Hematoxilina por um minuto, desidratadas em álcool a 95%, diafanizadas com o solvente biológico Easy Clean™ do fabricante EasyPath™ e, finalmente, montadas.

Como em todo método de pesquisa, durante este estudo esbarramos em algumas dificuldades técnicas. Uma delas foi a perda de amostras durante o corte dos blocos de parafina e processamento imuno-histoquímico. Dependendo de fatores como, por exemplo, a inclinação do cilindro tecidual no bloco de TMA, o corte do material pode não ser representado na lâmina.

Conforme mencionado anteriormente, neste trabalho, para cada caso testado, foram selecionadas duas áreas do material a ser avaliado. Assim, quando uma das áreas foi perdida, a análise se restringiu à área restante. Quando as duas se perderam, o caso foi então considerado NÃO AVALIÁVEL. Como cada anticorpo utilizado foi testado em um corte, em uma lâmina específica, um caso considerado NÃO AVALIÁVEL para um marcador pode ser avaliável para outro, já que durante a produção da lâmina seguinte suas áreas correspondentes não necessariamente foram perdidas.

Os casos que sofreram perda de suas duas áreas selecionadas para TODOS os anticorpos testados foram excluídos do trabalho. Assim, 8 dos casos classificados como “SEM DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO DE REJEIÇÃO” e 1 caso do grupo “SUSPEITO DE REJEIÇÃO” foram retirados do estudo. Deste modo, o primeiro grupo passou a abranger 43 casos e, o segundo, 58.

### 3.3. Análise estatística

O comportamento de todos os anticorpos testados foi avaliado nos dois grupos, “SUSPEITO DE REJEIÇÃO” e “SEM DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO DE REJEIÇÃO”, a fim de se verificar se o estudo imuno-histoquímico seria capaz de predizer o diagnóstico de rejeição, ou excluí-lo.

Posteriormente, analisando apenas o grupo “SUSPEITO DE REJEIÇÃO”, buscou-se avaliar o comportamento de cada anticorpo em função da positividade ou negatividade para C4d, considerado pela literatura um importante marcador para o diagnóstico de rejeição humoral. Desse modo, pretendeu-se estabelecer qual ou quais anticorpos seriam úteis para definir rejeição humoral e celular.

Em todos os casos, as análises das frequências e porcentagens foram calculadas utilizando o Teste Exato de Fisher, com grau de liberdade um, onde o valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas através do programa *GraphPad Prism*<sup>TM</sup> versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, São Diego, Califórnia, EUA).

### 3.4. Comitê de ética em pesquisa

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, sob o número 02444412.9.0000.5259.

#### 4. RESULTADOS

Após o processamento das 110 biópsias selecionadas, 8 classificadas como “SEM DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO DE REJEIÇÃO” e 1 dentre as “SUSPEITAS DE REJEIÇÃO” foram excluídas deste estudo, já que tiveram seu material perdido para todos os anticorpos testados. Desta forma, o número total de casos nos dois grupos passou a ser, respectivamente, 43 e 58. Os casos considerados AVALIÁVEIS para pelo menos um anticorpo foram mantidos no estudo.

No grupo “SEM DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO DE REJEIÇÃO”, dos 43 casos testados para o anticorpo CD5, 6 foram perdidos durante o processamento. Dentre aqueles avaliáveis, 24 foram negativos (65%), 6 tiveram positividade leve (16%), 7 moderada (19%) e nenhum caso apresentou positividade acentuada. Dos casos submetidos ao CD3, 12 foram considerados NÃO AVALIÁVEIS. Dos demais, 12 se mostraram negativos (39%), 11 apresentaram positividade leve (35%), 7 positividade moderada (23%) e apenas 1, acentuada (3%). No estudo com o anticorpo CD68, 9 casos foram perdidos e a comportamento dos demais foi o seguinte: 13 negativos (38%), 12 leve (36%), 9 moderada (26%) e nenhum caso exibiu marcação acentuada.

Ainda nesse grupo, quanto ao anticorpo CD20, 11 casos se perderam, 10 foram negativos (31%), 14 obtiveram marcação leve (44%) e 8 moderada (25%). Também nesse momento não houve marcação acentuada. Dos casos testados para CD25, 7 se perderam, 24 foram negativos (67%), 7 tiveram positividade leve (19%), 5 moderada (14%) e, mais uma vez, nenhum caso foi considerado acentuado. Para o anticorpo FoxP3, 6 casos foram NÃO AVALIÁVEIS, enquanto 30 não marcaram para tal reagente (81%) e apenas 7 casos mostraram positividade leve (19%). Não houve marcações moderada ou acentuada.

A análise do C4d, nesse grupo, revelou uma perda de 7 casos e, dos avaliáveis, 25 (69%) foram negativos ou positivos em menos de 10% dos capilares peritubulares (casos “verdadeiramente negativos”), 9 (25%) marcaram entre 10 e 50% dos capilares e 2 (6%) mais de 50% dessas estruturas. Chama atenção aqui a quantidade de casos com positividade acima de 10% (casos “verdadeiramente positivos”) em um grupo considerado histopatologicamente sem rejeição: 11 casos (31%). Segundo a literatura, como já referido, marcação em imunohistoquímica em mais de 10% dos capilares peritubulares define a presença de rejeição humoral.

Quadro 02 – Casos sem diagnóstico histológico de rejeição.

	Negativo	Leve	Moderado	Acentuado	Não avaliáveis
<b>CD5</b>	24	06	07	00	06
<b>CD3</b>	12	11	07	01	12
<b>CD68</b>	13	12	09	00	09
<b>CD20</b>	10	14	08	00	11
<b>CD25</b>	24	07	05	00	07
<b>FoxP3</b>	30	07	00	00	06
	< 10%	10 – 50%	> 50%	Não avaliáveis	
<b>C4d</b>	25	09	02	07	

No grupo “SUSPEITO DE REJEIÇÃO”, dos 58 casos testados para CD5, 5 foram perdidos. Dos demais, 27 não tiveram marcação para tal anticorpo (51%), 13 mostraram positividade leve (24%), 11 moderada (21%) e 2 acentuada (4%). Para CD3, 11 casos foram perdidos, enquanto 2 foram negativos (4%), 15 levemente positivos (32%), 26 moderadamente (56%) e 4 casos acentuadamente (8%). Quanto ao anticorpo CD68, não houve marcação em 11 biópsias (21%), 25 tiveram positividade leve (46%), moderada em 14 (26%) e acentuada em 4 (7%), sendo 4 o número de casos perdidos.

Nesse grupo, em relação ao CD20, 14 casos se perderam. Entre os outros, 17 foram negativos (39%), 19 levemente positivos (43%), 7 moderadamente (16%) e apenas 1 caso acentuadamente (2%). O anticorpo CD25 mostrou-se negativo em 22 das biópsias (46%), positivo em células esparsas em 17 casos (35%), pequenos grupamentos celulares marcados em 7 (15%) e aglomerados maciços em 2 da amostra (4%). As perdas totalizaram 10 casos. Oito casos foram perdidos durante o processamento da reação para o anticorpo FoxP3. Dos casos válidos, 32 não mostraram marcação (64%), 16 foram positivos leves (32%) e tanto positividade moderada, quanto acentuada, ocorreram em apenas 1 caso (2%).

Em relação ao C4d, neste grupo, 36 (46%) biópsias foram negativas ou mostraram positividade em menos de 10% de capilares peritubulares (casos “verdadeiramente negativos”), 14 (25%) marcaram entre 10 e 50% dos capilares e 6 (11%) destacaram mais de 50% dessas estruturas vasculares. Assim, os casos “verdadeiramente positivos” foram 20 (36%). As perdas completam o total da amostra, correspondendo a 2 biópsias.

Quadro 03 – Casos suspeitos de rejeição.

	Negativo	Leve	Moderado	Acentuado	Não avaliáveis
<b>CD5</b>	27	13	11	02	05
<b>CD3</b>	02	15	26	04	11
<b>CD68</b>	11	25	14	04	04
<b>CD20</b>	17	19	07	01	14
<b>CD25</b>	22	17	07	02	10
<b>FoxP3</b>	32	16	01	01	08
	< 10%	10 – 50%	> 50%	Não avaliáveis	
<b>C4d</b>	36	14	06	02	

Considerando, como proposto pela literatura, que o comportamento do imunomarcador C4d, associado à presença de anticorpos circulantes específicos contra o doador, é definidor da presença de etiologia humoral em uma biópsia renal histologicamente suspeita de rejeição, buscamos avaliar o comportamento dos demais marcadores em função deste. Nesse sentido, subdividimos o grupo “SUSPEITO DE REJEIÇÃO” em casos cuja marcação em capilares peritubulares foi negativa ou em menos de 10% dos vasos (“verdadeiros negativos”) e casos que exibiram positividade em mais de 10% dos capilares (“verdadeiros positivos”).

Durante o processamento da amostra, dois casos foram inviabilizados para análise do C4d. Assim, das 58 biópsias suspeitas de rejeição, 2 foram excluídas neste momento, restando 20 casos “verdadeiramente positivos” e 36 “verdadeiramente negativos”.

No subgrupo das biópsias “verdadeiramente positivas” para o C4d, 3 casos foram considerados “NÃO AVALIÁVEIS” para o CD5. Entre os casos avaliáveis, 4 foram negativos (24%), 1 teve marcação acentuada (6%) e em mesma quantidade, 6, foram os casos marcados leve e moderadamente (35%). Para o anticorpo CD3, nesse subgrupo, 2 foram as perdas. Entre as demais, 1 biópsia foi negativa (5%), 5 tiveram marcação leve (28%), 11 moderada (62%) e 1 acentuada (5%).

O estudo do CD68 mostrou 2 casos negativos (12%), 8 com positividade leve (47%), 5 moderada (29%) e 2 acentuada (12%), sendo 3 o número de perdas. Quanto ao CD20, 6 casos se perderam, 4 foram negativos (28%), 8 exibiram positividade leve (58%), 2 moderada (14%) e nenhum acentuada. Para o CD25, os valores foram: 6 perdas, 2 negativos (14%), 7 leve (50%), 4 moderada (29%) e 1 acentuada (7%). Em relação ao FoxP3, 2 foram as perdas, enquanto 9 casos foram negativos (50%), 8 levemente positivos (44%), 1 acentuadamente (6%) e não houve marcação moderada.

Quadro 04 – Casos suspeitos de rejeição com marcação para C4d maior que 10%.

	Negativo	Leve	Moderado	Acentuado	Não avaliáveis
<b>CD5</b>	04	06	06	01	03
<b>CD3</b>	01	05	11	01	02
<b>CD68</b>	02	08	05	02	03
<b>CD20</b>	04	08	02	00	06
<b>CD25</b>	02	07	04	01	06
<b>FoxP3</b>	09	08	00	01	02

No subgrupo de biópsias “verdadeiramente negativas” para o C4d, das 36 biópsias testadas para o CD5, 1 foi perdida. Das demais, 22 foram negativas (63%), 7 marcaram leve (20%), 5 moderada (14%) e 1 acentuadamente (3%). Para o CD3, 1 caso foi negativo (4%), 9 obtiveram positividade leve (32%), 15 moderada (53%) e 3 acentuada (11%). Oito foram os casos perdidos. O CD68 foi negativos em 9 (25%), levemente positivo em 17 (47%), moderadamente em 9 (25%) e acentuadamente positivo em 1 (3%) caso. Para esse marcador, não houve perda de material.

A avaliação do CD20 mostrou 13 casos negativos (43%), 11 com marcação leve (37%), 5 moderada (17%) e 1 acentuada (3%), sendo 6 o número de casos perdidos. A expressão do anticorpo CD25 foi a seguinte: 2 perdas, 20 biópsias negativas (59%), 10 levemente positivas (29%), 3 moderadamente (9%) e 1 acentuadamente (3%). Finalmente, o estudo do FoxP3, nesse subgrupo, mostrou marcação leve em 8 casos (26%), moderada em 1 (3%) e nenhum mostrou marcação acentuada. Vinte e dois foram os casos negativos (71%) e 5 o número de perdas.

Quadro 05 – Casos suspeitos de rejeição com marcação para C4d menor que 10%.

	Negativo	Leve	Moderado	Acentuado	Não avaliáveis
<b>CD5</b>	22	07	05	01	01
<b>CD3</b>	01	09	15	03	08
<b>CD68</b>	09	17	09	01	00
<b>CD20</b>	13	11	05	01	06
<b>CD25</b>	20	10	03	01	02
<b>FoxP3</b>	22	08	01	00	05

A análise estatística, considerando o comportamento dos anticorpos em função da presença ou ausência de diagnóstico de rejeição, verificou que o anticorpo CD3 foi capaz de excluir a hipótese zero (H0), ou seja, nesse trabalho a positividade, independente de sua graduação, ou a negatividade para tal marcador se correlacionou com a presença ou ausência

de rejeição, utilizando-se um nível de significância de 5%. Se optarmos por uma avaliação menos rigorosa e considerarmos o valor de 10%, podemos estender a conclusão aos marcadores CD68, CD25 e FoxP3. Os demais não apresentaram correlação.

Em relação ao CD68, entre os casos sem diagnóstico de rejeição, 13 foram negativos para esse marcador (14,943%) e 21 mostraram algum tipo de positividade (24,138%). Entre os casos suspeitos, 11 foram negativos (12,644%) e 43 positivos (48,276%). Considerando-se que o  $p$ -valor foi de 0,0894, houve fraca correlação entre o comportamento do CD68 e a presença ou ausência de rejeição do enxerto. A avaliação do CD25 se mostrou semelhante. Entre os casos sem diagnóstico, 24 foram negativos (28,571%) e 12 positivos para esse marcador (14,286%). Dos casos diagnosticados com rejeição, 22 foram negativos (26,190%) e 26 positivos (30,952%), com  $p$ -valor de 0,0771.

O FoxP3 foi negativo em 30 casos considerados sem rejeição (34,483%) e positivo em 7 (8,046%). Entre aqueles com o diagnóstico, 32 foram negativos (36,782%) e 18 positivos (20,690%). Neste caso, foi encontrado um  $p$ -valor de 0,0976.

Já em relação ao CD3, o  $p$ -valor de 0,0001 revela uma forte correlação entre o comportamento deste anticorpo e a presença ou ausência de rejeição. No primeiro grupo, 12 casos foram negativos (15,000%) e 19 positivos (23,750%). No segundo, 2 casos se mostraram negativos (2,500%), enquanto 45 foram positivos (58,750%). A partir desses dados, calculou-se uma sensibilidade de 95,7% e especificidade de 38,7%. Os valores preditivos positivo e negativo foram, respectivamente, 70,3% e 85,7% e a acurácia verificada foi de 73%.

Tabela 1 – Comportamento dos anticorpos em função do diagnóstico histoquímico.

ANTICORPO	SEM REJEIÇÃO	COM REJEIÇÃO	<i>p</i> -VALOR
CD3 -	12 (15,000%)	2 (2,500%)	<b>0,0001</b>
CD3 +	19 (23,750%)	47 (58,750%)	
CD5 -	24 (25,532%)	27 (28,723%)	0,1377
CD5 +	13 (13,830%)	30 (31,915%)	
CD20 -	10 (12,987%)	17 (22,078%)	0,4715
CD20 +	24 (31,169%)	26 (33,766%)	
CD25 -	24 (28,571%)	22 (26,190%)	0,0771
CD25 +	12 (14,286%)	26 (30,952%)	
CD68 -	13 (14,943%)	11 (12,644%)	0,0894
CD68 +	21 (24,138%)	42 (48,276%)	
FoxP3 -	30 (34,483%)	32 (36,782%)	0,0976
FoxP3 +	7 (8,046%)	18 (20,690%)	
C4d -	25 (27,174%)	36 (39,130%)	0,6570
C4d +	11 (11,957%)	20 (21,739%)	

Quando considerado apenas o grupo “SUSPEITO DE REJEIÇÃO” e avaliado o comportamento dos anticorpos em função da positividade ou negatividade “verdadeiras” para C4d, pôde-se observar que entre os marcadores de rejeição humoral (CD25 e FoxP3) e os capazes de indicar etiologia celular (CD3, CD5, CD20 e CD68), apenas o CD25 e CD5 excluíram a H0. Ou seja, a positividade, independente de sua graduação, ou negatividade destes anticorpos mostrou correlação com a positividade ou negatividade para C4d. Os demais anticorpos não foram capazes de estimar a etiologia do processo de rejeição, nesse trabalho.

Em relação ao CD25, entre os casos “verdadeiros positivos” para C4d, 12 foram positivos (25,000%) e 2 negativos (4,167%). Dentre os “verdadeiros negativos”, 14 marcaram para CD25 (29,167%), enquanto 20 não (41,667%). O *p*-valor foi de 0,0094, confirmando a existência de correlação. Calculou-se uma sensibilidade de 85,7% e especificidade de 58,8%. Os valores preditivos positivo e negativo obtidos foram de 46,2% e 90,9% e a acurácia, 66,7%.

Para CD5, no subgrupo “verdadeiro positivo” para C4d, 13 casos foram positivos (24,528%) e 4 se mostraram negativos (7,547%). No subgrupo “verdadeiros negativos”, 13 casos foram positivos para CD5 (24,528%), ao passo que 22 não exibiram marcação (43,396%). Neste momento, o *p*-valor foi de 0,0084. Obtiveram-se uma sensibilidade de



76,5% e especificidade de 62,9%. Os valores preditivos positivo e negativo foram 50% e 84,6%, respectivamente, e a acurácia calculada foi de 67,3%.

Tabela 2 – Comportamento dos anticorpos em função da marcação do C4d.

ANTICORPO	C4d +	C4d -	<i>p</i> -VALOR
CD25 +	12 (25,000%)	14 (29,167%)	<b>0,0094</b>
CD25 -	2 (4,167%)	20 (41,667%)	
FoxP3 +	9 (18,367%)	9 (18,367%)	0,2191
FoxP3 -	9 (18,367%)	22 (44,898%)	
CD3 +	17 (36,957%)	27 (58,696%)	1,0000
CD3 -	1 (2,174%)	1 (2,174%)	
CD5 +	13 (24,528%)	13 (24,528%)	<b>0,0084</b>
CD5 -	4 (7,547%)	23 (43,396%)	
CD20 +	10 (22,727%)	17 (38,636%)	0,5087
CD20 -	4 (9,091%)	13 (29,545%)	
CD68 +	15 (28,302%)	27 (50,943%)	0,4694
CD68 -	2 (3,774%)	9 (16,981%)	

## 5. DISCUSSÃO

Conforme observado anteriormente, desperta a atenção a existência de 2 casos com positividade acima de 50% para C4d no grupo “SEM DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO DE REJEIÇÃO”. De acordo com a literatura, marcação acima de 10% seria indicativa de rejeição humoral (Solez, K. 2008).

Cabe, neste momento, considerar se tais casos foram erroneamente classificados como não diagnósticos de rejeição, apesar da avaliação por três médicos patologistas, se a reação imuno-histoquímica para C4d nessas biópsias foi falso-positiva ou até mesmo se a observação põe em xeque o que se considera até o momento.

Apesar de considerado por algum tempo como um marcador indubitável de rejeição humoral, hoje significantes limitações relacionadas ao C4d têm sido identificadas (Mengel, M. 2012). Nesse sentido, estudos são frequentemente realizados a fim de avaliar a utilidade deste marcador.

Takeda, A. e cols., analisando biópsias renais com diagnóstico de rejeição e correlacionando a positividade para C4d com os achados morfológicos e a presença de anticorpos circulantes antidoador, questionaram a capacidade desse marcador de definir rejeição mediada por anticorpos (Takeda, A. 2012). Em contrapartida, também tem sido considerado o diagnóstico desse tipo rejeição em casos com marcação negativa para tal anticorpo (Haas, M. 2011; Mengel, M. 2012).

Vale lembrar também que durante o encontro de Banff 2007 já foi mencionada a existência de positividade para C4d em biópsias consideradas normais (Solez, K. 2008), embora ainda hoje não se conheça bem a evolução clínica desses casos (Sementilli, A. 2008).

Não temos uma resposta adequada para justificar o dado encontrado em nosso estudo. Para tal, acreditamos ser necessário verificar a história clínica e a evolução desses pacientes e, principalmente, averiguar a existência de anticorpos circulantes contra antígenos do doador, dado fundamental na corroboração da rejeição humoral (Racusen, LC. 2003).

O comportamento dos anticorpos em função da presença ou ausência de diagnóstico de rejeição nos forneceu informações curiosas. Não esperávamos encontrar associação entre tais fatos, porém a correlação entre a positividade ou negatividade para os marcadores CD68, CD25, CD3 e FoxP3 e a presença ou não de rejeição nos leva a questionar se tais anticorpos poderiam ser utilizados, em conjunto à avaliação histoquímica, na detecção do agravo.

Se observarmos ainda que, dentre tais marcadores, dois indicam ação celular e dois humoral, a verificação torna-se ainda mais curiosa. Caso a correlação fosse expressa apenas para marcadores que indicassem uma das etiologias, poderíamos questionar se características da amostra não teriam influenciado nesta avaliação. Por exemplo, se apenas marcadores celulares mostrassem correlação com o diagnóstico histológico, poderíamos supor que nossa amostra inicial fosse constituída, em sua maioria, por casos cuja rejeição fosse celular e, desse modo, obviamente marcadores humorais seriam negativos. Assim, as características da amostra parecem não ter influenciado na interpretação dos dados.

De modo semelhante ao que pudemos observar, em um estudo avaliando as características do infiltrado inflamatório presente em biópsias transbrônquicas de pacientes submetidos a transplante de pulmão, de Bilc e colaboradores demonstraram existir correlação positiva entre o número de células CD3+ e CD25+, detectadas pela imuno-histoquímica, e a presença de diagnóstico histológico de rejeição. Entretanto, o mesmo não ocorreu quando se testou a amostra para CD68 (de Bilc, J. 1992).

Vale destacar ainda que, em nossa avaliação, o CD3 foi o anticorpo que mostrou correlação mais significativa com o diagnóstico de rejeição, visto que seu *p*-valor foi de 0,0001. Assim, se tivermos que eleger um marcador como mais confiável para estimar a presença de rejeição, será certamente o CD3.

No mesmo estudo citado anteriormente, de Bilc comprovou que, independentemente do grau histológico da rejeição, linfócitos T CD3+ estavam presentes em um número significativamente maior do que no grupo morfológicamente normal (de Bilc, J. 1992). De modo análogo, positividade mais expressiva para CD3 em biópsias renais com diagnóstico de rejeição, comparativamente àquelas sem o diagnóstico, foi observada em outros estudos (Grimm, PC. 1999; Ibrahim, S. 1995). Tais informações reforçam nossa suspeita de que, qualquer que seja a etiologia ou o grau de severidade do processo, linfócitos T CD3+ estarão presentes em tecidos imunologicamente agredidos.

Em outra análise, avaliando apenas biópsias renais diagnosticadas como rejeição aguda, Chang A. e cols perceberam que células T CD3+ é o tipo celular predominante, independentemente da etiologia do processo: celular, humoral ou mista (Chang, A. 2012).

Entretanto, devemos ressaltar que a morfologia em Anatomia Patológica é sempre soberana. Positividade para esse ou quaisquer outros anticorpos nunca deve ser considerada na ausência de critérios histológicos de rejeição. Desta forma, a utilidade da imuno-histoquímica deve ser auxiliar e jamais definidora isoladamente.

Considerando a análise dos anticorpos estudados em função da positividade ou negatividade para C4d, percebemos que o CD25 e o CD5 mostraram correlação com este marcador ( $p = 0,0094$  e  $p = 0,0084$ , respectivamente). O primeiro mostra uma correlação positiva, concordando com o fato de que ambos, CD25 e C4d, evidenciarão a ação de anticorpos no enxerto rejeitado. Para CD5, houve uma correlação negativa, mostrando que, como esperado, casos positivos para C4d seriam negativos para este marcador e vice-versa. Tal observação nos leva a inferir que a positividade do CD25 é provavelmente indicadora da ação humoral, enquanto o CD5 reforçaria a atividade celular sobre o órgão. Não se pôde definir o comportamento dos demais anticorpos estudados.

Mais uma vez, chama-nos atenção que um marcador de etiologia humoral e outro de etiologia celular tenham confirmado o que se pretendia constatar. Assim, estimamos que, durante a análise de casos com suspeita histológica de rejeição do enxerto, a utilização do CD25 e CD5, especialmente associados à pesquisa do C4d, seja capaz de auxiliar na definição quanto à etiologia do evento.

Até o presente momento, os estudos avaliam a presença de células CD25+ circulantes em função do diagnóstico de rejeição do enxerto, sem correlacioná-la com a ação humoral ou celular, ou mesmo com sua expressão imuno-histoquímica no tecido enxertado (Liu, L. 2012; Lin, WX. 2012). De forma análoga, não encontramos trabalhos que associem, ou mesmo desvinculem, a marcação imuno-histoquímica para CD5 com a etiologia do evento. Assim, fica evidente a necessidade de estudos posteriores que confirmem ou refutem a hipótese aventada em nossa avaliação.

Devemos, entretanto, lembrar que para a confirmação da ação humoral no processo de rejeição são necessárias evidências histológicas sugestivas, além da detecção de anticorpos circulantes contra antígenos do doador, não bastando apenas o estudo imuno-histoquímico dos casos (Feucht, HE. 1991; Feucht, HE. 1993; Collins, AB. 1999; Solez, K. 2008).

## 6. CONCLUSÃO

Concluiu-se, através deste estudo, que o anticorpo imuno-histoquímico CD3 é de grande utilidade na detecção de casos de rejeição do enxerto renal. Entretanto, este recurso deve sempre estar associado à avaliação histológica do material, visto que a morfologia é indiscutivelmente soberana. Assim, casos suspeitos histopatologicamente, porém não conclusivos para o processo de rejeição, podem ser testados para esse marcador, a fim de se confirmar ou excluir o diagnóstico.

Em um segundo momento, tendo sido feito o diagnóstico de rejeição, cabe definir sua etiologia, orientando a conduta clínica. Nesse sentido, o presente trabalho mostrou que o uso do CD25 e do CD5, associados ou não à pesquisa para C4d, mostra-se capaz de sugerir, respectivamente, a ação humoral ou celular no processo.

Pôde-se confirmar também que casos sem suspeita histológica de rejeição do enxerto podem apresentar positividade para C4d em mais de 10% dos capilares peritubulares, assim como já relatado em outros estudos (Solez, K. 2008).

Cabe ressaltar, ainda, que para definição diagnóstica quanto à etiologia é imprescindível considerar a história clínica do paciente e a presença ou ausência de anticorpos circulantes contra antígenos do doador (Feucht, HE. 1991; Feucht, HE. 1993; Collins, AB. 1999; Solez, K. 2008).

## REFERÊNCIAS

Ullmann E. Experimentelle Nierentransplantation. Wiener Klinische Wochenschrift. 1902. 11: 281-282.

Druml W. The beginning of organ transplantation: Emerich Ullmann (1861-1937). Wiener Klinische Wochenschrift. 2002. 114(4):128-137.

Jaboulay M. Greffe du reins au pli du coude par suture arte. Bull Lyon Med. 1906. 107: 575.

Hamilton DN, Reid WA. Yu Yu Voronoy and the first human kidney allograft. Surgery, Gynecology & Obstetrics. 1984. 159: 289.

Murray J. The Nobel Lectures in immunology. The Nobel prize for physiology or medicine, 1990. The First Successful Organ Transplants in Man. Scandinavian Journal of Immunology. 1994. 39 (1): 4-11.

Hume DM, Merrill JP, Miller BF, Thorn GW. Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. The Journal of Clinical Investigation. 1955. 34 (2): 327-382.

Stefoni S, Campieri C, Donati G, Orlandi V. The history of clinical renal transplant. Journal of Nephrology. 2004. 17 (3): 475-478.

Coelho JC, Ribar J, Saitovitch D. Transplante renal: do imaginário à sua real aplicação médica. Em: Guilhermano, LG. Páginas da história da medicina. 1ª edição. Edipucrs. 2010. 123-131.

Sementilli A, David DR, Malheiros D. Patologia do transplante renal: achados morfológicos principais e como laudar as biópsias. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2008. 4: 293-304.

Lasmar EP, Lasmar MF, Lasmar LF, Lima PV, Fuji JB. Análise crítica de pacientes com mais de dez anos de transplante renal. Jornal Brasileiro de Transplantes. 2005. 8: 435-437.

Towns G, Ramanathan V. Chronic Allograft Injury. European Nephrology. 2011. 5(2): 155-159.

Colvin RB, Nickleleit V. Renal Transplant Pathology. Em: Jennette JC, Heptinstall, RH. Pathology of the kidney. 6<sup>a</sup> edição. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. 1347-1490.

Ranjan P, Nada R, Jha V, Sakhuja V, Joshi K. The role of C4d immunostaining in the evaluation of the causes of renal allograft dysfunction. Nephrology Dialysis Transplantation. 2008. 23: 1735-1741.

Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney International. 1999. 55: 713-723.

Mahoney MC, Racadio JM, Merhar GL, First MR. Safety and efficacy of kidney transplant biopsy: Tru-Cut needle vs sonographically guided Biopsy gun. American Journal of Roentgenology. 1993.160: 325-326.

Racusen LC. Protocol Transplant Biopsies in Kidney Allografts: Why and When Are They Indicated? Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 2006. 1:144-147.

Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. American Journal of Transplantation. 2003. 3: 665-673.

Puttarajappa C, Shapiro R, Tan HP. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review. Journal of Transplantation. 2012. 2012: 1-9.

Kohler TR, Tilney NL. Microangiopathic hemolytic anemia associated with hyperacute rejection of a kidney allograft. Transplantation Proceedings. 1982. 14 (2): 444-447.

Williams GM, Hume DM, Hudson Jr. RP, Morris PJ, Kano FRCSK, Milgrom F. Hyperacute renal-homograft rejection in man. The New England Journal of Medicine. 1968. 279: 611-618.

Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. 1966. 288 (7465): 662-665.

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 International. 2002. 61: 1516-1526.

Hippen BE, DeMattos A, Cook WJ, Kew CE, Gaston RS. Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. *American Journal of Transplantation*. 2005. 5: 2248-2252.

Cecka JM. The OPTN/UNOS renal transplant registry 2003. 2003. *Clinical Transplantation*. 2003: 1-12.

Lorenz M, Regele H, Schillinger M, Exner M, Rasoul-Rockenschaub S, Wahrmann M, Kletzmayr J, Silberhumer G, Hörl WH, Böhmig GA. Risk factors for capillary C4d deposition in kidney allografts: evaluation of a large study cohort. *Clinical Transplantation*. 2004. 78 (3): 447-452.

Porter KA, Marchioro TL, Starzl TE. Pathological changes in 37 human renal homotransplants treated with immunosuppressive drugs. *British Journal of Urology*. 1965. 37 (3): 250-273.

Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody, Analysis using the Banff grading schema. *Transplantation*. 1996. 61(11):1586-1592.

Resch L, Yu W, Fraser RB, Lawen JG, Acott PD, Crocker JF, Wright JR Jr. T-cell/periodic acid-Schiff stain: a useful tool in the evaluation of tubulointerstitial infiltrates as a component of renal allograft rejection. *Annals of Diagnostic Pathology*. 2002. 6 (2): 122-124.

Nickeleit V, Vamvakas EC, Pascual M, Poletti BJ, Colvin RB. The prognostic significance of specific arterial lesions in acute renal allograft rejection. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1998. 9 (7): 1301-1308.

Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Williams WW, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB, Colvin RB. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1999. 10: 2208-2214.

Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, Held E, Riethmüller G, Land W, Albert E. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clinical and Experimental Immunology*. 1991. 86 (3): 464-70.

Feucht HE, Schneerberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmüller G, Land W, Albert E. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney International*. 1993. 43: 1333-4338.



Mengel M, Sis B, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, Solez K, Cendales L, Demetris AJ, Drachenberg CB, Farver CF, Rodriguez ER, Wallace WD, Glotz D. Banff 2011 meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *American Journal of Transplantation*. 2012. 12 (3): 563-570.

Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B. Banff 07 Classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *American Journal of Transplantation*. 2008. 8: 753-760.

Magil AB, Tinckam KJ. Monocytes and peritubular capillary C4d deposition in acute renal allograft rejection. *Kidney International*. 2003. 63: 1888-1893.

Roufosse CA, Shore I, Moss J, Moran LB, Willicombe M, Galliford J, Chan KK, Brookes PA, de Kort H, McLean AG, Taube D, Terence Cook H. Peritubular capillary basement membrane multilayering on electron microscopy: a useful marker of early chronic antibody-mediated damage. *Transplantation*. 2012. 94 (3): 269-274.

Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff '09 Meeting Report: Antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff Working Groups. *American Journal of Transplantation*. 2010. 10: 464-471.

Solez K. History of the Banff classification of allograft pathology as it approaches its 20th year. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2010. 15: 49-51.

Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 Meeting report: new diagnostic insights and standards. *American Journal of Transplantation*. 2004. 4 (10):1562-1566.

Zarkhin V, Kambham K, Li L, Kwok S, Hsieh SC, Salvatierra O, Sarwal MM. Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection. *Kidney International*. 2008. 74: 664-673.

Sarwal M, Chen X, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Alizadeh AA, Masek M, Diehn M, Salvatierra OJ, Brown PO. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *New England Journal of Medicine*. 2003. 349: 125-138.

Martins HL, Silva C, Martini D, Noronha IL. Detection of B Lymphocytes (CD20+) in Renal Allograft Biopsy Specimens. *Transplantation Proceedings*. 2009. 39 (2): 432-434.

Nickeleit V, Mihatsch MJ. Kidney transplants, antibodies and rejection: is C4d a magic marker? *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2003. 18: 2232-2239.

Seemayer CA, Gaspert A, Nickleit V, Mihatsch MJ. C4d staining of renal allograft biopsies: a comparative analysis of different staining techniques. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2007. 22: 568-576.

Nadasdy GM, Bott C, Cowden D, Pelletier R, Ferguson R, Nadasdy T. Comparative study for the detection of peritubular capillary C4d deposition in human renal allografts using different methodologies. *Human Pathology*. 2005. 36: 1178-1185.

Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF. Antibody-mediated rejection criteria – an addition to the Banff 97 Classification of renal allograft rejection. *American Journal of Transplantation*. 2003. 3: 708-714.

Haas, M. C4d-negative antibody-mediated rejection in renal allografts: evidence for its existence and effect on graft survival. *Clinical Nephrology*. 2011. 75 (4): 271-278.

Hancock WW, Thomson NM, Atkins RC. Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts. *Transplantation*. 1983. 35 (5): 458-463.

Grimm PC, Mckenna R, Nickerson P, Russell ME, Gough J, Gospodarek E, Liu B, Jeffery J, Rush DN. Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1999. 10 (7): 1582-1589.

Melo KM, Carvalho BTC. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*. 2009. 32 (5): 184-188.

Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FoxP3 expression in naive human CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor- $\beta$ -dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood Journal*. 2007. 110: 2983-2990.

Naka EL, Ponciano VC, Rangel EB, Cenedeze MA, Pacheco-Silva A, Câmara NOS. Expressão de moléculas imunorreguladoras em rins não-funcionantes com rejeição aguda. *Jornal Brasileiro de Transplantes*. 2008. 11 (1): 854-860.

Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *Journal of Experimental Medicine*. 2002. 195 (12):1641-1644.

Pires ARC, Andreiuolo FM, Souza SR. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. *Diagnostic Pathology*. 2006. 1:14.

Kononen J, Bubendorf L, Kallionimeni A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallionimeni OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*. 1998. 4: 844-847.

Monnerat ALC, Caldas MLR, Pires ARC. Validação de construção de tissue microarray para estudo da displasia intraepitelial tubular renal. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 46: 471-478.

Takeda A, Otsuka Y, Horike K, Inaguma D, Hiramitsu T, Yamamoto T, Nanmoku K, Goto N, Watarai Y, Uchida K, Morozumi K, Kobayashi T. Significance of C4d deposition in antibody-mediated rejection. *Clinical Transplantation*. 2012. 26: 43-48.

de Blic J, Peuchmaur M, Carnot F, Danel C, Deruesne M, Reynaud P, Scheinmann P, Brousse N. Rejection in lung transplantation: an immunohistochemical study of transbronchial biopsies. *Transplantation*. 1992. 54 (4): 639-644.

Ibrahim S, Dawson DV, Sanfilippo F. Predominant infiltration of rejecting human renal allografts with T cells expressing CD8 and CD45RO. *Transplantation*. 1995. 59 (5): 724-728.

Chang A, Moore JM, Cowan ML, Josephson MA, Chon WJ, Sciammas R, Du Z, Marino SR, Meehan SM, Millis M, David MZ, Williams JW, Chong AS. Plasma cell densities and glomerular filtration rates predict renal allograft outcomes following acute rejection. *Transplant International*. 2012.

Liu L, Deng S, Teng L, Fu Q, Wang C, He X. Absolute of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T-cell count rather than its ratio in peripheral blood is related to long-term survival of renal allografts. *Transplantation Proceedings*. 2012. 44 (1): 284-286.

Lin WX, Christiansen D, Fu LL, Roberts MA, Sandrin MS, Ierino FL. Foxp3+ T cells in peripheral blood of renal transplant recipients and clinical correlations. *Nephrology*. 2012. 17 (4): 415-422.

Fogo AG. Approach to Renal Biopsy. *American Journal of Kidney Diseases*. 2003. 42: 826-836.

Magil AB, Tinckam KJ. Focal peritubular capillary C4d deposition in acute rejection. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2006. 21: 1382-1388.

Troxell ML, Weintraub LA, Higgins JP, Kambham N. Comparison of C4d immunostaining methods in renal allograft biopsies. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2006. 1: 583-591.

Nickeleit V, Zeiler M, Thiel G, Mihatsch MJ. What is borderline renal allograft rejection? Relevant topics in pathology of transplantation. *Revista Española de Patología*. 1999. 32: 339-340.

Lerut E, Naesens M, Kuypers DR, Vanrenterghem Y, Van Damme B. Subclinical Peritubular Capillaritis at 3 Months Is Associated With Chronic Rejection at 1 Year. *Transplantation*. 2007. 83: 1416–1422.

Fahim T, Böhmig GA, Exner M, Huttary N, Kerschner H, Kandutsch S, Kerjaschki D, Bramböck A, Nagy-Bojarszky K, Regele H. The Cellular Lesion of Humoral Rejection: Predominant Recruitment of Monocytes to Peritubular and Glomerular Capillaries. *American Journal of Transplantation*. 2007. 7: 385–393.

Nickeleit V, Andreoni K. The classification and treatment of antibody-mediated renal allograft injury: Where do we stand? *Kidney International*. 2007. 71: 7-11.

Cosio FG, Gloor JM, Sethi S, Stegall MD. Transplant Glomerulopathy. *American Journal of Transplantation*. 2008. 8: 492–496.

El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, Cosio FG. Identifying Specific Causes of Kidney Allograft Loss. *American Journal of Transplantation*. 2009. 9: 527–535.

## APÊNDICE A – Casos sem diagnóstico histológico de rejeição

	CD5	CD3	CD68	CD20	CD25	FoxP3	C4d	Obs
9009/07	N	N	N	N	N	N	< 10%	
7977/07	M	L	N	L	M	N	10-50%	
6104/07	N	L	-	L	N	-	10-50%	
4791/07	-	-	-	-	-	N	-	
4754/07	N	-	L	N	-	N	<10%	
4753/07	N	L	N	N	N	N	<10%	
4459/07	N	-	-	-	N	N	-	
2709/07	L	L	L	M	N	N	<10%	
2523/07	-	-	-	-	-	-	-	<b>EXCLUÍDO</b>
0647/07	-	-	-	-	-	-	-	<b>EXCLUÍDO</b>
0518/07	N	N	N	-	N	N	<10%	
9294/07	N	L	L	N	N	N	<10%	
0189/08	-	-	-	-	-	-	-	<b>EXCLUÍDO</b>
0012/08	-	-	-	-	-	-	-	<b>EXCLUÍDO</b>
0191/08	M	M	N	L	M	L	<10%	
1111/08	L	M	M	L	L	L	<10%	
1870/08	-	-	-	-	-	N	-	
2166/08	M	L	L	M	L	N	<10%	
2229/08	N	N	L	L	N	N	<10%	
2821/08	N	N	N	-	N	N	<10%	
9343/08	N	L	M	L	N	N	10-50%	
5898/08	-	-	-	-	-	-	-	<b>EXCLUÍDO</b>
5881/08	L	M	N	L	L	L	<10%	
5695/08	N	L	-	L	N	-	10-50%	
5286/08	L	-	N	-	N	N	10-50%	
4304/08	-	-	M	-	-	-	-	
3705/08	N	-	M	-	N	N	>50%	
3561/08	M	A	M	M	M	L	10-50%	
3290/08	N	N	N	N	N	N	<10%	
2907/08	N	N	N	L	N	N	<10%	
2906/08	N	N	L	N	N	N	10-50%	
9825/08	M	M	-	L	L	N	10-50%	
2483/09	L	L	L	M	L	L	>50%	
3103/09	-	-	M	-	-	-	-	
3628/09	N	-	-	-	N	N	<10%	
3214/09	-	-	-	-	-	N	-	
0181/09	N	L	L	N	N	N	<10%	
0126/09	M	M	L	M	M	N	<10%	
1019/09	M	M	M	M	M	L	<10%	
0689/09	N	N	M	N	L	N	10-50%	
7977/09	N	N	N	N	N	N	<10%	
7130/09	N	N	N	L	N	N	<10%	
6603/09	-	-	-	-	-	-	-	<b>EXCLUÍDO</b>
6459/09	-	-	-	-	-	-	-	<b>EXCLUÍDO</b>
6396/09	-	-	-	-	-	-	-	<b>EXCLUÍDO</b>
6070/09	L	-	M	M	L	N	<10%	
2417/09	N	N	L	M	N	L	<10%	
1462/09	N	L	L	L	N	N	<10%	
1810/09	N	N	N	L	N	N	<10%	
1760/09	N	-	L	N	N	-	<10%	
1264/09	-	M	-	L	-	-	-	

N: marcação imuno-histoquímica negativa; L: marcação leve; M: marcação moderada; A: marcação acentuada; -: perda do material durante o processamento para o respectivo anticorpo.

**APÊNDICE B – Casos suspeitos de rejeição.**

	CD5	CD3	CD68	CD20	CD25	FoxP3	C4d	Obs
0130/07	N	-	-	-	-	-	10-50%	
0962/07	N	-	L	N	N	-	<10%	
0990/07	L	L	L	M	L	-	<10%	
1014/07	L	M	M	L	L	-	10-50%	
1400/07	N	L	N	N	N	-	<10%	
1613/07	N	-	N	N	N	-	<10%	
2079/07	L	M	A	L	N	-	<10%	
2259/07	L	M	M	L	L	L	10-50%	
2522/07	N	-	M	L	L	L	<10%	
2797/07	N	L	L	-	N	N	<10%	
3076/07	N	-	L	N	N	N	<10%	
3439/07	N	-	N	L	N	N	<10%	
4082/07	N	L	N	N	N	N	<10%	
4684/07	-	M	N	-	-	N	>50%	
4872/07	N	L	L	L	N	L	<10%	
4884/07	-	-	-	-	-	-	-	<b>EXCLUÍDO</b>
5459/07	N	M	N	-	N	N	<10%	
5460/07	M	M	L	M	A	L	<10%	
5461/07	M	M	-	-	M	L	10-50%	
5685/07	M	A	A	L	M	L	>50%	
5953/07	N	M	L	L	L	N	<10%	
5988/07	N	M	N	N	N	N	<10%	
6353/07	N	N	N	N	-	N	10-50%	
7976/07	N	M	L	L	N	N	<10%	
8067/07	A	M	M	M	-	L	10-50%	
8605/07	N	M	L	M	L	N	<10%	
8609/07	N	N	N	N	N	N	<10%	
8742/07	L	L	L	N	N	N	10-50%	
9244/07	L	L	L	N	N	N	<10%	
9478/07	L	M	M	L	L	N	<10%	
9480/07	N	L	L	N	N	N	<10%	
0190/08	-	L	-	-	-	-	-	
0244/08	L	M	A	L	L	L	10-50%	
0496/08	L	L	L	L	L	N	10-50%	
1014/08	L	M	M	M	L	L	<10%	
1938/08	M	M	L	-	N	N	<10%	
2663/08	N	M	L	N	L	N	<10%	
3115/08	-	M	M	N	N	N	<10%	
3116/08	L	-	-	-	-	N	>50%	
3406/08	-	M	M	L	L	L	>50%	
4170/08	N	-	L	-	-	N	<10%	
4302/08	N	M	L	-	-	N	10-50%	
4602/08	N	L	L	-	-	N	<10%	
6057/08	N	M	L	-	N	N	10-50%	
6659/08	L	L	N	-	N	N	<10%	
7751/08	N	A	M	M	L	N	<10%	
8451/08	A	A	M	A	M	M	<10%	
8860/08	M	M	L	N	L	N	10-50%	
8904/08	-	M	L	N	L	N	10-50%	
0005/09	M	A	M	L	M	L	<10%	
0454/09	N	-	N	N	N	N	<10%	
3026/09	N	-	L	N	N	N	<10%	
3728/09	M	M	L	L	L	L	<10%	

	CD5	CD3	CD68	CD20	CD25	FoxP3	C4d	Obs
4095/09	L	M	M	L	L	L	<10%	
5872/09	M	L	L	L	M	A	>50%	
6856/09	M	L	M	M	M	L	10-50%	
7152/09	M	M	M	L	M	L	<10%	
8421/09	M	L	L	L	A	L	>50%	
8530/09	N	-	A	-	-	N	-	

N: marcação imuno-histoquímica negativa; L: marcação leve; M: marcação moderada; A: marcação acentuada; -: perda do material durante o processamento para o respectivo anticorpo.

**APÊNDICE C – Casos suspeitos de rejeição com marcação para C4d maior que 10%.**

	CD5	CD3	CD68	CD20	CD25	FoxP3
0130/07	N	-	-	-	-	-
1014/07	L	M	M	L	L	-
2259/07	L	M	M	L	L	L
4684/07	-	M	N	-	-	N
5461/07	M	M	-	-	M	L
5685/07	M	A	A	L	M	L
6353/07	N	N	N	N	-	N
8067/07	A	M	M	M	-	L
8742/07	L	L	L	N	N	N
0244/08	L	M	A	L	L	L
0496/08	L	L	L	L	L	N
3116/08	L	-	-	-	-	N
3406/08	-	M	M	L	L	L
4302/08	N	M	L	-	-	N
6057/08	N	M	L	-	N	N
8860/08	M	M	L	N	L	N
8904/08	-	M	L	N	L	N
5872/09	M	L	L	L	M	A
6856/09	M	L	M	M	M	L
8421/09	M	L	L	L	A	L

N: marcação imuno-histoquímica negativa; L: marcação leve; M: marcação moderada; A: marcação acentuada; -: perda do material durante o processamento para o respectivo anticorpo.



**APÊNDICE D – Casos suspeitos de rejeição com marcação para C4d menor que 10%.**

	CD5	CD3	CD68	CD20	CD25	FoxP3
962/07	N	-	L	N	N	-
990/07	L	L	L	M	L	-
1400/07	N	L	N	N	N	-
1613/07	N	-	N	N	N	-
2079/07	L	M	A	L	N	-
2522/07	N	-	M	L	L	L
2797/07	N	L	L	-	N	N
3076/07	N	-	L	N	N	N
3439/07	N	-	N	L	N	N
4082/07	N	L	N	N	N	N
4872/07	N	L	L	L	N	L
5459/07	N	M	N	-	N	N
5460/07	M	M	L	M	A	L
5953/07	N	M	L	L	L	N
5988/07	N	M	N	N	N	N
7976/07	N	M	L	L	N	N
8605/07	N	M	L	M	L	N
8609/07	N	N	N	N	N	N
9244/07	L	L	L	N	N	N
9478/07	L	M	M	L	L	N
9480/07	N	L	L	N	N	N
1014/08	L	M	M	M	L	L
1938/08	M	M	L	-	N	N
2663/08	N	M	L	N	L	N
3115/08	-	M	M	N	N	N
4170/08	N	-	L	-	-	N
4602/08	N	L	L	-	-	N
6659/08	L	L	N	-	N	N
7751/08	N	A	M	M	L	N
8451/08	A	A	M	A	M	M
05/09	M	A	M	L	M	L
454/09	N	-	N	N	N	N
3026/09	N	-	L	N	N	N
3728/09	M	M	L	L	L	L
4095/09	L	M	M	L	L	L
7152/09	M	M	M	L	M	L

N: marcação imuno-histoquímica negativa; L: marcação leve; M: marcação moderada; A: marcação acentuada; -: perda do material durante o processamento para o respectivo anticorpo.