



UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS MARCADORES DE LESÃO
ENDOTELIAL FATOR DE VON WILLEBRAND, T-CADERINA E
CAVEOLINA-1 EM BIÓPSIAS DE ENXERTO RENAL**

ANDRÉ COSTA TEIXEIRA

FORTALEZA

2021

ANDRÉ COSTA TEIXEIRA

AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS MARCADORES DE LESÃO
ENDOTELIAL FATOR DE VON WILLEBRAND, T-CADERINA E CAVEOLINA-1 EM
BIÓPSIAS DE ENXERTO RENAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Médicas, da Universidade Federal do
Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Médicas. Área de
concentração: Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Tainá Veras de Sandes-
Freitas

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C87a Costa Teixeira, André.
Avaliação imuno-histoquímica dos marcadores de lesão endotelial Fator de von Willebrand, T-Caderina e Caveolina-1 em biópsias de enxerto renal / André Costa Teixeira.
– 2021.
109 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Tainá Veras de Sandes-Freitas.
1. Imuno-histoquímica. 2. Fator de von Willebrand. 3. Rejeição de Enxerto . 4. Caderinas. 5. Caveolina 1. I. Título.

CDD 615.1

ANDRÉ COSTA TEIXEIRA

AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS MARCADORES DE LESÃO
ENDOTELIAL FATOR DE VON WILLEBRAND, T-CADERINA E CAVEOLINA-1 EM
BIÓPSIAS DE ENXERTO RENAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Médicas, da Universidade Federal do
Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Médicas. Área de
concentração: Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Tainá Veras de Sandes-
Freitas

Aprovada em 06/08/2021.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Tainá Veras de Sandes Freitas (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Elizabeth de Francesco Daher
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora
Hospital do Coração de Messejana

Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me conceder saúde para lutar por meus sonhos.

A meus pais, Dênio e Lúcia Helena, e a minha irmã, Sílvia, por sempre servirem de exemplo e inspiração em todos os momentos de minha vida, permitindo e criando condições para que eu trilhasse meu próprio caminho.

Aos meus amados sobrinhos, Eduardo, Samuel e Maria Júlia, por trazerem alegria e luz para toda a família. Que eu possa contribuir um pouco para que vejam a importância do estudo como ferramenta para uma vida livre e feliz.

Ao meu esposo Thiago Mena, por me amar incondicionalmente, me acolher em todos os momentos e por vivenciar comigo a alegria e os desafios de constituir nossa própria família em um mundo ainda marcado pela ignorância e pela LGBTQIA+fobia.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, por terem me acolhido como parte de sua comunidade discente.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), onde me formei Patologista.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU), instituição onde me formei médico e que semeou em mim a paixão por pesquisar e lecionar.

À minha orientadora, Dr^a Tainá Veras de Sandes-Freitas, por sua humildade, sua garra, sua disposição em ensinar e sua alma científica que inspira colegas e alunos.

Ao Laboratório de Patologia ARGOS, em especial ao meu chefe e amigo, Dr. Fábio Távora, pelo incentivo, suporte de infraestrutura e constante apoio para meu crescimento como médico patologista e cientista.

Ao Centro Universitário UNICHRISTUS, pelo apoio financeiro para realização de meus experimentos e pela oportunidade de exercer a docência no Ensino Superior.

Aos meus alunos de Iniciação Científica, que ao longo dos últimos 4 anos me auxiliaram na coleta de dados para a concretização deste estudo e confiaram em mim para guiá-los em seus primeiros passos pelo universo da Ciência.

A toda a equipe de Nefrologia e do Setor de Transplantes do Hospital Geral de Fortaleza, em especial a Dr. Ronaldo Esmeraldo, Dra. Maria Luíza, Dra Cláudia Oliveira, Dra Elizabeth Daher e Dra. Dulce Barreto, pela confiança em minhas análises e por me ajudarem a entender melhor o fascinante mundo da Nefrologia.

A meu grande amigo Ronaldo Ventura, minha eterna colega de internato Maria Tereza, my English teacher and great friend Camila Caminha, meus amigos e companheiros do Crossfit, meus colegas patologistas e a todos os demais que me acolhem, me respeitam e vibram com minha felicidade e minhas conquistas.

RESUMO

O diagnóstico de Rejeição Mediada por Anticorpos (RMA) em biópsias de aloenxertos renais ainda representa um desafio para clínicos e patologistas. São escassos os estudos que avaliam marcadores de lesão endotelial nestas amostras por meio da técnica de imuno-histoquímica (IHQ). Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão IHQ de Caveolina-1 (Cav), Fator de von Willebrand (Vwf) e T-Caderina (Cad) em biópsias com Alterações Mediadas por Anticorpos (AMC) e sua associação com parâmetros laboratoriais e patológicos de RMA, bem como avaliar a associação entre sua expressão em biópsias com Fibrose Intersticial/Atrofia Tubular (FI-AT) de etiologia indeterminada e o risco de perda do enxerto. Trata-se de estudo observacional transversal (Estudo 1, incluindo biópsias com AMC e FI-AT) e de coorte retrospectiva (Estudo 2, incluindo apenas biópsias com FI-AT de etiologia indeterminada). As amostras foram agrupadas considerando parâmetros como DSA, inflamação microvascular (MVI), C4d e diagnóstico de RMA. Os pacientes do Estudo 2 foram seguidos por 3 anos após a biópsia. Utilizou-se o teste AUC-ROC para identificar pontos de corte com melhor acurácia para predição de perda do enxerto. A associação com risco de falha do enxerto foi testada através de análise uni e multivariada por regressão de Cox ($p < 0,05$). Foram selecionadas 114 biópsias com AMC e 72 com FI-AT. Vwf mostrou maior expressão em amostras com MVI > 1 (61,7%, IQR 43,0%) ($p < 0,001$), positividade difusa para C4d (mediana = 62,9%) ($p < 0,001$), DSA positivas (mediana = 59,0% vs. 38,4%) ($p = 0,016$) e diagnosticadas como RMA (mediana = 54,0%, 21,5%, IQR 8,4%) ($p < 0,001$). Cad apresentou maior mediana de expressão em casos com MVI > 1 (48,7%, IQR 20,0%) ($p = 0,013$), positividade focal para C4d (55,1%, IQR 29,9%) ($p = 0,006$) e com RMA (16,5%, IQR 36,8% vs. 0,0%, IQR 18,4%) ($p < 0,001$). Esta positividade foi maior em casos de RMA crônica (30,0%, IQR 44,2%) ($p = 0,001$). Houve maior marcação para Cav em biópsias com MVI > 1 (0,0%, IQR 6,6%) ($p = 0,024$) e com RMA (0,0%, IQR 5,0% vs. 0,0%, IQR 0,0%) ($p = 0,001$). Vwf obteve maior acurácia para predizer perda do enxerto (AUC 0,637, IC 95% 0,486-0,788) ($p = 0,101$). Casos com marcação para Vwf $> 10\%$ em capilares peritubulares e *vasa recta* apresentaram menor sobrevida do enxerto 3 anos ($p = 0,006$). A análise multivariada mostrou que Vwf $> 10\%$ foi um fator de risco independente para perda do enxerto (HR = 2,88, IC 95% 1,03-8,02, $p = 0,043$). A expressão IHQ de Cad, Cav e Vwf mostrou associação com parâmetros de injúria

microvascular. Marcação de Vwf >10% em biópsias com IF-TA de etiologia indeterminada foi preditor de perda do enxerto.

Palavras-chave: Rejeição de Enxerto; Fator de von Willebrand; Caderinas; Caveolina 1; Imuno-Histoquímica.

ABSTRACT

The diagnosis of antibody-mediated rejection (AMR) in kidney allograft biopsies still represents a challenge for clinicians and pathologists. There are scarce reports evaluating endothelial-associated transcripts in kidney allograft biopsies by immunohistochemistry (IHC). This study aimed to evaluate the IHC expression Caveolin-1 (Cav), Von Willebrand Factor (Vwf) and T-Cadherin (Cad) in biopsies with antibody-mediated changes (AMC) and Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy of Unknown Etiology (IF-TA), and its association with laboratorial and morphological parameters of Antibody-mediated rejection (AMR). To analyze the association of IHC expression and the risk of graft loss in samples with IF-TA. This is an observational study with 2 lines of investigation: cross-sectional (Research 1, including samples with AMC and IF-TA) and retrospective cohort (Research 2, including IF-TA cases). All cases were classified and grouped according to the following information: DSA, microvascular inflammation (MVI), C4d and AMR diagnosis. The patients of Research 2 were followed for 3 years after the biopsy. We used the AUC-ROC test to identify the cut-off values with highest accuracy to predict graft failure. The analysis of risk factors for graft loss was tested by Cox regression test (univariate and multivariate) ($p < 0,05$). 114 samples with AMC and 72 diagnosed as IF-TA were selected. Vwf showed higher median expression in samples with MVI > 1 (61,7%, IQR 43,0%) ($p < 0,001$), diffuse C4d positivity (62,9%, IQR 49,0%) ($p < 0,001$), DSA (59,0%, IQR 35,3% vs. 38,4%, IQR 16,9%) ($p = 0,016$) and AMR (54,0%, IQR 44,7% vs. 21,5%, IQR 8,4%) ($p < 0,001$). Cad had higher median expression in cases with MVI > 1 (48,7, IQR 20,0%) ($p = 0,013$), focal C4d positivity (55,1%, IQR 29,9%) ($p = 0,006$) and AMR (16,5%, IQR 36,8% vs. 0,0%, IQR 18,4%) ($p < 0,001$). The positivity was higher in chronic AMR (30,0%, IQR 44,2%) ($p = 0,001$). We observed higher Cav median positivity in biopsies with MVI > 1 (0,0%, IQR 6,6%) ($p = 0,024$) and confirmed as AMR (0,0%, IQR 5,0% vs. 0,0%, IQR 0,0%) ($p = 0,001$). Vwf had the highest accuracy to predict graft loss (AUC = 0,637, CI 95% 0,486-0,788) ($p = 0,101$). The samples with Vwf staining in more than 10% percent of peritubular capillaries and *vasa recta* presented lower graft survival in 3 years when compared with Vwf $< 10\%$ cases ($p = 0,006$). The multivariate analysis showed that Vwf was an independent risk factor for graft failure (HR = 2,88, CI 95% 1,03-8,02, $p = 0,043$). The other two markers were not associated with graft loss. The IHC expression of Vwf, Cad and Cav showed association with microvascular

injury parameters. The Vwf > 10% staining in IF-TA biopsies was a predictor of graft loss.

Keywords: Graft rejection; Von Willebrand Factor; Cadherins; Caveolin 1; Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fisiopatologia da rejeição mediada por anticorpos.....	26
Figura 2 - Mecanismos de dano crônico ao enxerto renal.	32
Figura 3 - Conformação estrutural de T-Caderina.	37
Figura 4 - Estruturas envolvidas na formação das Cavéolas.....	38
Figura 5 - Papel do Fator de von Willebrand no processo de trombogênese.	40
Figura 6 - Máquina BenchMarck Gx Ventana®.	51
Figura 7 - Definição da amostra de acordo com critérios de inclusão e exclusão ...	56
Figura 8 -Distribuição dos casos conforme porcentual de capilares peritubulares e vasa recta com marcação para Fator de Von Willebrand, T-Caderina e Caveolina-1.	59
Figura 9 - Distribuição dos casos conforme MVI e positividade em capilares peritubulares e vasa recta para Fator de Von Willebrand.	60
Figura 10 - Distribuição dos casos conforme MVI e positividade em capilares peritubulares e vasa recta para T-Caderina.....	61
Figura 11 - Distribuição dos casos conforme MVI e positividade em capilares peritubulares e vasa recta para Caveolina-1.	61
Figura 12 - Distribuição dos casos conforme escore de positividade para C4d e marcação em capilares peritubulares e vasa recta para Fator de Von Willebrand (A) e T-Caderina (B)	63
Figura 13 - Distribuição dos casos conforme a positividade para DSA e a marcação em capilares peritubulares e vasa recta para Fator de Von Willebrand.....	63
Figura 14 - Distribuição dos casos conforme o diagnóstico de RMA e a marcação em capilares peritubulares e vasa recta para Fator de Von Willebrand (A), T-Caderina (B) e Caveolina-1 (C).....	65
Figura 15 - Distribuição dos casos conforme o diagnóstico de RMA e a marcação em capilares peritubulares e vasa recta para Fator de Von Willebrand (A), T-Caderina (B) e Caveolina-1 (C).....	66
Figura 16 - Distribuição dos casos conforme a combinação de MVI e C4d e a marcação para Fator de Von Willebrand (A) e T-Caderina (B).....	68
Figura 17 - Distribuição dos casos conforme a combinação de DSA, MVI e C4d e a marcação para Fator de Von Willebrand.	69

Figura 18 - Distribuição dos casos conforme a média de marcação de Fator de Von Willebrand e T-Caderina e os diagnósticos de FI-AT, positividade para C4d sem sinais de rejeição e RMA.....	69
Figura 19 - Alterações histopatológicas e marcação imuno-histoquímica em caso de RMA crônica ativa MVI+/C4d+. A) Duplos contornos em alças capilares glomerulares, caracterizando glomerulopatias crônica do transplante (Prata Jones, 400x). B) Marcação focal para Cav em capilares peritubulares corticais (200x). C) Marcação moderada de Vwf em capilares peritubulares corticais (100x). D) Marcação difusa para Cav em capilares peritubulares e vasa recta (400x).	70
Figura 20 - Alterações histopatológicas e marcação imuno-histoquímica em caso de FI-AT, DSA-, MVI-, C4d-. A) Fibrose intersticial e atrofia tubular (Tricrômio de Masson, 200x). B) Marcação focal para Vwf em capilares peritubulares corticais (200x). C) Marcação focal para Cad em capilares peritubulares corticais (200x). D) Ausência de marcação para Cav (200x).	71
Figura 21 - Curvas AUC-ROC dos marcadores Fator de Von Willebrand, T-Caderina e Caveolina-1 para predição de perda do enxerto.	76
Figura 22 - Curva de sobrevida Kaplan-Meier do enxerto em 3 anos censurada para óbitos.....	77
Figura 23 - Curva de sobrevida Kaplan-Meier do enxerto em 3 anos censurada para óbitos.....	78
Figura 24 - Médias marginais estimadas da Taxa de Filtração Glomerular no momento da biópsia e 1, 2 e 3 anos após a biópsia.	79
Figura 25 - Esquema visual para definição da porcentagem de estreitamento da área luminal.....	102
Figura 26 - Escala visual para determinação da porcentagem de fibrose intersticial no córtex. A: escala para determinação de fibrose focal (esquerda) e confluyente (direita) sem glomérulos. B: escala para fibrose focal (esquerda) e confluyente (direita) com glomérulos na amostra	104
Figura 27 - Alterações histopatológicas presentes em casos de RMA. A) Glomérulos aumentados de tamanho, com infiltração por células inflamatórias (PAS, 200x). B) Glomérulo com infiltração de células inflamatórias e tumefação do endotélio (PAS, 400x). C) Duplicações em alças capilares glomerulares (cg) em caso de RMA crônica (Prata Jones, 400x). D) Congestão de capilares peritubulares por células inflamatórias e alterações reativas em endotélio, caracterizando pericapilarite (HE,	

400x). E) Arterite moderada (v2), com semioclusão luminal, destacamento de células endoteliais e infiltrado leucocitário (HE, 400x). F) Arterite leve (v1), com destacamento endotelial e infiltrado leucocitário adjacente ao endotélio (Prata Jones, 400x)..... 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas dos receptores e principais achados patológicos	57
Tabela 2 - Características demográficas dos casos com FI-AT conforme o diagnóstico de perda do enxerto	72
Tabela 3 - Alterações histológicas e marcação imuno-histoquímica para Caveolina-1, Fator de Von Willebrand e T-Caderina dos casos com FI-AT conforme o diagnóstico de perda do enxerto	74
Tabela 4 - Características demográficas, laboratoriais e histológicas dos pacientes conforme o percentual de capilares e peritubulares para Fator de Von Willebrand ($\leq 10\%$ e $>10\%$).....	76
Tabela 5 - Análise univariada e multivariada dos fatores de risco para perda do enxerto.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAH: Hialinose arteriolar nodular
AMC: Alterações Mediadas por Anticorpos
AH: Hialinose arteriolar não nodular
ATG: Globulina antitimócito
AT₁R: Receptor tipo 1 da Angiotensina 2
Cav: Caveolina-1
CCL: *Cell Conditioning Solution*
cg: Duplos contornos em alças capilares glomerulares
ci: Fibrose intersticial
Cr: Creatinina sérica
ct: Atrofia tubular
cv: Espessamento fibroso intimal de vasos de médio calibre
DSA: Anticorpo específico anti-HLA do doador
ENDAT: Produto de transcrição da célula endotelial ativada
eTFG: Taxa de Filtração Glomerular estimada
FI-AT: Fibrose intersticial e atrofia tubular
HLA: Antígeno Leucocitário Humano
HR: *Hazard ratio*
IC: Intervalo de Confiança
i-IFTA: Inflamação em áreas de fibrose
IHQ: Imuno-histoquímica
IF: Imunofluorescência
IMC: Índice de Massa Corpórea
IQR: Intervalo Interquartil
MHC: Complexo Maior de Histocompatibilidade
MIF: Média de Intensidade de Fluorescência
mTORi: Inibidor da via mTOR (mammalian target of rapamycin)
MVI: Escore de injúria microvascular
MPA: Micofenolato de mofetila ou sódico
NCE: Nefropatia Crônica do Enxerto
NK: *Natural-killer*
PRA: Painel de Reatividade de Anticorpos

RMA: Rejeição Mediada por Anticorpos

RMCT: Rejeição Mediada por Células T

ptc: capilarite peritubular

ptcml: multilaminação da membrana basal de capilares peritubulares

TAC: Tacrolimo

Cad: T-Caderina

Vwf: Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Mecanismos imunológicos de disfunção do enxerto renal	20
2.2	Fisiopatologia da RMA	21
2.2.1	Papel dos anticorpos anti-HLA	21
2.2.2	Anticorpos não anti-HLA	23
2.2.3	O papel do sistema complemento	24
2.2.4	Mecanismos não relacionados ao complemento	26
2.3	Diagnóstico de RMA: classificação de Banff.....	27
2.4	Lesão crônica mediada por anticorpos e fibrose renal	29
2.5	C4d como biomarcador de RMA	32
2.6	Marcadores moleculares e o papel do endotélio	33
2.7	T-caderina.....	36
2.8	Caveolina-1.....	37
2.9	Fator de von Willebrand.....	39
3	PERGUNTAS DE PARTIDA	41
4	HIPÓTESES	42
5	OBJETIVOS.....	43
6	MATERIAIS E MÉTODOS	44
6.1	Tipo de estudo	44
6.2	Locais do estudo	44
6.3	Definição da população	44
6.3.1	Critérios de inclusão.....	45
6.3.2	Critérios de exclusão	46
6.4	Aspectos éticos	46
6.5	Coleta de dados	47

6.6	Variáveis analisadas	47
6.6.1	Estudos 1 e 2.....	47
6.6.2	Dados específicos do Estudo 2	48
6.7	Definições	49
6.8	Estudo imuno-histoquímico	50
6.8.1	Seleção dos marcadores de lesão endotelial.....	50
6.8.2	Descrição da técnica	51
6.8.3	Critérios de avaliação	53
6.9	Análise estatística	53
7	RESULTADOS	56
7.1.	Estudo 1.....	56
7.1	Estudo 2	72
8	DISCUSSÃO	82
9	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICE A – PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DA CLASSIFICAÇÃO DE BANFF	100
	APÊNDICE B – ANÁLISES ESTATÍSTICAS DO ESTUDO 1	109

1 INTRODUÇÃO

A rejeição mediada por anticorpos (RMA), uma causa importante de lesão aguda e crônica ao enxerto renal, é um processo complexo caracterizado pela interação entre imunoglobulinas e antígenos específicos, como os antígenos leucocitários humanos (HLA) (BLUME; YOST; KAPLAN, 2012; HAAS, 2018; PUTTARAJAPPA; SHAPIRO; TAN, 2012), resultando em processos como ativação do sistema complemento, recrutamento de células inflamatórias e danos à microvasculatura (LOUPY; LEFAUCHEUR, 2018; STITES; LE QUINTREC; THURMAN, 2015). Os critérios patológicos para o diagnóstico de RMA foram estabelecidos após o consenso Banff de 1997 e foram gradativamente refinados nos encontros subsequentes. Estes critérios envolvem uma combinação de alterações clínicas, laboratoriais e histopatológicas, como a gradação de injúria inflamatória microvascular, a análise do marcador C4d (subproduto de ativação da via clássica do complemento) por meio dos métodos de imuno-histoquímica (IHQ) ou imunofluorescência (IF) e a pesquisa de anticorpos específicos anti-HLA do doador (DSA) (BHOWMIK; DINDA; MAHANTA; AGARWAL, 2010; LOUPY; HAAS; ROUFOSSE; NAESENS *et al.*, 2020).

No ano de 2013, a classificação de Banff passou a integrar marcadores moleculares relacionados à ativação de células endoteliais e ativação de células *Natural-Killer* (NK), como uma nova ferramenta para o diagnóstico de lesões anticorpo-mediadas (HAAS; SIS; RACUSEN; SOLEZ *et al.*, 2014). Vários estudos reforçaram posteriormente a importância da patologia molecular, que representa atualmente um dos principais focos de estudo para o aprimoramento da classificação (GUPTA; BROIN; BAO; PULLMAN *et al.*, 2016; LOUPY; HAAS; ROUFOSSE; NAESENS *et al.*, 2020; LOUPY; HAAS; SOLEZ; RACUSEN *et al.*, 2017; LOUPY; LEFAUCHEUR; VERNEREY; CHANG *et al.*, 2014).

A análise por meio de microarranjos de DNA dos produtos de transcrição da célula endotelial ativada (ENDATs) permite uma melhor compreensão de mecanismos de lesão relacionados a imunoglobulinas, os quais encontram-se frequentemente envolvidos na patogênese da RMA, mesmo em amostras sem marcação para C4d ou

sem pesquisa positiva para DSAs (SIS; JHANGRI; BUNNAG; ALLANACH *et al.*, 2009; SIS; JHANGRI; RIOPEL; CHANG *et al.*, 2012). Alguns dos marcadores envolvidos são o fator de von Willebrand (Vwf), que possui papel fundamental em processos trombóticos (GRAGNANO; SPERLONGANO; GOLIA; NATALE *et al.*, 2017), T-Caderina (Cad), biomarcador estudado em processos como aterosclerose e doenças da microvasculatura (RESINK; PHILIPPOVA; JOSHI; KYRIAKAKIS *et al.*, 2009), e Caveolina-1 (Cav), proteína que age na regulação de vias de sinalização relacionadas a fibrogênese (MOORE; MCKNIGHT; SIMMONDS; COURTNEY *et al.*, 2010). A expressão destes três marcadores está aumentada em casos de RMA (SIS, 2012).

Os casos de RMA crônica representam um importante desafio diagnóstico, principalmente em amostras com sinais de fibrose intersticial e atrofia tubular (FI-AT) em fase avançada, onde os parâmetros de lesão microvascular muitas vezes já não são observados (RACUSEN; REGELE, 2010; RIELLA; DJAMALI; PASCUAL, 2017). Sabe-se que perdas crônicas do enxerto mostram importante associação com má aderência ao tratamento imunossupressor e alterações imunomediadas (AKALIN; O'CONNELL, 2010; SELLARÉS; REEVE; LOUPY; MENGEL *et al.*, 2013), entretanto muitas vezes o diagnóstico de rejeição é dificultado pelas limitações inerentes à própria classificação de Banff para casos crônicos. Deste modo, são frequentes os laudos patológicos de FI-AT de etiologia indeterminada em amostras de biópsias de pacientes com disfunção crônica do enxerto.

O aprimoramento de técnicas para pesquisa dos ENDATs representa uma importante evolução na classificação de Banff, tendo em vista o fato de poderem contribuir para o diagnóstico de RMA em casos que não preenchem os critérios diagnósticos clássicos, como naqueles sem positividade e/ou DSA, bem como em amostras com inflamação microvascular ausente ou mínima (DOMINY; WILLICOMBE; AL JOHANI; BECKWITH *et al.*, 2019; HALLORAN; FAMULSKI; REEVE, 2016; SELLARÉS; REEVE; LOUPY; MENGEL *et al.*, 2013). No entanto, a avaliação molecular da expressão de marcadores de células endoteliais ainda é um método caro, não padronizado e pouco acessível na maioria dos laboratórios de patologia em centros de transplante. Além disso, outros parâmetros, como inflamação microvascular, pesquisa de DSA e C4d, também apresentam suas próprias limitações (COHEN; COLVIN; DAHA; DRACHENBERG *et al.*, 2012). Deve-se frisar ainda que há poucos estudos que avaliam a aplicabilidade da análise de biomarcadores de lesão

endotelial por meio de outros métodos, como a IHQ, método de menor custo e mais acessível, em amostras de biópsia (NAKADA; YAMAMOTO; HORITA; KOBAYASHI *et al.*, 2016; OZDEMIR; SAR; HABERAL, 2006; YAMAMOTO; HORITA; TAKAHASHI; KOBAYASHI *et al.*, 2008).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mecanismos imunológicos de disfunção do enxerto renal

O transplante renal representa uma abordagem terapêutica para parte dos pacientes com diagnóstico de doença renal crônica (DRC) em fase terminal. Dentre seus benefícios em relação à terapia dialítica, podemos citar importante melhora da qualidade de vida, redução de morbidades e maior expectativa de vida (WOLFE; ASHBY; MILFORD; OJO *et al.*, 1999). Todavia, este procedimento não isenta o paciente de complicações e consequente risco de perda do enxerto, dentre as quais podemos citar fenômenos imunológicos como os quadros de rejeição, que comprometem aproximadamente 15% dos pacientes transplantados (VAN LOON; BERNARDS; VAN CRAENENBROECK; NAESENS, 2020).

O processo físico de remoção, reimplante e reperfusão de um órgão para transplante já contribui, por si só, para danos ao enxerto que influenciarão a resposta imunológica do receptor. O processo de isquemia-reperfusão leva à geração de vários marcadores de lesão tecidual, como radicais livres, sulfato de heparina, *Heat-Shock proteins*, fibrinogênio, que apresentam potencial de estimular as células da imunidade inata. Deste modo, há produção de várias citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, etc.), ativação do sistema complemento e, conseqüentemente, indução da resposta imune adaptativa. Tal processo ocorre independente da existência ou não de compatibilidade entre doador e receptor (WOOD; GOTO, 2012).

A rejeição ao aloenxerto pode ser definida como resposta imune ativa do receptor e direcionada ao órgão transplantado, levando a deterioração funcional deste (SUTHANTHIRAN, 1997). Tal processo baseia-se primariamente na ativação de linfócitos T autorreativos e células apresentadoras de antígeno, como linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. A seqüência de eventos tem início no reconhecimento, por meio de complexos MHC classe I e II, de diferenças de histocompatibilidade entre doador e receptor. Quanto ao mecanismo de injúria

imunológica, os episódios de rejeição são classificados em rejeição mediada por células T (RMCT) e rejeição mediada por anticorpos (RMA), as quais podem ser agudas/ativas e/ou crônicas. Seus critérios diagnósticos foram gradativamente refinados e modificados, com especial enfoque na RMA (MOROZUMI; TAKEDA; OTSUKA; HORIKE *et al.*, 2016).

Sabe-se que o poder destrutivo de aloanticorpos foi primeiramente reconhecido nos anos 60 na forma da rejeição hiperaguda associada a anticorpos pré-formados no momento do transplante. Contudo, as nuances da RMA permaneceram desconhecidas por décadas. Apenas no início dos anos 90 foram identificados casos de rejeição aguda associados a anticorpos dirigidos contra antígenos leucocitários humanos (HLAs). Estas rejeições eram mais graves que os casos associados à RMCT, sendo resistentes à terapia imunossupressora e caracterizadas por injúria microvascular associada a inflamação (STITES; LE QUINTREC; THURMAN, 2015). Desde então, observam-se casos de RMA demonstrados em transplantes de diversos órgãos, muitos deles não previamente sensibilizados. O diagnóstico RMA ativa tem sido relatado em cerca de 7% dos receptores, em 20 a 30% dos pacientes com rejeição aguda e em 20% a 48% de pacientes com Crossmatch por citometria de fluxo positivo (SIS; HALLORAN, 2010). Há um pior prognóstico deste tipo de rejeição quando comparada à RMCT, especialmente em casos crônicos, os quais representam hoje a principal causa de disfunção tardia do enxerto (WOOD; GOTO, 2012).

2.2 Fisiopatologia da RMA

2.2.1 Papel dos anticorpos anti-HLA

Anticorpos doador-específicos podem ser definidos como anticorpos complementares à região de um peptídeo do doador que não está presente no receptor, ou seja, esta região é considerada como estranha ao sistema imune do receptor. No contexto do paciente transplantado, o alvo antigênico dos aloanticorpos são proteínas do complexo MHC em indivíduos com *mismatches*, ou seja, discordâncias em *loci* específicos do HLA entre doador e receptor. A função do

complexo HLA é apresentar peptídeos dos meios intra e extracelular a linfócitos T, facilitando o reconhecimento de proteínas estranhas e a iniciação da resposta imune (MCCAUGHAN; TINCKAM, 2018).

O processo inicial na geração de anticorpos consiste na exposição de um HLA reconhecido como estranho, que será reconhecido por um linfócito B localizado nos órgãos linfoides, o qual apresentará antígenos a células T CD4+. A interação entre ambas as células leva a uma resposta coestimulatória, o que promove a diferenciação de linfócitos B em células de memória e plasmócitos, sendo estes responsáveis pela produção de anticorpos. Esta etapa é chamada de sensibilização e pode ocorrer tanto no pré-transplante (gestação, transfusões sanguíneas, enxertos em grandes queimados) como *de novo* após o implante do enxerto (MCCAUGHAN; TINCKAM, 2018; MOROZUMI; TAKEDA; OTSUKA; HORIKE *et al.*, 2016).

Anticorpos anti-HLA possuem um papel fundamental na patogenia da RMA em todos os seus subtipos, dentre os quais podemos citar: rejeição ativa, caracterizada por injúria microvascular aguda; rejeição crônica, em que se observam sinais de remodelamento da microvasculatura; e rejeição crônica ativa, onde ambas as alterações coexistem (LOUPY; HAAS; ROUFOSSE; NAESENS *et al.*, 2020; MCCAUGHAN; TINCKAM, 2018). A RMA pode ser observada mais dramaticamente nos casos de anticorpos pré-formados no momento do transplante, como nos casos de rejeição hiperaguda, caracterizada por dano acentuado ao enxerto minutos após sua reperusão. Tais anticorpos promovem ativação local da cascata da coagulação e do complemento, resultando em trombose extensa e infarto do enxerto (WOOD; GOTO, 2012).

Pacientes com DSA pré-formados antes de se iniciar a terapia imunossupressora estão mais propensos a casos de RMA precoce. Já anticorpos *de novo*, habitualmente detectados após 1 ano de transplante em pacientes subimunossuprimidos, estão associados a disfunção tardia do enxerto e prognóstico mais reservado (AUBERT; LOUPY; HIDALGO; DUONG VAN HUYEN *et al.*, 2017). A produção de DSAs em indivíduos adultos previamente não sensibilizados ocorre em 7% dos casos após 5 anos e em até 20% após os 10 anos. A incidência tende a ser maior em pacientes pediátricos e naqueles com histórico de má aderência ao tratamento imunossupressor. Casos tardios podem apresentar diferentes fenótipos morfológicos, moleculares e sorológicos e tendem a ser menos responsivos a

abordagens terapêuticas tradicionais (BÖHMIG; ESKANDARY; DOBERER; HALLORAN, 2019).

O potencial lesivo e a patogenicidade associada a diferentes DSAs não são homogêneos e encontram-se diretamente relacionado a fatores como o subtipo de IgG (IgG1 e IgG3 tendem a ser mais patogênicos) e seu potencial de fixar proteínas do sistema complemento (MCCAUGHAN; TINCKAM, 2018; VALENZUELA; REED, 2013; 2017). A fixação do complemento por anticorpos anti-HLA consiste em um mecanismo primário de dano ao enxerto renal mediado por anticorpos. Anticorpos com afinidade de ligação a C1q apresentam um risco aumentado de rejeição e perda do enxerto (MOROZUMI; TAKEDA; OTSUKA; HORIKE *et al.*, 2016). Além disso, a presença de DSA pode levar a lesão do enxerto por mecanismos não relacionados a ativação do complemento, tais como ativação de células NK e toxicidade direta relacionada ao próprio anticorpo (STITES; LE QUINTREC; THURMAN, 2015).

A detecção de anticorpos anti-HLA é realizada por meio de uma plataforma multiplex (*Luminex*), na qual cerca de 200 antígenos HLA são acoplados a marcadores de fluorescência para caracterizar um padrão de resposta de aloanticorpos individual. Após o transplante, DSAs com média de intensidade de fluorescência (MIF) entre 2500-3000 ou acima estão associados com pior prognóstico do enxerto, embora o valor de referência para critério de positividade possa apresentar variações entre os centros de transplante (SÜSAL; ROELEN; FISCHER; CAMPOS *et al.*, 2013).

Há evidências, no entanto, de que a presença de anticorpos circulantes não necessariamente implica em disfunção do enxerto, caracterizando um estado de “acomodação”. Ao contrário, há evidências de anticorpos anti-HLA de classe I mediando a ativação de vias de sinalização AKT e mecanismos citoprotetores (KENTA; TAKAOKI, 2020). Deste modo, pacientes com DSA e biópsias sem evidências de rejeição não necessariamente desenvolvem quadros futuros de dano aloimune, podendo até mesmo ocorrer clareamento dos anticorpos com o tempo (HAYDE; BROIN; BAO; DE BOCCARDO *et al.*, 2014).

2.2.2 Anticorpos não anti-HLA

Outras classes de anticorpos podem levar a dano ao enxerto em casos de

rejeição, tendo em vista a ocorrência de casos de RMA com sinais de ativação do complemento em indivíduos com pesquisa negativa para DSAs. Estes casos foram contemplados a partir da atualização da classificação de Banff 2017 (HAAS; LOUPY; LEFAUCHEUR; ROUFOSSE; GLOTZ; SERON; NANKIVELL; HALLORAN; COLVIN; AKALIN; ALACHKAR; BAGNASCO; BOUATOU; BECKER; CORNELL; VAN HUYEN *et al.*, 2018). Embora alguns quadros possam ser explicados pela adsorção de DSA pelo enxerto renal, há evidências crescentes da participação de outras classes de anticorpos em casos de rejeição, não dirigidos a antígenos HLA. Estes antígenos não se encontram habitualmente presentes na superfície das células endoteliais, sendo representados por moléculas que se tornam expostas após algum tipo de lesão tecidual, como casos de injúria pós-reperusão ou episódios prévios de rejeição. Como exemplos, podem ser citados os antígenos LG3, produzidos por células endoteliais em apoptose, bem como os receptores tipo 1 de angiotensina 2 (AT₁R) e receptores para endotelina (ETAR), os quais apresentam expressão aumentada no endotélio de pacientes com quadros hipertensivos graves (BANASIK; BORATYŃSKA; KOŚCIELSKA-KASPRZAK; MAZANOWSKA *et al.*, 2013; CARDINAL; DIEUDÉ; HÉBERT, 2017; DRAGUN; CATAR; PHILIPPE, 2013; DRAGUN; MÜLLER; BRÄSEN; FRITSCHÉ *et al.*, 2005; VALENZUELA; REED, 2017).

A presença de AT₁R e ETAR pré-transplante pode identificar um subgrupo de pacientes com elevado risco de rejeição e perda do enxerto, independente da resposta aloimune direcionada a HLAs, mesmo em indivíduos classificados como de baixo risco imunológico (QUAGLIA; JUTAND; DHILLON; GODFREY *et al.*, 2005; QUAGLIA; MERLOTTI; GUGLIELMETTI; CASTELLANO *et al.*, 2020). Estes anticorpos exercem suas ações sinergicamente com DSAs clássicos. Após a ligação com seus receptores, há a modificação do fenótipo e ativação das células endoteliais por meio de diferentes vias de sinalização. Deste modo, eles representam uma ponte entre alo e autoimunidade na rejeição, tendo em vista que estes 2 componentes podem interagir entre si e se amplificarem (BALDWIN; KASPER; ZACHARY; WASOWSKA *et al.*, 2004; SIS; HALLORAN, 2010).

2.2.3 O papel do sistema complemento

Em casos de RMA, a ativação do sistema complemento constitui evento chave para a promoção de lesão mediada por aloanticorpos às células endoteliais. Após a ligação destes anticorpos a antígenos HLA e não anti-HLA, ocorre a ativação do complexo C1 (via clássica do complemento), o qual promove a clivagem de C4 e C2, com formação da C3 convertase. Após a formação da C3 convertase (C2a-C4d), o componente C3 é clivado em C3a e C3b. A fração C3b contribui para a formação da C5 convertase, com consequente formação do Complexo de Ataque à Membrana (STITES; LE QUINTREC; THURMAN, 2015). A ativação do sistema complemento leva ainda à produção de vários fragmentos biologicamente ativos. O fragmento C3b age como uma opsonina, ligando-se à superfície das células lesadas. O Complexo de Ataque à Membrana leva à formação de poros na superfície das células endoteliais e induz ativação de vias pró-inflamatórias, como Nf-kb, a qual leva à transcrição e síntese de várias proteínas pró-inflamatórias. Já marcador C5a está associado a respostas como vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular .

Uma característica peculiar do sistema complemento consiste no fato de que as proteínas C3 e C4 são clivadas e seus subprodutos, como a fração C4d, ligam-se de forma covalente e estável às superfícies lesadas, podendo ser avaliadas por meio de técnicas como IHQ e IF. A fração C4d atualmente é utilizada para corroborar o diagnóstico de RMA, pelo fato de ser mais abundante e possuir ligação mais estável à membrana (STITES; LE QUINTREC; THURMAN, 2015). Todavia, deve-se frisar que a ausência de marcação não afasta a possibilidade de lesão mediada por anticorpos. (HAAS; SIS; RACUSEN; SOLEZ *et al.*, 2014; WOOD; GOTO, 2012). Após estudos moleculares, Sis *et al* demonstraram que apenas 40% dos casos de RMA crônica mostravam positividade para C4d (SIS; HALLORAN, 2010). A figura 1 ilustra a fisiopatologia da RMA e os fármacos utilizados para sua prevenção e tratamento.

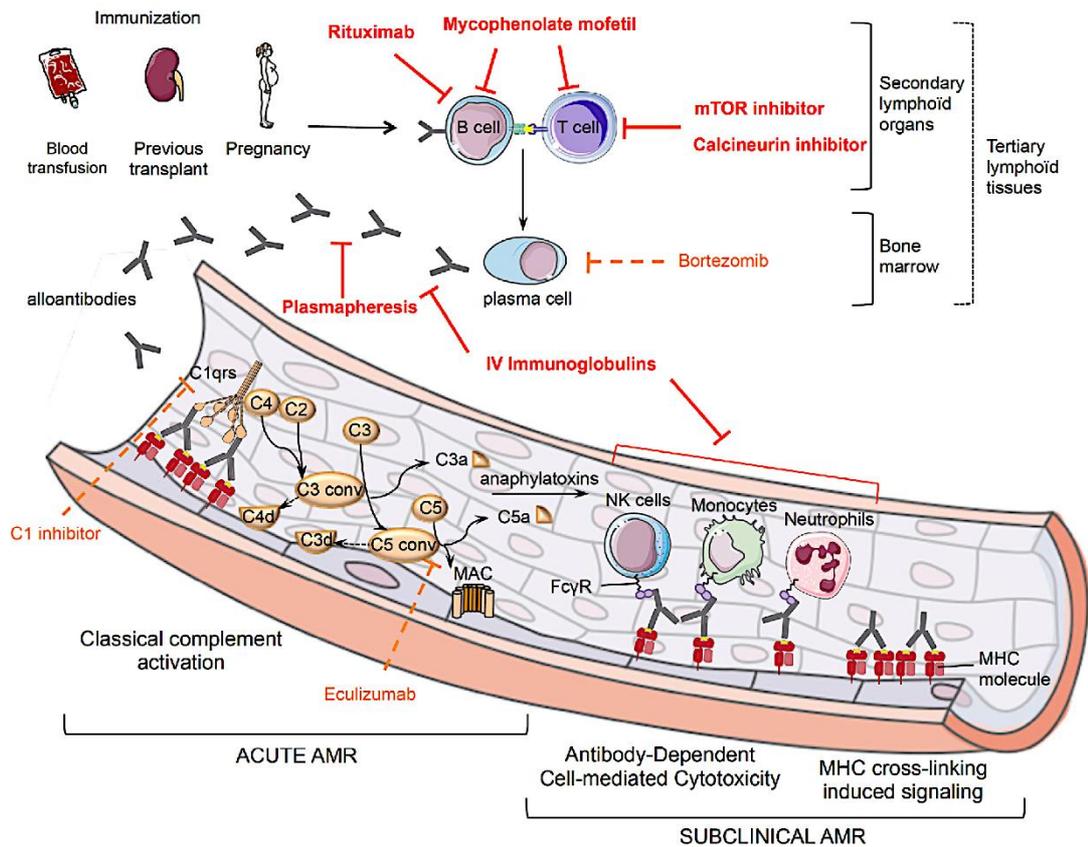


Figura 1: Fisiopatologia da rejeição mediada por anticorpos. A patogênese da RMA envolve inicialmente etapa denominada sensibilização, na qual o sistema imunológico do receptor entra em contato com aloantígenos, promovendo assim a síntese de anticorpos anti-HLA. Estes anticorpos interagem com antígenos nas células endoteliais da microvasculatura, levando à ativação do sistema complemento, recrutamento de células inflamatórias e consequente dano ao enxerto.

Fonte: Pouliquen et al, *F1000Prime Reports*, 2015 (POULIQUEN; KOENIG; CHEN; SICARD et al., 2015).

2.2.4 Mecanismos não relacionados ao complemento

A presença de aloanticorpos pode também induzir a lesão do enxerto por vias independentes da ativação do sistema complemento. Dentre estes mecanismos, podemos citar os seguintes:

- a) DSA's podem induzir aumento da liberação do fator de Von-Willebrand (Vwf), envolvido em respostas inflamatórias e trombóticas;
- b) Células endoteliais ativadas por estes anticorpos expressam e secretam mediadores inflamatórios (E-selectina, P-selectina, ICAM-1, VCAM-1 e CX3CL1), os

quais aumentam o recrutamento de leucócitos. Estes leucócitos, quando ativados, secretam citocinas como TNF-alfa e IL-1, as quais aumentam a ativação endotelial;

c) Dano ao endotélio por meio da citotoxicidade mediada por células NK ou monócitos/macrófagos por meio de receptores Fc (BÖHMIG; ESKANDARY; DOBERER; HALLORAN, 2019).

O reconhecimento de lesão endotelial por mecanismos independentes do sistema complemento mostra-se fundamental para o refinamento de critérios diagnósticos de RMA em fragmentos de biópsia, bem como aprimoramento de técnicas moleculares para investigação de fenômenos imunes relacionados à ativação de células endoteliais (HAAS; SIS; RACUSEN; SOLEZ *et al.*, 2014; SIS, 2012; SIS; JHANGRI; BUNNAG; ALLANACH *et al.*, 2009).

2.3 Diagnóstico de RMA: classificação de Banff

Até os anos 1990, a rejeição do enxerto renal era classificada em quatro tipos: hiperaguda, aguda, aguda acelerada e crônica. No entanto, havia acentuada heterogeneidade entre os patologistas ao caracterizarem biópsias de enxerto renal (BHOWMIK; DINDA; MAHANTA; AGARWAL, 2010). Deste modo, frente à necessidade de maior padronização, um grupo de nefrologistas, patologistas e cirurgiões de transplante organizaram um encontro na cidade de Banff, no Canadá, em 1991, dando início à classificação atualmente utilizada globalmente para o exame histológico de órgãos transplantados.

Esta classificação tem passado por frequentes modificações ao longo dos anos. As principais mudanças que impactam no diagnóstico RMA são mostrados a seguir:

- **1991:** casos de rejeição eram classificados como hiperagudos, agudos e borderline. Casos crônicos deveriam ser diagnosticados como nefropatia crônica do enxerto (NCE) (SOLEZ; AXELSEN; BENEDIKTSSON; BURDICK *et al.*, 1993).

- **1997**: definição de critérios para o diagnóstico de RMA, a qual foi subcategorizada em hiperaguda e aguda acelerada (RACUSEN; SOLEZ; COLVIN; BONSI *et al.*, 1999).
- **2001**: maior detalhamento do mecanismo de lesão por anticorpos. Estudos apresentados nesta conferência mostraram que biópsias apresentando evidências de deposição da fração do complemento C4d mostravam associação com parâmetros de lesão microvascular e menor sobrevida do enxerto. Assim, ele foi aceito como um marcador para o diagnóstico de RMA (RACUSEN; HALLORAN; SOLEZ, 2004).
- **2005**: a categoria NCE foi eliminada. Foi criada a categoria fibrose intersticial e atrofia tubular (FI-AT) de origem indeterminada, bem como definidos com maior precisão os critérios morfológicos de danos não imunes crônicos ao enxerto, como hipertensão crônica, toxicidade a inibidores de calcineurina, quadros infecciosos e obstrução de vias urinárias. Foram ainda estabelecidos critérios morfológicos mais acurados para o diagnóstico de RMA crônica (SOLEZ; COLVIN; RACUSEN; SIS *et al.*, 2007).
- **2007**: foram definidos escores para interpretação do marcador C4d e de parâmetros como capilarite peritubular (ptc) (SOLEZ; COLVIN; RACUSEN; HAAS *et al.*, 2008).
- **2013**: marcadores moleculares foram integrados à classificação para o diagnóstico de RMA. O marcador C4d deixou de ser obrigatório para o diagnóstico desta entidade em biópsias com inflamação microvascular significativa ($g + ptc > 1$) (DE SERRES; NOËL; CÔTÉ; LAPOINTE *et al.*, 2016; HAAS; SIS; RACUSEN; SOLEZ *et al.*, 2014).
- **2017**: foram definidos critérios para o diagnóstico de RMA com pesquisa negativa de DSAs (RMA histológica). Estabeleceu-se que tanto a expressão aumentada de ENDATs ou a positividade para C4d poderiam servir como potencial alternativa ou complemento para a pesquisa positiva de DSA no diagnóstico de RMA (LOUPY; HAAS; SOLEZ; RACUSEN *et al.*, 2017).
- **2019**: foram apresentadas as características clínicas e anatomopatológicas dos casos de RMA DSA negativos, bem como sua evolução. Propôs que os parâmetros de atividade e cronicidade da RMA sejam agrupados por meio de escores (LOUPY; HAAS; ROUFOSSE; NAESENS *et al.*, 2020).

Como principais vantagens da classificação, pode-se citar o fato de ela facilitar a comunicação entre clínicos e patologistas, permitindo a uniformização de estudos científicos para fins diagnósticos e terapêuticos. Contudo, alguns critérios

morfológicos, como semioclusão de alças e tumefação de células endoteliais, importantes para o diagnóstico de RMA, ainda estão sujeitos a subjetividade e variações interobservadores. Além disso, parâmetros como arterite e arteriopatia podem estar associados a mais de um tipo de rejeição (RMA ou rejeição mediada por células T), o que pode dificultar o diagnóstico diferencial entre estas entidades. A presença de casos positivos para C4d sem diagnóstico de rejeição ainda é motivo de debate, embora estudos recentes tenham demonstrado que um subgrupo destes pacientes apresenta risco aumentado de episódios futuros de RMA (DOMINY; WILLICOMBE; AL JOHANI; BECKWITH *et al.*, 2019; JEONG, 2020).

Os desafios da classificação consistem basicamente em promover uma maior integração entre parâmetros histológicos, imunofenotípicos e moleculares. Além disso, o fato de ser uma classificação dicotômica (presente ou ausente) resulta em uma dificuldade em se avaliar os processos patológicos do enxerto em seu espectro de continuidade.

2.4 Lesão crônica mediada por anticorpos e fibrose renal

A fibrose renal é o resultado do processo de lesão e reparo contínuo e excessivo após injúrias crônicas e sustentadas, com acúmulo de componentes da matriz extracelular. Clinicamente, este dano histológico está associado a disfunção crônica e risco aumentado de perda do enxerto (MOORE; MCKNIGHT; SIMMONDS; COURTNEY *et al.*, 2010). A fibrogênese envolve diversos mediadores, dentre os quais podemos citar aqueles envolvidos no processo de transição epitelial-mesenquimal, TGF- β , Cav, fatores de crescimento, dentre outros (VAN DER HAUWAERT; SAVARY; PINÇON; GNEMMI *et al.*, 2015).

Apesar dos avanços na prevenção de eventos desfavoráveis no pós-transplante inicial, mais de 50% dos enxertos renais ainda são perdidos após 10 anos de transplante e a taxa de progressão para perda tem permanecido relativamente inalterada nos últimos 25 anos. Dentre os diagnósticos mais comumente associados a perda tardia do enxerto e fibrose intersticial, destacam-se as rejeições crônicas, quadros infecciosos, nefropatia pelo vírus BK, transplante com rins apresentando

lesões estruturais oriundas do doador, complicações urológicas e toxicidade aos inibidores de calcineurina (RIELLA; DJAMALI; PASCUAL, 2017).

Em muitos pacientes, a fibrogênese inicia-se durante o primeiro ano de transplante, associada à lesão de isquemia-reperusão ou a episódios prévios de rejeição aguda. Posteriormente, pode haver progressão da lesão ou surgimento de novos eventos com potencial lesivo, em especial relacionados a quadros crônicos de rejeição.

A RMA crônica representa uma importante causa de perda do enxerto (VAN LOON; BERNARDS; VAN CRAENENBROECK; NAESENS, 2020). Sabe-se que fatores imunomediados podem estar presentes desde o pós-transplante precoce, mesmo que a inflamação não seja observada ao exame histológico, e podem predizer quadros de inflamação aloimune e rejeição subclínica. RMA crônica tende a ser mais tardia e exibe muitas das características patológicas de quadros agudos/ativos, tais como inflamação microvascular e deposição de C4d. À microscopia óptica, pode-se observar duplicações em alças de capilares glomerulares (cg, glomerulopatia do transplante), e infiltração de leucócitos na íntima de vasos de maior calibre associados a formação de neoíntima (cv, arteriopatia do transplante) (VALENZUELA; REED, 2017). Os critérios de microscopia eletrônica consideram multilaminação da membrana basal de capilares tubulares (ptcml) e alterações iniciais da glomerulopatias do transplante, como edema subendotelial e rarefação da membrana basal (cg1a). A presença de glomerulopatia crônica do transplante (cg) é um forte indicativo de RMA crônica, mesmo em casos que não preencham todos os critérios para o diagnóstico desta entidade (HAYDE; BAO; PULLMAN; YE; CALDER; CHUNG; SCHWARTZ; LUBETZKY *et al.*, 2013). Casos com histologia sugestiva de RMA crônica associados a DSA-/C4d- são um desafio e podem estar associados a outras etiologias. Como exemplo, estudos avaliando expressão gênica destes casos, apontaram para possibilidade de rejeição crônica mediada por células T (HAYDE; BAO; PULLMAN; YE; CALDER; CHUNG; SCHWARTZ; LUBETZKY *et al.*, 2013).

O diagnóstico de RMA crônica foi estabelecido após a conferência Banff em 2005 (SIS; CAMPBELL; MUELLER; HUNTER *et al.*, 2007), a partir da qual recomendou-se não mais utilizar o diagnóstico de nefropatia crônica do enxerto (NCE). Desde então, mecanismos de lesão aloimune tardia ao enxerto foram melhor avaliados, permitindo assim o diagnóstico preciso e uma melhor definição da

importante magnitude desta condição. O desenvolvimento de novos critérios diagnósticos, baseados em parâmetros como pesquisa de anticorpos, exames moleculares e história de má aderência, têm se mostrado útil neste aspecto (AKALIN; O'CONNELL, 2010; LOUPY; HAAS; SOLEZ; RACUSEN *et al.*, 2017; SELLARÉS; DE FREITAS; MENGEL; REEVE *et al.*, 2012).

No entanto, dificilmente, uma biópsia renal coletada em fase avançada de cronicidade permitirá uma definição precisa da causa de lesão ao enxerto, necessitando de estreita correlação com achados clínicos, laboratoriais e patológicos prévios. Digno de nota, a classificação de Banff apresenta um caráter essencialmente dicotômico e não considera as doenças como processos contínuos. Deste modo, ferramentas que adicionem informação na definição dos processos etiológicos em quadros crônicos de disfunção do enxerto são essenciais (VAN LOON; BERNARDS; VAN CRAENENBROECK; NAESENS, 2020). Em muitos casos, a história clínica não mostra dados relevantes as alterações histológicas são escassas e pouco específicas, não permitindo uma definição etiológica mais precisa (COSIO; GRANDE; LARSON; GLOOR *et al.*, 2005; SERVAIS; MEAS-YEDID; NOËL; MARTINEZ *et al.*, 2011; VANHOVE; GOLDSCHMEDING; KUYPERS, 2017). A figura 2 demonstra os principais mecanismos de dano crônico ao enxerto renal.

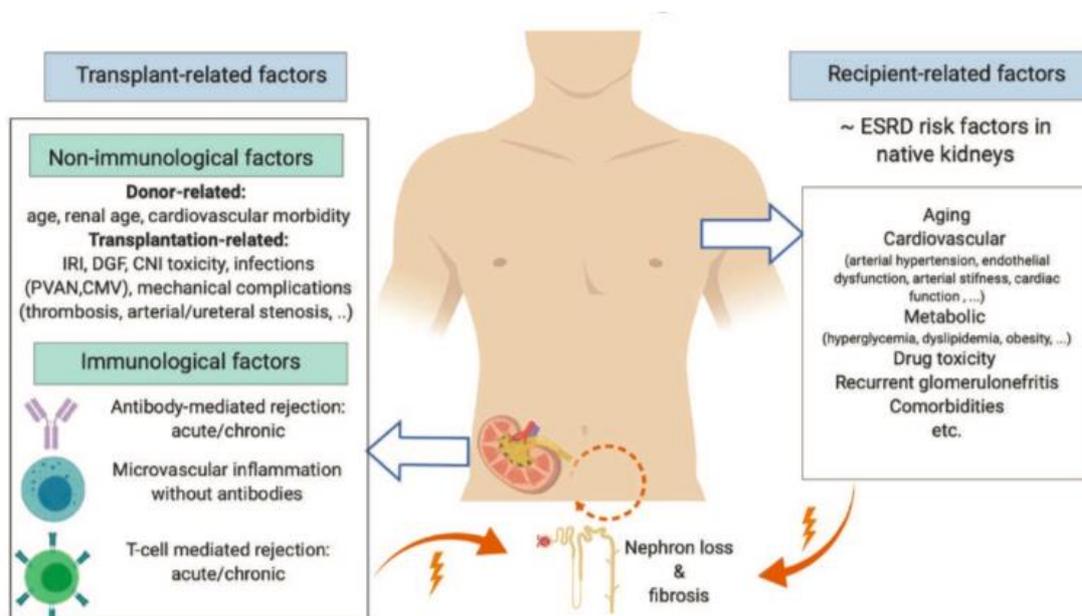


Figura 2: Mecanismos de dano crônico ao enxerto renal. A figura demonstra os diversos agentes etiológicos que podem levar a dano crônico ao enxerto renal, manifestando como Fibrose Intersticial e Atrofia Tubular ao exame histológico.

Fonte: Van Loon et al, Transplantation, 2020 (VAN LOON; BERNARDS; VAN CRAENENBROECK; NAESENS, 2020).

2.5 C4d como biomarcador de RMA

O marcador C4d é tipicamente utilizado para estabelecer uma relação patogênica entre a presença de DSAs circulantes e a injúria ao enxerto, por meio da ativação da via clássica do complemento (BATAL; GIRNITA; ZEEVI; SAAB *et al.*, 2008). Trata-se de um marcador acessível, com técnicas padronizadas para sua avaliação e com um baixo índice de falsos-positivos (COHEN; COLVIN; DAHA; DRACHENBERG *et al.*, 2012). Este biomarcador mostra associação com alterações na função do enxerto renal e pode contribuir para definição prognóstica em casos com outras características associadas a RMA (KIKIĆ; KAINZ; KOZAKOWSKI; OBERBAUER *et al.*, 2015). Para amostras de material em parafina, Para amostras em parafina e técnica por IHQ, qualquer marcação de C4d em capilares peritubulares é considerada positiva (C4d1, C4d2 e C4d3), enquanto na IF devem ser consideradas positivas apenas as amostras com marcação em mais de 10% dos capilares (C4d2 e C4d3) (HAYDE; BAO; PULLMAN; YE; CALDER; CHUNG; SCHWARTZ; ALANSARI *et al.*, 2013).

Porém, deve-se ressaltar a ocorrência de positividade difusa para C4d em enxertos com incompatibilidade ABO (cerca de 80% dos casos), a qual não possui associação como episódios de RMA (HAYDE; BAO; PULLMAN; YE; CALDER; CHUNG; SCHWARTZ; ALANSARI *et al.*, 2013), bem como a possibilidade de ativação local do complemento não relacionada a anticorpos anti-HLA. O significado da positividade para C4d sem evidências de rejeição ainda é incerto. Contudo, as atualizações mais recentes da classificação de Banff sugerem que a expressão aumentada de ENDATs pode ser utilizada para selecionar casos com maior risco de desenvolver RMA. Pacientes com positividade para C4d isoladamente e expressão aumentada de ENDATs apresentam risco aumentado de desenvolver AMR

posteriormente, devendo ser considerada a possibilidade de tratamento precoce deste quadro (MUELLER; EINECKE; REEVE; SIS *et al.*, 2007).

Como limitações, deve-se considerar o fato de a positividade para C4d não ser bom preditor de perda do enxerto, a subjetividade e variação interobservadores na análise deste marcador, bem como uma menor sensibilidade para RMA crônica (SAPIR-PICHHADZE; CURRAN; JOHN; TRICCO *et al.*, 2015). Além disso, a presença de casos de RMA C4d negativos, corroborados por estudos de biologia molecular, demonstram a existência de outros mecanismos de lesão endotelial não relacionados ao complemento, como anticorpos não anti-HLA, ativação de células NK e toxicidade direta mediada por imunoglobulinas (KIKIĆ; KAINZ; KOZAKOWSKI; OBERBAUER *et al.*, 2015).

2.6 Marcadores moleculares e o papel do endotélio

Assim como em outras áreas da Medicina, o transplante renal tem se beneficiado de consensos que permitiram a definição diagnóstica com base na avaliação histopatológica. Entretanto, reconhece-se que tais protocolos e parâmetros apresentam limitações em relação a aspectos como critérios morfológicos, variações interobservadores e associação com prognóstico dos pacientes e seus enxertos (HALLORAN; FAMULSKI; REEVE, 2016).

Rins transplantados são atualmente monitorizados por meio de marcadores clínicos, radiológicos e patológicos. De uma forma geral, estes marcadores tradicionais apresentam várias limitações, não só relacionadas às próprias doenças como também a variações de interpretação entre nefrologistas e patologistas. Até mesmo o exame histológico, que persiste como padrão-ouro, encontra limitações, como baixa sensibilidade (dificuldade em diagnosticar rejeição crônica), baixa especificidade devido à heterogeneidade de processos com um mesmo padrão de lesão morfológica, como em casos de fibrose intersticial, falta de padronização em critérios diagnósticos e problemas relacionados à amostragem. Desta forma, outros marcadores, como assinaturas de expressão gênica, são úteis para expandir as informações proporcionadas pelo exame histológico tradicional (HALLORAN; VENNERS; MADILL-THOMSEN; EINECKE *et al.*, 2018).

A complexidade da fisiopatologia da RMA e as limitações do exame histológico padrão levaram ao desenvolvimento de novas abordagens para o aprimoramento da avaliação destes casos. Estudos por microarranjos de DNA demonstraram que a expressão aumentada de determinados conjuntos de genes está diretamente relacionada à lesão do enxerto. Bibliotecas genômicas foram inicialmente desenvolvidas e aprimoradas por mapeamentos realizados na Universidade de Alberta, Canadá (http://transplants.med.ualberta.ca/Nephlab/data/gene_lists.html).

A pesquisa de marcadores moleculares baseia-se no rastreamento de mudanças na expressão de moléculas de RNAm que estão associadas a rejeição. A expressão aumentada ou diminuída destes produtos, avaliadas por técnicas como microarranjos de DNA, podem indicar alterações de transcrição em células do parênquima renal, como, por exemplo, células endoteliais, ou em células inflamatórias, como macrófagos e células NK. Produtos de transcrição relacionados a rejeição foram demonstrados também em modelos animais (FAMULSKI; EINECKE; REEVE; RAMASSAR *et al.*, 2006).

Dentre os principais grupos de genes identificados, podemos citar: produtos de transcrição específicos relacionados a rejeição, produtos de transcrição de injúria/reparo, produtos de transcrição associados a células T citotóxicas, produtos de transcrição associados a macrófagos, associados a células B e células NK, e os ENDATs. Aqueles associados a células NK e células endoteliais apresentam-se fortemente relacionados a episódios de RMA. A avaliação da expressão gênica no enxerto foi introduzida na classificação Banff de 2013, com o intuito de desenvolver e validar testes moleculares para o diagnóstico (HAAS; SIS; RACUSEN; SOLEZ *et al.*, 2014; LOUPY; LEFAUCHEUR, 2018).

O endotélio de capilares glomerulares e peritubulares apresenta-se classicamente reconhecido como uma 'vítima' em casos de RMA. Tumeção endotelial, duplicações de membrana basal e multilaminação da membrana basal de capilares peritubulares estão fortemente associados com a gravidade da RMA e o risco de perda do enxerto. Todavia, recentemente tem sido levantada a possibilidade de envolvimento ativo das células endoteliais na fisiopatologia da rejeição. Com a consequente estimulação desencadeada por DSAs, a célula endotelial torna-se atipicamente ativada e com imunogenicidade alterada. Além disso, deve ser considerada a possibilidade de a ativação endotelial preceder o diagnóstico clínico de

RMA. Esta ativação pode ser induzida tanto por meio do complemento como por mecanismos não relacionados a esta via (SIS, 2012).

Com a ativação do endotélio, há um aumento da produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios (IL-1, IL6, P-selectina) e pró-trombóticos, como o fator de von Willebrand (Vwf). Além disso, células endoteliais ativadas têm capacidade de interagir com células NK, as quais produzem mediadores como IFN-gama, que tem o potencial de aumentar a expressão de antígenos HLA e, conseqüentemente, amplificam a resposta de ativação da célula endotelial. Deve ainda ser considerada a interação entre células endoteliais e histiócitos, que possuem papel importante como mediadores de lesão celular no ambiente microvascular (CROSS; GLOTZ; MOONEY, 2018; HIDALGO; SELLARES; SIS; MENGEL *et al.*, 2012).

O estresse de células endoteliais, mensurado por estudos moleculares e em conjunto com a pesquisa de aloanticorpos, contribui para o diagnóstico da RMA e predição de perda do enxerto. Contudo, deve-se frisar que a pesquisa de ENDATs não está associada a dano ao enxerto ou desfechos mais graves em pacientes sem evidência de DSAs, uma vez a expressão aumentada de ENDATs pode ocorrer em outras condições. Assim, estes marcadores possuem maior acurácia em pacientes com anticorpos anti-HLA (HALLORAN; FAMULSKI; REEVE, 2016), mostram boa correlação com lesões histológicas e apresentam maior expressão em casos clássicos de rejeição. Além disso, esta avaliação não mostra a subjetividade e a variação interobservadores inerentes ao exame anatomopatológico. Aqueles mais associados a RMA são os que possuem expressão aumentada em células endoteliais da microvasculatura, como *CDH15*, *CDH13*, *COL13A1*, *DARC*, *ECSGR*, *GNG11*, *ICAM2*, *MALL*, *PECAM1*, *PGM5*, *RAMP3*, *RAPGEF5*, *ROBO4*, *TM4SF18* (SIS, 2012).

Comparado ao marcador C4d, evidências apontam que a expressão aumentada de ENDATs tem maior sensibilidade (77% vs. 31%) e menor especificidade (71% vs 94%) (SIS; JHANGRI; BUNNAG; ALLANACH *et al.*, 2009). Além disso, análises transcricionais recentes mostraram ainda que produtos de transcrição associados a células NK e suas vias estavam aumentados em casos de RMA crônica. Estes mecanismos independentes do complemento podem estar

significativamente associados a sobrevida do enxerto, mesmo sem positividade para C4d em células endoteliais (HIDALGO; SELLARES; SIS; MENGEL *et al.*, 2012).

2.7 T-caderina

As caderinas são proteínas fundamentais envolvidas da regulação dinâmica do contato e adesão entre as células em diversos processos morfogênicos. São glicoproteínas transmembrana e representam uma superfamília, com mais de 100 subtipos descritos em vertebrados. A T-caderina (Cad), produzida a partir da transcrição do gene *CDH13*, é expressa em células musculares lisas da parede de vasos, bem como em células endoteliais. Sua estrutura encontra-se ilustrada na figura 3. A expressão aumentada desta proteína *in vitro* induz proliferação e aumento da motilidade de células endoteliais, protegendo-as contra a apoptose mediada por estresse oxidativo. Deste modo, Cad pode ser considerada um marcador de ativação da célula endotelial, além de favorecer a transmigração de células inflamatórias (HERMANT; BIBERT; CONCORD; DUBLET *et al.*, 2003). Este marcador está relacionado mais comumente à patogênese de doenças cardiovasculares, onde a expressão aberrante desta proteína mostra associação com cardiomiopatias, doença aterosclerótica e re-estenoses de *stents* (RESINK; PHILIPPOVA; JOSHI; KYRIAKAKIS *et al.*, 2009). Além disso, possui fundamental papel no controle e amplificação da angiogênese (HEBBARD; GARLATTI; YOUNG; CARDIFF *et al.*, 2008).

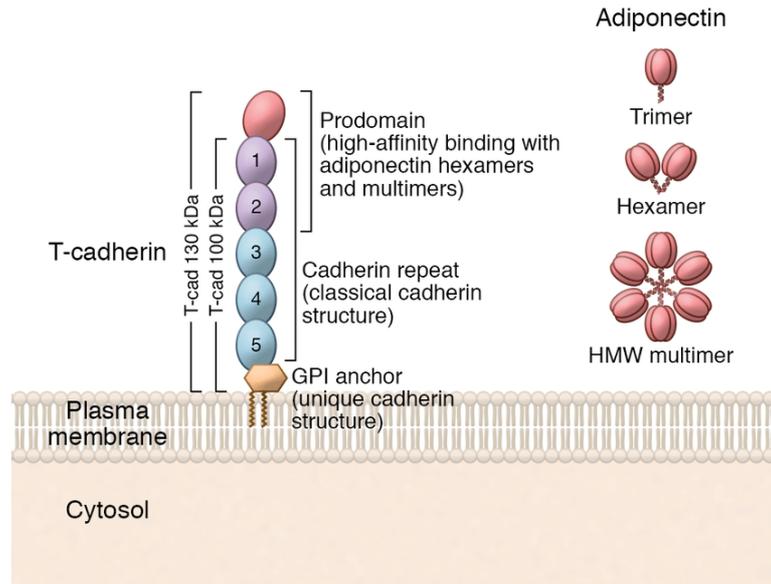


Figura 3: Conformação estrutural de T-Caderina. A T-caderina encontra-se ancorada à membrana plasmática por meio do domínio GPI (específico para este subtipo). Além disso, possui em uma de suas extremidades um complexo com alta afinidade de ligação para adiponectina, mediando importantes processos relacionados a eventos cardiovasculares. A porção intermediária apresenta semelhante estrutural com outras caderinas.

Fonte: Kita, S. *Journal of Clinical Investigation*, 2019 (KITA; MAEDA; SHIMOMURA, 2019).

2.8 Caveolina-1

Uma sinalização efetiva através da membrana plasmática é facilitada pela presença de domínios como as cavéolas, invaginações com medida entre 50 e 100nm e particularmente abundantes em células endoteliais, adipócitos, fibroblastos e pneumócitos. Nestas estruturas, localizam-se complexos proteicos denominados caveolinas, dentre as quais se destaca a caveolina-1 (Cav), que está envolvida em processos como transcitose molecular, permeabilidade vascular, regulação da óxido-nítrico sintase, angiogênese e regeneração de células endoteliais (CHAND; EDWARDS; CHUE; JESKY *et al.*, 2016; FRANK; WOODMAN; PARK; LISANTI, 2003). A figura 4 mostra as principais estruturas que compõem as cavéolas. A expressão aumentada de Cav em células endoteliais não indica necessariamente um papel lesivo deste mediador, mas uma consequência de lesão endotelial progressiva que leva a ativação de mecanismos de angiogênese e regeneração destas células (NAKADA;

YAMAMOTO; HORITA; KOBAYASHI *et al.*, 2016; SHIHATA; MICHELL; ANDREWS; CHIN-DUSTING, 2016)

Além disso, uma particular atenção tem sido dada a este marcador devido a seu papel com mediador da ativação do fator de crescimento TGF- β , envolvido na fibrogênese do enxerto. Determinados polimorfismos do gene *CAV-1* (rs4730751 SNP), como o genótipo AA, que está presente em cerca de 10% dos receptores, podem estar associados a progressão acelerada da fibrose do enxerto (MOORE; MCKNIGHT; SIMMONDS; COURTNEY *et al.*, 2010). Nakada *et al.*, 2016, demonstraram que a positividade aumentada para Cav em capilares peritubulares possui associação com glomerulopatia do transplante e fibrose. Além disso, casos com maior expressão de Cav foram associados a menor sobrevida do enxerto neste estudo (YAMAMOTO; HORITA; TAKAHASHI; KOBAYASHI *et al.*, 2008).

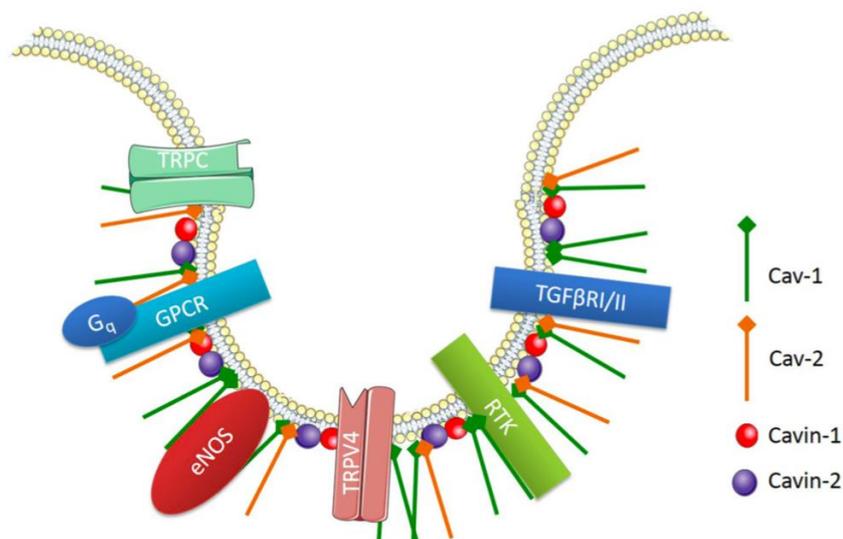


Figura 4: Estruturas envolvidas na formação das Cavéolas. Os constituintes das caveólas participam na mediação de processos como estresse oxidativo (eNOS), ativação de vias de fibrogênese (TGF- β), influxo de Cálcio (TRPC), sobrevivência celular (RTK), ativação de células histiocitárias (TRPV4) e homeostasia celular medida por receptores acoplados à proteína G (GPCR).

Fonte: Shihata WA, *Frontiers in Physiology*, 2016 (SHIHATA; MICHELL; ANDREWS; CHIN-DUSTING, 2016).

2.9 Fator de von Willebrand

O fator de von Willebrand (Vwf) é uma glicoproteína plasmática com estrutura multimérica, seletivamente produzida em megacariócitos e células endoteliais. Multímeros de Vwf são agrupados em estruturas helicoidais e armazenados em corpos de Weibel-Palade em células endoteliais e alfa-grânulos em plaquetas (ALLISON, 2014).

O fator de von Willebrand interage com as plaquetas por meio de dois receptores: glicoproteína Ib-IX-V e integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Em vasos lesados, a interação Vwf-GpIb permite que as plaquetas rolem sobre células endoteliais lesadas e o tecido subendotelial para que seja estabelecida uma interação adesiva primária e instável (Figura 5). Além disso, há a participação indireta de Vwf na cascata da coagulação por meio de sua ligação ao fator VIII. Esta interação protege o fator VIII de clivagem proteolítica, prolongando sua meia-vida e também amplificando sua ação em locais de injúria vascular. Além disso, Vwf é um marcador chave de inflamação vascular, participando em processos como recrutamento de leucócitos e plaquetas. Há o suporte à ativação de múltiplas vias inflamatórias, como o sistema complemento, estando associado a doenças cardiovasculares e suas complicações, lesão de isquemia-reperfusão, dentre outros processos (GRAGNANO; SPERLONGANO; GOLIA; NATALE *et al.*, 2017).

A deposição de Vwf foi ainda demonstrada no mesângio glomerular em várias glomerulonefrites e em pacientes transplantados com disfunção crônica do enxerto (OZDEMIR; SAR; HABERAL, 2006). Este marcador mostrou-se associado a disfunção endotelial e ambiente pró-trombótico, bem como declínio da função renal em pacientes transplantados (ALLISON, 2014; MARTINS; ALVES; CARDOSO; SILVA *et al.*, 2019). Sabe-se ainda que aloanticorpos podem induzir células endoteliais a aumentarem sua produção e liberação (ZBROCH; MAŁYSZKO; KOC-ŻÓRAWSKA; MYŚLIWIEC, 2012).

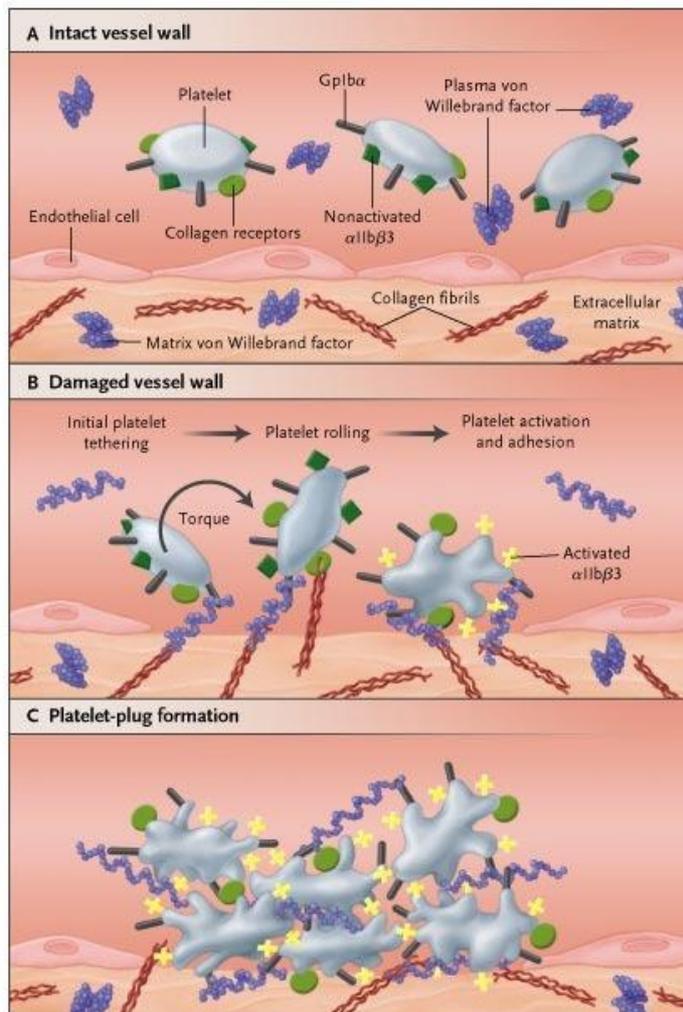


Figura 5: Papel do Fator de von Willebrand no processo de trombogênese.

Legenda: A) Vwf armazenado nas células endoteliais de vasos intactos e circulante no plasma. B) Quando há dano vascular, ocorre a interação entre Vwf-GpIB, promovendo ativação e adesão plaquetária. C) Formação do coágulo.

Fonte: Mannucci P, N Engl J Med, 2004 (MANNUCCI, 2004).

Dado o desafio do diagnóstico das lesões aloimunes, a avaliação de biomarcadores de dano endotelial parece uma ferramenta adicional interessante para compor o arsenal. Entretanto, apenas está validada esta avaliação através de técnicas de biologia molecular, as quais são inacessíveis à maioria dos centros transplantadores do mundo. Assim, o diagnóstico de lesão endotelial por técnica de IHQ pode ajudar a tornar esta informação mais amplamente disponível.

3 PERGUNTAS DE PARTIDA

- Há uma associação entre a expressão IHQ quantitativa dos marcadores Cav, Vwf e Cad e parâmetros laboratoriais e histopatológicos utilizados para o diagnóstico de RMA?
- Existem diferenças na expressão destes marcadores em casos de RMA aguda e crônica?
- A expressão destes marcadores pode ser útil para diferenciar casos de RMA de casos com positividade para C4d sem sinais de rejeição?
- A expressão aumentada destes marcadores em biópsias com FI-AT de etiologia indeterminada pode representar fator de risco para perda do enxerto?

4 HIPÓTESES

- Biópsias de enxerto renal com sinais de lesão microvascular e/ou positividade para C4d apresentam expressão aumentada de Cav, Vwf e Cad em capilares peritubulares e *vasa recta*.
- Pacientes com pesquisa positiva para DSA no momento da biópsia apresentam expressão aumentada de Cav, Vwf e Cad à IHQ.
- Os marcadores selecionados apresentam maiores taxas de positividade em casos de RMA crônica quando comparados ao C4d.
- A expressão dos três marcadores em biópsias com diagnóstico de RMA ~~tende~~ a ser mais difuso do que naqueles com FI-AT e positividade para C4d sem diagnóstico de rejeição.
- Biópsias com diagnóstico de FI-AT de etiologia indeterminada e que apresentam expressão aumentada destes marcadores apresentam risco aumentado de perda do enxerto no período de 36 meses após a realização da biópsia.

5 OBJETIVOS

Geral

- Avaliar a expressão IHQ dos marcadores Caveolina-1, Fator de von Willebrand e T-caderina em biópsias de enxerto renal que se enquadrem nas categorias diagnósticas de Alterações Mediadas por Anticorpos e Fibrose Intersticial/Atrofia Tubular de etiologia indeterminada.

Específicos

- Verificar a associação destes marcadores endoteliais com positividade para DSA, expressão IHQ do biomarcador C4d e presença de lesão microvascular aguda e/ou crônica em biópsias de enxerto renal.

- Comparar a expressão destes marcadores em casos de RMA ativa e crônica, bem como entre casos de RMA, FI-AT a esclarecer e positividade para C4d sem sinais de rejeição.

- Verificar a associação entre a expressão IHQ destes marcadores e o risco aumentado de perda do enxerto.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Tipo de estudo

Esta pesquisa, de caráter observacional, compreende dois estudos com abordagens distintas.

- **Estudo 1:** de caráter transversal, onde todos os casos foram avaliados para a determinação da associação entre a expressão IHQ dos biomarcadores e os parâmetros patológicos e laboratoriais utilizados para o diagnóstico de RMA.
- **Estudo 2:** de coorte retrospectiva, para avaliação dos marcadores supracitados como fatores de risco associados a perda do enxerto em pacientes com FI-AT de etiologia indeterminada.

6.2 Locais do estudo

- Serviço de Transplante Renal, Hospital Geral de Fortaleza (HGF), Fortaleza, Brasil.
- Laboratório de Anatomia Patológica parceiro da instituição, Fortaleza, Brasil.

6.3 Definição da população

Pacientes submetidos a transplante renal em qualquer período e que realizaram biópsias do enxerto por indicação de 2013 a 2017 e que tenham recebidos os diagnósticos de Alterações Mediadas por Anticorpos (AMC) (Banff 2) ou FI-AT de etiologia indeterminada.

6.3.1 Critérios de inclusão

- Estudo 1

a) Pacientes que tiveram o diagnóstico clinicopatológico de uma das seguintes condições: RMA ativa, RMA crônica (ativa ou inativa), positividade para C4d sem sinais de rejeição ou FI-AT de etiologia indeterminada (Apêndice 1).

b) Biópsias com adequada representatividade para estudo anatomopatológico e IHQ, apresentando, no mínimo, 7 glomérulos e 1 artéria de médio calibre para avaliação (SOLEZ; AXELSEN; BENEDIKTSSON; BURDICK *et al.*, 1993).

- Estudo 2

Pacientes que tiveram o diagnóstico clinicopatológico de FI-AT de etiologia indeterminada, conforme os critérios abaixo:

1: Presença de FI-AT na amostra, em qualquer grau. Não foram consideradas para determinação e quantificação de fibrose áreas com amostragem subcapsular, bem como medula renal. Utilizou-se a coloração de Tricrômio de Masson para melhor avaliação desta alteração patológica, a qual é rotineiramente utilizada em biópsias de enxerto renal.

2: Ausência de alterações morfológicas suspeitas para RMA (Apêndice 1) e RMCT (tubulite e inflamação em áreas de fibrose).

3: Ausência de positividade para C4d à IHQ.

4: Ausência de inclusões virais.

5: Ausência de cilindros neutrofílicos ou outras alterações sugestivas de quadro infeccioso bacteriano.

6: Ausência de evidências clínicas que permitam diagnóstico etiológico, tais como episódios prévios de rejeição, altos níveis de medicamentos imunossupressores e fibrose intersticial proveniente do doador.

6.3.2 Critérios de exclusão

Para ambos os estudos, foram excluídos :

- a) Pacientes cujas amostras de material histológico emblocadas em parafina não foram suficientes para realização de estudo IHQ com os marcadores propostos, ou seja, amostras onde não foi possível observar parênquima renal com adequada representatividade (vide critérios de inclusão) após aprofundamento dos blocos.
- b) Amostras de pacientes com artefatos pré-analíticos impeditivos à avaliação qualitativa e quantitativa por meio do método IHQ.
- c) Pacientes cujos dados clínicos e/ou patológicos não puderam ser acessados durante a coleta.

Para o Estudo 2, foram também excluídos os casos em que não foi possível acompanhar a evolução do enxerto no período de 36 meses após a realização da biópsia por perda de seguimento.

Foram considerados todos os pacientes que fizeram biópsia no referido período e que se enquadraram nos critérios supracitados. A definição do intervalo de tempo (2013 a 2017) compreende o período de contrato entre o H. Geral de Fortaleza e o laboratório de Patologia para biópsias oriundas do setor de transplantes.

6.4 Aspectos éticos

O estudo atendeu aos critérios estabelecidos pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral de Fortaleza (CAEE número 77473417.0.0000.5040; parecer consubstanciado número 2.335.513). A consulta aos prontuários apenas foi iniciada após as aprovações regulatórias e éticas devidas e foi garantida a integridade dos documentos.

6.5 Coleta de dados

O levantamento dos diagnósticos clinicopatológicos foi realizado por meio da revisão dos laudos anatomopatológicos arquivados na base de dados do laboratório de Patologia prestador de serviços ao HGF. Deste modo, todos os laudos emitidos entre 2013 e 2017 foram levantados e revisados pelo pesquisador principal, que selecionou aqueles que se enquadravam nos critérios de inclusão.

Os dados clínicos e laboratoriais referentes a estas biópsias foram coletados por meio da revisão de prontuários arquivados no setor de Transplante Renal do HGF, bem como pela checagem dos resultados de exames laboratoriais nas bases de dados digitais do serviço.

Todos os laudos de microscopia óptica emitidos no período do estudo foram analisados pelo mesmo patologista renal (A.C.T.) Este profissional foi o responsável pelo levantamento dos casos e integração de suas informações com os parâmetros clínico-laboratoriais obtidos por meio da coleta de dados. Casos previamente laudados como suspeitos para RMA, sem informações clínicas e laboratoriais disponibilizadas no momento da biópsia foram reanalisados e correlacionados com as informações coletadas para melhor definição diagnóstica. Todos os casos selecionados foram reclassificados segundo o consenso Banff atualizado (LOUPY; HAAS; ROUFOSSE; NAESENS *et al.*, 2020). Quanto ao C4d, foram considerados os laudos previamente emitidos.

6.6 Variáveis analisadas

6.6.1 Estudos 1 e 2

- **Características clínicas e laboratoriais do doador:** tipo de doador, idade do doador, *causa mortis*, Creatinina (Cr) final (doador falecido).

- **Características demográficas do receptor:** sexo, idade, peso, altura, Índice de Massa Corpórea (IMC), etiologia da doença renal crônica, tempo em diálise, retransplante.
- **Imunologia:** número de incompatibilidades HLA entre doador e receptor, Painel de Reatividade de Anticorpos (PRA I e PRA II) e presença de DSA no momento da biópsia. Os DSA avaliados não foram individualizados quando ao subtipo e ao tempo de surgimento (pré-transplante ou *de novo*).
- **Dados clínicos relacionados ao transplante:** terapia de indução com globulina antitimócito (ATG), imunossupressão inicial, uso de corticoide no regime de manutenção.
- **Dados clínicos no momento da biópsia:** motivo da biópsia, taxa de filtração glomerular estimada (eTFG), presença de proteinúria, imunossupressão, tempo de transplante.
- **Análise histopatológica:** número de glomérulos, número de vasos, glomerulite (g), glomerulopatia do transplante (cg), aumento de matriz mesangial (mm), fibrose intersticial (ci), atrofia tubular (ct), inflamação intersticial (i), tubulite (t), inflamação em áreas de fibrose (i-ifta), total de inflamação cortical (ti), arterite (v), espessamento da íntima de artérias (cv), pericapilarite (ptc), hialinose arteriolar nodular (aah), hialinose arteriolar não nodular, IF.
- **Imuno-histoquímica:** marcação para C4d (escore, porcentagem de capilares peritubulares), pesquisa do antígeno SV40 (quando disponível, ou seja, desde que realizado no momento da biópsia).

6.6.2 Dados específicos do Estudo 2

- Tempo de seguimento, eTFG em 12, 24 e 36 meses após a realização da biópsia, perda do enxerto, óbito, causa da perda ou óbito.

6.7 Definições

- **Imunossupressão:** o regime imunossupressor padrão do Hospital Geral de Fortaleza consiste em indução com ATG e manutenção com tacrolimo e um inibidor da mTOR, sem esteroide. O micofenolato é reservado para pacientes com contraindicações aos mTORi, como doença renal crônica por glomeruloesclerose segmentar e focal ou dislipidemia severa. Também é utilizado para pacientes que necessitaram descontinuar o mTORi por falha de eficácia ou segurança. Os regimes com esteroides ficam reservados para os pacientes considerados de alto risco imunológico e aqueles cuja doença de base requer o tratamento com esteroides.

- **DSA:** para a definição da positividade para DSA, foi considerado o resultado do ensaio imunológico mais próximo à data de coleta da biópsia, com limite de 6 meses antes ou depois deste procedimento. Os resultados foram baseados no ensaio Single Bead Antigen (Labscreen Singles Antigen; One Lambda). Considerou-se como DSA positivo aqueles com resultado de MIF > 1500 (SÜSAL; ROELEN; FISCHER; CAMPOS *et al.*, 2013).

- **Proteinúria:** para pacientes com proteinúria 24h ou relação proteína/creatinina disponíveis, consideramos proteinúria a presença de valores maiores que 150g/24h ou 150g/g, respectivamente. Para pacientes sem estes testes, consideramos qualquer presença de cruzeiros (+) no sumário de urina.

- **eTFG:** determinada por meio da fórmula CKD-EPI (<https://www.mdcalc.com/ckd-epi-equations-glomerular-filtration-rate-gfr>) de acordo com o valor da Cr nos intervalos pré-determinados (momento da biópsia, 12 meses, 24 meses e 36 meses após a coleta). A fórmula de Schwartz foi utilizada para pacientes pediátricos. Para pacientes que perderam o enxerto antes do término de seguimento proposto pelo estudo, foi atribuído o valor zero às medidas seguintes à perda. Para os pacientes que faleceram, atribuímos às medidas seguintes o último valor disponível (abordagem *Last Observation Carried Forward*, LOCF).

- **Perda do enxerto:** definida como retorno definitivo do paciente à diálise ou a realização de retransplante.

- **Parâmetros para diagnóstico de RMA, FI-AT e positividade para C4d:** utilizaram-se os critérios propostos e atualizados no último consenso Banff, realizado no ano de 2020 (Apêndice 1).

6.8 Estudo imuno-histoquímico

6.8.1 Seleção dos marcadores de lesão endotelial

A seleção dos marcadores de lesão endotelial Cav, Vwf e Cad foi baseada na base de dados *Human Protein Atlas* (www.proteinatlas.org). Tal base de dados proporciona aos pesquisadores uma visão geral da aplicabilidade de biomarcadores para testes bioquímicos, avaliação histopatológica e exames de biologia molecular.

Com base nos estudos que validaram os marcadores de ativação da célula endotelial, foram avaliados aqueles que apresentavam baixos índices de marcação em amostras histológicas normais do parênquima renal. Além disso, priorizou-se biomarcadores já avaliados em outros estudos por meio de IHQ, em especial em amostras de órgãos transplantados ou em outras condições que comprometem a microvasculatura (COLLOT-TEIXEIRA; MCGREGOR; MORSE; CHALABREYSSE *et al.*, 2010; NAKADA; YAMAMOTO; HORITA; KOBAYASHI *et al.*, 2016; OZDEMIR; SAR; HABERAL, 2006; YAMAMOTO; HORITA; TAKAHASHI; KOBAYASHI *et al.*, 2008).

Foram utilizados como controles para as reações amostras de pulmão (Cav), placenta (Vwf) e glomérulos normais em amostras de nefrectomia por tumores renais (T-Caderina).

6.8.2 Descrição da técnica

Os blocos de parafina contendo as amostras biopsiadas e previamente selecionadas foram solicitados ao arquivo do laboratório de Patologia que mantinha convênio com o HGF durante o período selecionado nos critérios de inclusão.

- **Cortes dos blocos de parafina:** para a utilização do anticorpo, realizaram-se cortes dos tecidos previamente fixados em formol e impregnados em parafina. As amostras de tecido foram cortadas no micrótomo em secções de 3µm e acondicionadas em lâminas silanizadas.

- **Secagem e fixação do tecido à lâmina,** sendo esta etapa realizada em estufa por 10 minutos a uma temperatura de 60°C.

- **Colocação das lâminas na máquina BenchMarck GX da Ventana®,** onde todas as reações foram realizadas (Figura 6).



Figura 6 Máquina BenchMarck Gx Ventana®.

Fonte: autor.

- **Desparafinização dos cortes**, utilizando a solução *EZ PREP Concentrate* (10x).
- **Recuperação antigênica**: realizada em solução *Cell Conditioning Solution (CC1)* em pH de 8,4, por 30min, a uma temperatura de 95°C. Esta etapa permite uma melhor interação entre os anticorpos que serão adicionados e os epítomos dos antígenos-alvo.
- **Bloqueio da peroxidase**: realizado para evitar ação da peroxidase endógena, a qual pode reagir com o composto diaminobenzidina (DAB), utilizado nas etapas seguintes do processo e essencial para revelar a interação antígeno-anticorpo. Utilizou-se a solução *View Universal DAB Inhibitor*.
- **Colocados os anticorpos primários**, conforme as seguintes diluições:
 - **Vwf** (DAKO®, USA): policlonal, Titulação de 1:100.
 - **Cav1** (Cell Marque®, USA): clone 2297, Titulação 1:100.
 - **Cad** (Abcam® USA): clone EPR9621, Titulação: 1:1000.

Todos os anticorpos foram validados por meio da avaliação de controles positivos e negativos. Utilizaram-se ainda controles internos (positividade em glomérulo e parede de vasos de médio calibre).

- **Adição do anticorpo secundário**: realizado por meio da adição do composto *Ventana Universal HRP Multimer*. O anticorpo secundário associado a enzima liga-se aos complexos antígeno-anticorpo previamente formados, havendo assim uma amplificação da reação.
- **Adição da diaminobenzidina cromógeno** (*View Universal DAB Chromogen*) e **diluidor** (H₂O₂), onde as áreas de ligação antígeno-anticorpo passam a apresentar

coloração acastanhada ao exame de microscopia óptica. A intensificação desta coloração é realizada por meio adição do reagente *Cooper*.

- **Contracoloração com Hematoxilina** e utilização do reagente *Bluing* para melhor contraste com a marcação positiva evidenciada na etapa anterior.

- **Passagem das lâminas em álcool absoluto.**

- **Secagem de montagem das lâminas.**

6.8.3 Critérios de avaliação

Os três marcadores foram avaliados conforme a sua expressão qualitativa e quantitativa em capilares medulares e *vasa recta*, seguindo os mesmos critérios utilizados para definir a marcação para C4d, ou seja, positividade em células endoteliais, forte, linear e contínua (ROUFOSSE; SIMMONDS; CLAHSN-VAN GRONINGEN; HAAS *et al.*, 2018). Não foram considerados positivos aqueles casos com marcação em parede de artérias ou arteríolas, bem como os que apresentaram marcação em conteúdo intravascular (plasma).

Considerou-se como caso positivo todo aquele no qual havia ao menos um capilar peritubular positivo para o biomarcador. Para avaliação quantitativa, realizou-se a análise de 10 campos microscópicos aleatórios de córtex e medula em grande aumento. Contaram-se o número de capilares peritubulares e *vasa recta* positivos nestes campos e o número total de capilares peritubulares evidenciados, para que assim fosse determinado o percentual de vasos com positividade para os marcadores testados. Não foi avaliada marcação em outros compartimentos, como túbulos, interstício e glomérulos.

6.9 Análise estatística

As variáveis categóricas foram expressas como frequências e percentuais e comparadas utilizando o teste de Qui-Quadrado ou Fisher, a depender do número de observações na tabela de contingência 2x2.

As variáveis numéricas foram expressas como médias \pm desvio padrão, para dados com distribuição normal, e mediana (intervalo interquartil/ IQR), para dados não paramétricos. A análise da distribuição das variáveis numéricas foi feita utilizando os testes Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Utilizaram-se os Testes T de Student e o Teste de Mann-Whitney, conforme a distribuição das variáveis. Para análises envolvendo mais de dois subgrupos, utilizaram-se o teste de ANOVA para dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis para os não paramétricos. Adotou-se o valor de p inferior a 0,05 como nível de significância.

Cada biópsia foi considerada como um caso para análise. Empregou-se o modelo de *Area Under the Curve (AUC) Receiver Operating Characteristics (ROC)* para a determinação da acurácia dos três marcadores estudados para predição de perda de enxerto. A hipótese nula foi de que o valor de AUC-ROC, quando inferior ou igual a 0,5, correspondia a um teste aleatório, sem poder discriminante. Deste modo, foram selecionados os marcadores que apresentaram valores de AUC superiores a 0,5 e determinados os valores de marcação percentual em capilares peritubulares que apresentavam melhores índices de sensibilidade e especificidade, para posterior análise de curvas de Kaplan-Meier e teste de Log-rank.

Para avaliação da evolução da TFG após a coleta da biópsia, utilizou-se a análise por meio de Modelos Lineares Generalizados para medidas repetidas.

As análises uni e multivariadas para risco de perda do enxerto em 36 meses foram realizadas por meio de regressão de Cox. Foram selecionadas para análise multivariada todas as variáveis com valores de p inferiores a 0,15. Foram excluídas as variáveis colineares. No modelo multivariado, utilizamos o método *stepwise* e foram consideradas significantes as variáveis cujo valor de p foi inferior a 0,05.

As seguintes variáveis foram avaliadas: idade do doador, sexo do receptor, idade, etnia, etiologia da doença renal crônica, tempo em diálise, retransplante, PRA I, PRA II, DSA, *mismatches*, indução com ATG, TFG no momento da biópsia, concentração sanguínea de tacrolimo, concentração sanguínea de mTORi, proteinúria, grau de Fibrose Intersticial e marcação de Cav, Vwf e Cad à IHQ.

As seguintes variáveis não foram incluídas no modelo multivariado:

- Tempo de transplante: devido à sua óbvia associação com risco aumentado de perda.
- Tipo de doador: apresenta colinearidade com tempo de transplante, isto é, transplantes de doadores vivos apresentaram tempos de transplante significativamente maiores. Isso ocorre porque o número de transplante com doador vivo no serviço (bem como em todos o país) reduziu significativamente nos últimos anos.
- Imunossupressão: devido ao fato de pacientes com maior risco de perda já fazerem uso de esquemas específicos, com maior frequência de utilização de micofenolato de mofetila ou sódico (pacientes com contraindicação aos mTORi ou convertidos por falha de eficácia ou segurança).

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de software IBM SPSS Statistics (26.0), enquanto os gráficos foram elaborados no software GraphPad Prism 8.0.

7 RESULTADOS

Entre os anos de 2013 e 2017, foram encaminhadas 532 biópsias de enxertos renais ao laboratório de Patologia que mantinha convênio com o HGF. Destas, 135 (25,4%) enquadravam-se na categoria Banff 2/AMC. Deste total, 21 casos (15,6%) foram excluídos devido a registros clínicos incompletos e/ou material inadequado para IHQ, restando 114 amostras. 74 biópsias (13,9%) foram diagnosticadas como FI-AT de etiologia indeterminada, sendo que 2 delas (2,7%) não apresentavam material adequado para IHQ e 1 (1,4%) não foi incluída na coorte retrospectiva pelo fato de seu prontuário não ter sido localizado. Deste modo, 186 amostras foram incluídas para a análise transversal do estudo (Estudo 1) e 71 para as análises de desfecho (Estudo 2) (Figura 7).

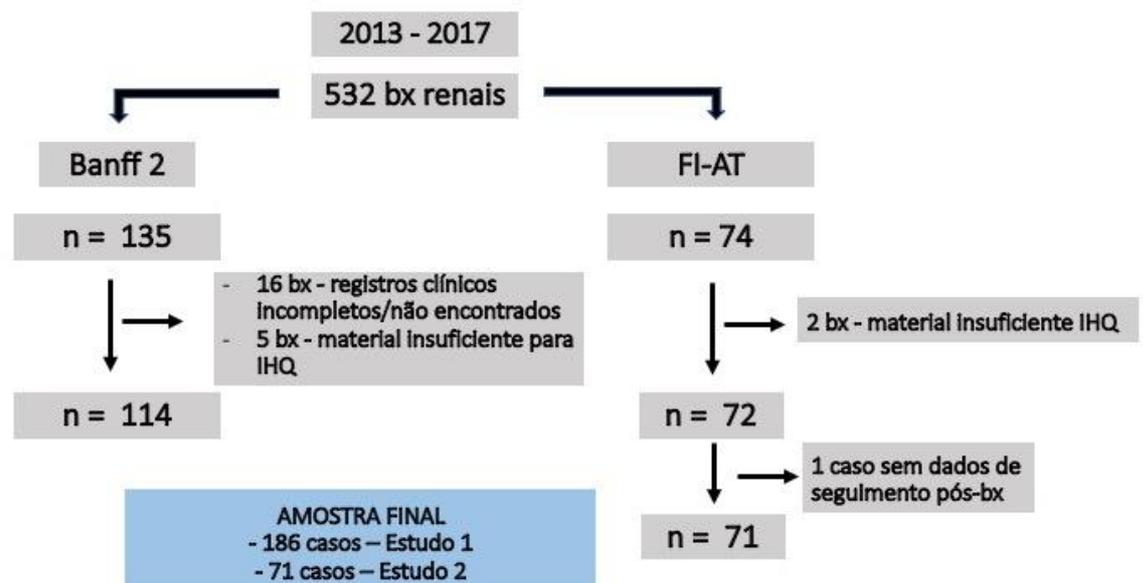


Figura 7. Definição da amostra de acordo com critérios de inclusão e exclusão

7.1. Estudo 1

Do total de biópsias 186 selecionadas, 162 (87,1%) foram coletadas por uma causa específica, enquanto 24 (12,9%) foram realizadas em um contexto de função

tardia do enxerto (biópsia de vigilância). Casos com AMC (n = 114) corresponderam a 61,3% da amostra, enquanto amostras com FI-AT (n = 72) corresponderam a 38,7%. 186 biópsias foram obtidas de 179 pacientes. Estes receptores de transplante renal eram predominantemente do sexo masculino (97, 54,2%), pardos (135, 75,4%) com idade média de 39,6 ± 15,7 anos (variando de 4 a 76 anos). A mediana do tempo de transplante até a data de realização da biópsia foi de 401,5 dias (IQR = 1622,0), enquanto a mediana de TFG foi de 31,3 ml/min/1,73m² (IQR = 33,9). DSA foi detectado em 62 (33,3%) casos. Oitenta e duas (44,1%) amostras foram diagnosticadas como RMA, sendo 44 (53,7%) casos de RMA ativa, 34 (47,5%) de RMA crônica ativa e 4 (4,9%) de RMA aguda mista (alterações sobrepostas com RMCT). Trinta e dois casos (17,2%) foram diagnosticados como positividade para C4d sem sinais de rejeição (Tabela 1).

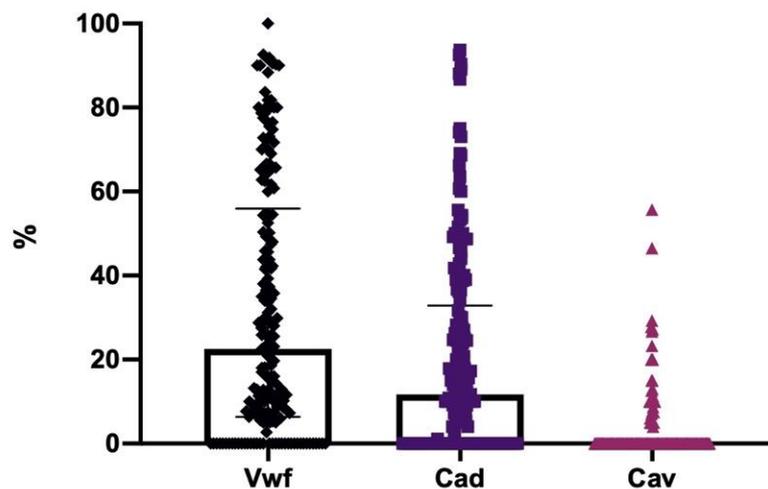
Tabela 1. Características demográficas dos receptores e principais achados patológicos.

Demografia	n = 179
Sexo masculino, n(%)	97 (54,2)
Raça, n(%)	
<i>Branco</i>	19 (10,6)
<i>Negro</i>	17 (9,5)
<i>Pardo</i>	135 (75,4)
<i>Não informada</i>	8 (4,5)
Idade (anos), média ± DP	39,6 ± 15,7
Etiologia DRC, n(%)	
<i>Doença hipertensiva</i>	20 (11,2)
<i>Diabetes Mellitus</i>	11 (6,1)
<i>Glomerulonefrites</i>	46 (25,7)
<i>Outras</i>	36 (20,1)
<i>Desconhecida/Indeterminada</i>	66 (36,9)
Tempo em diálise (meses), mediana (IQR)	27.5 (38,0)
Retransplante, n(%)	29 (16,2%)
Doador	

<i>Falecido</i>	143 (79,9)
<i>Vivo relacionado</i>	29 (16,2)
<i>Vivo não relacionado</i>	7 (3,9)
<i>Mismatches HLA, média ± DP</i>	3,6 ± 1,4
<i>Cr final (mg/dl), média ± DP</i>	1,5 ± 1,1
<i>Indução com ATG, N(%)</i>	137 (76,5)
Dados clínicos no momento da biópsia	n = 186
<i>PRA I (%), mediana (IQR)</i>	0,0 (39,2)
<i>PRA II (%), mediana (IQR)</i>	0,0 (1,7)
<i>DSA, n(%)</i>	62 (33,3)
<i>Tempo de transplante (dias), mediana (IQR)</i>	401,5 (1622,3)
<i>eTFG (ml/min/1,73m²), mediana (IQR)</i>	31,3 (33,9)
<i>Terapia imunossupressora (no momento da biópsia), n(%)</i>	
<i>TAC/mTORi</i>	99 (53,2)
<i>TAC/MPA</i>	57 (30,7)
<i>TAC/mTORi/MPA</i>	14 (7,5)
<i>Outros</i>	10 (5,3)
<i>Não informada</i>	6 (3,3)
Histopatologia	n = 186
<i>Número de glomérulos, mediana (IQR)</i>	12.0 (10,0)
<i>Número de vasos, mediana (IQR)</i>	1.0 (2,0)
<i>Diagnóstico final, n(%)</i>	
<i>FI-AT de etiologia indeterminada</i>	72 (38,7)
<i>Positividade para C4d sem rejeição</i>	32 (17,2)
<i>RMA ativa</i>	44 (23,7)
<i>Rejeição mista (RMA e RMCT)</i>	4 (2,2)
<i>RMA crônica ativa</i>	34 (18,3)

Cr: Creatinina; DRC: doença renal crônica, HLA: antígeno leucocitário humano, PRA: painel de reatividade de anticorpos, DSA: anticorpo específico anti-HLA do doador, eTFG: taxa de filtração glomerular, TAC: Tacrolimo, mTORi: inibidor da via mTOR; MPA: micofenolato de mofetila ou sódico, FI-AT: fibrose intersticial e atrofia tubular, RMA: rejeição mediada por anticorpos, RMCT: rejeição mediada por células T; ATG: globulina antitimócito

A expressão IHQ de Cav foi observada em 35 amostras (18,8%) (mediana = 0,0%, IQR = 0,0%). 149 casos (80,1%) apresentaram positividade para Vwf (mediana = 22,5%, IQR = 49,6%) e 127 (68,3%) mostraram positividade para Cad (mediana = 11,7%, IQR = 32,9%) (Figura 8). Houve maior percentual de casos positivos para Cav (24,6% vs. 8,3%, $p = 0,006$), Vwf (88,6% vs. 66,7%, $p = 0,001$) e Cad (79,0% x 51,4%, $p < 0,001$) nas biópsias com AMC.



Vwf: fator de Von Willebrand, Cad: T-Caderina, Cav: Caveolina-1.

Figura 8. Distribuição dos casos conforme percentual de capilares peritubulares e *vasa recta* com marcação para Fator de Von Willebrand, T-Caderina e Caveolina-1.

A mediana de capilares peritubulares positivos para Vwf foi significativamente maior em amostras com escore MVI >1 quando comparado com o grupo MVI = 0 (61,7% vs. 12,5%, $p < 0,001$) (Figura 9). O mesmo foi observado para Cad (20,0% vs. 10,6%, $p = 0,013$) (Figura 10) e Cav (0,0% vs. 0,0%, $p = 0,024$) (Figura 11).

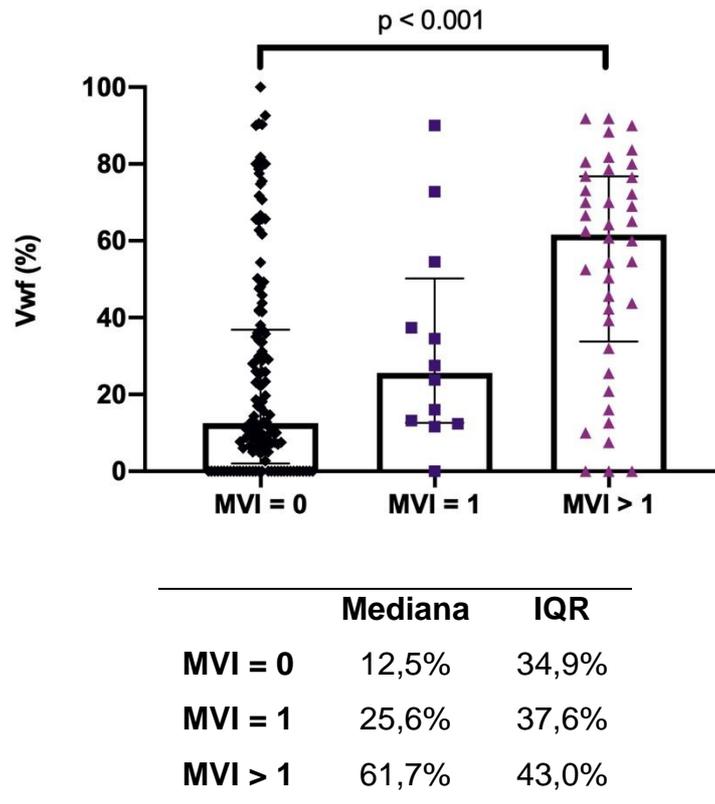
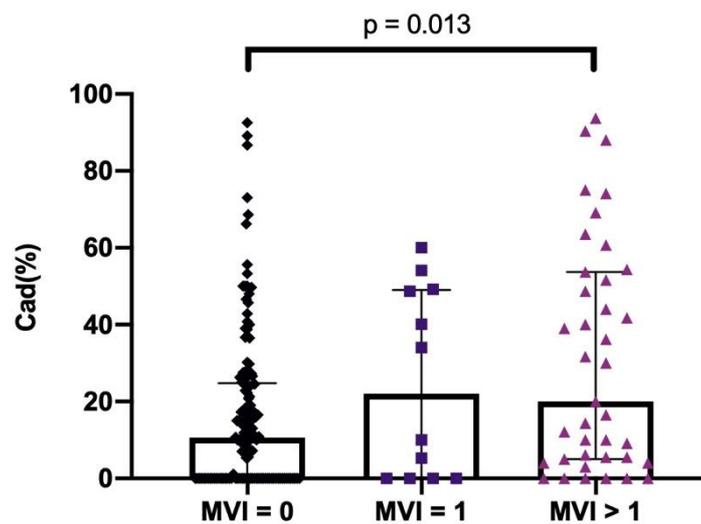


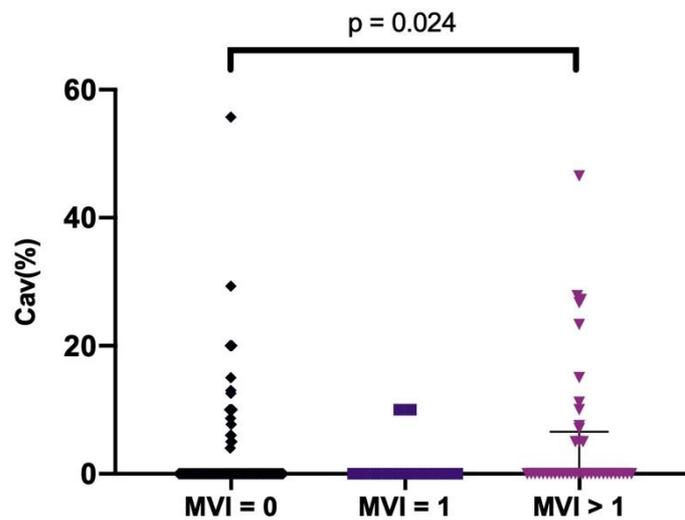
Figura 9. Distribuição dos casos conforme MVI e positividade em capilares peritubulares e *vasa recta* para Fator de Von Willebrand.



	Mediana	IQR
MVI = 0	10,6%	24,8%
MVI = 1	22,0%	49,1%
MVI > 1	20,0%	48,7%

Cad: T-Caderina, MVI: escore de injúria microvascular.

Figura 10. Distribuição dos casos conforme MVI e positividade em capilares peritubulares e *vasa recta* para T-Caderina.

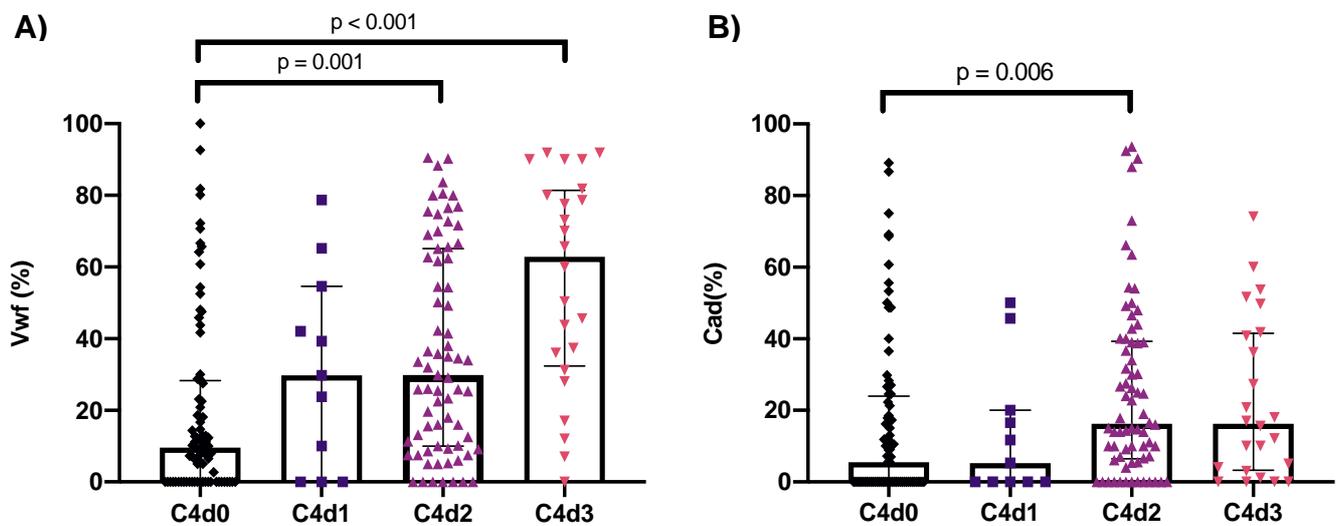


	Mediana	IQR
MVI = 0	0,0%	0,0%
MVI = 1	0,0%	0,0%
MVI > 1	0,0%	6,6%

Cav: Caveolina-1, MVI: escore de injúria microvascular.

Figura 11. Distribuição dos casos conforme MVI e positividade em capilares peritubulares e *vasa recta* para Caveolina-1.

A mediana de capilares peritubulares e vasa recta positivos para Vwf foi maior nos pacientes que apresentavam positividade focal para C4d (C4d2) (29,9% vs. 9,7%, $p = 0,001$) e positividade difusa (C4d3) (62,9% vs. 9,7%, $p < 0,001$), quando comparados com casos sem marcação (C4d0) (Figura 12.A). O marcador Cad apresentou maior marcação no grupo C4d2 quando comparado ao grupo C4d0 (16,3% vs. 5,5%, $p = 0,006$) (Figura 12.B). Não se observaram diferenças na expressão de Cav entre os grupos.



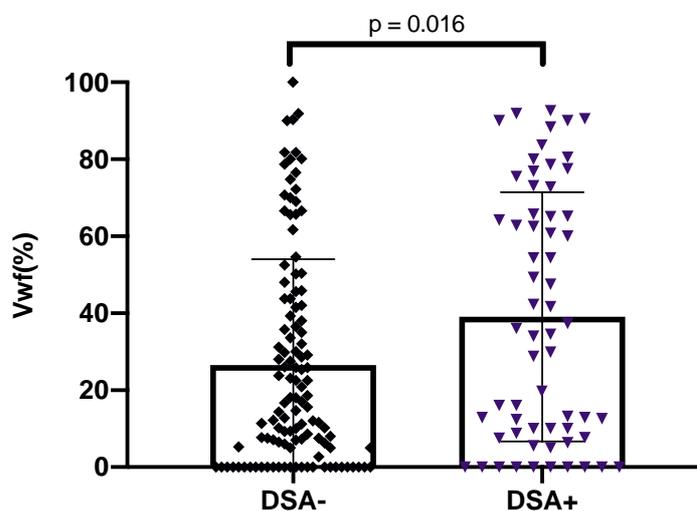
Vwf	Mediana	IQR
C4d0	9,7%	28,3%
C4d1	29,8%	54,6%
C4d2	29,9%	55,1%
C4d3	62,9%	49,0%

Cad	Mediana	IQR
C4d0	5,5%	24,0%
C4d1	5,3%	20,0%
C4d2	16,3%	32,8%
C4d3	16,3%	38,3%

Vwf: fator de von Willebrand, Cad: T-Caderina.

Figura 12. Distribuição dos casos conforme escore de positividade para C4d e marcação em capilares peritubulares e *vasa recta* para Fator de Von Willebrand (A) e T-Caderina (B)

Casos com DSA positivo apresentaram uma maior mediana de expressão de Vwf quando comparados a casos com pesquisa negativa para anticorpos anti-HLA (35,3% vs. 16,9%, $p = 0,016$) (Figura 13). Esta diferença não foi observada para os marcadores Cad (15,0% vs. 8,2%, $p = 0,173$), Cav (0,0% vs. 0,0%, $p = 0,942$) e também para C4d (10,0% vs. 5,0%, $p = 0,255$).



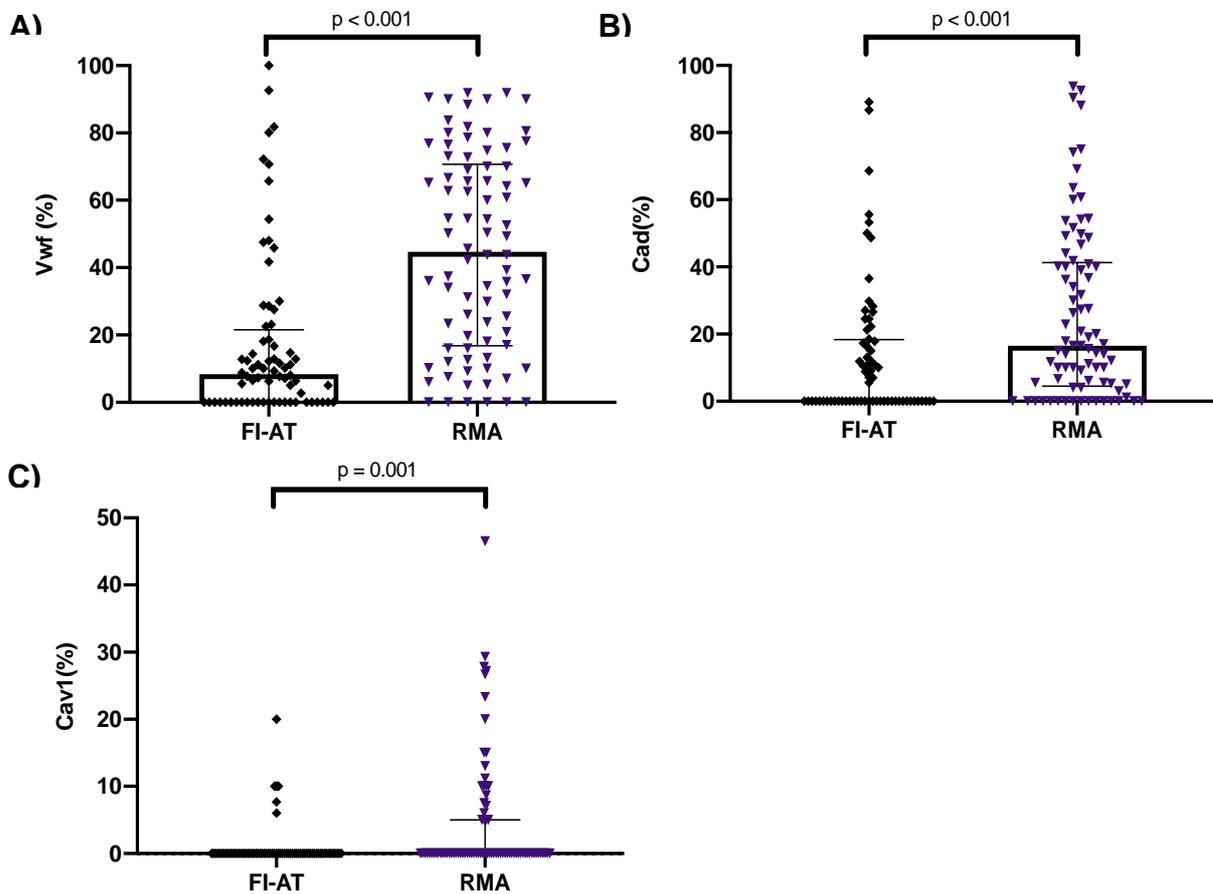
DSA	Mediana	IQR
Negativo	16,9%	38,4%
Positivo	35,3%	59,0%

Vwf: fator de von Willebrand, DAS: anticorpos específicos anti-HLA do doador

Figura 13. Distribuição dos casos conforme a positividade para DSA e a marcação em capilares peritubulares e *vasa recta* para Fator de Von Willebrand.

Os três biomarcadores testados apresentaram maior expressão em casos diagnosticados como rejeição (RMA ativa, RMA crônica ativa e RMA mista) quando

comparados a casos de FI-AT. A maior diferença foi observada para Vwf (44,7% vs. 8,4%, $p < 0,001$) (Figura 14.A). A mediana da expressão de Cad foi de 16,5% vs. 0,0% ($p < 0,001$) (Figura 14.B). A mediana de capilares peritubulares e *vasa recta* positivos para Cav foi de 0,0% (IQR 0,0%) em casos de rejeição e de 0,0% (IQR 5,0%) em casos de FI-AT ($p = 0,001$) (Figura 14.C). Não houve diferenças de medianas de expressão entre casos de rejeição C4d positivos e aqueles C4d negativos para Cav (0,0% vs. 2,5%, $p = 0,170$), Vwf (44,7% vs. 48,2%, $p = 0,439$) e Cad (15,6% vs. 44,4%, $p = 0,341$).



Vwf	Mediana	IQR
FI-AT	44,7%	54,0%
RMA	8,4%	21,5%

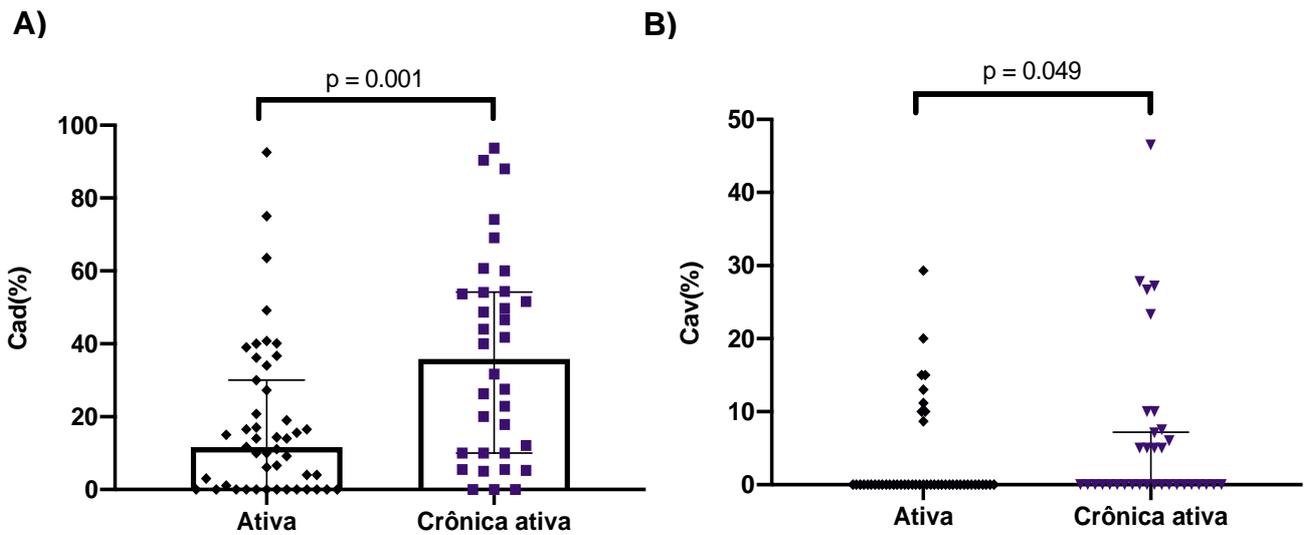
Cad	Mediana	IQR
FI-AT	0,0%	18,4%
RMA	16,5%	36,8%

Cav	Mediana	IQR
FI-AT	0,0%	0,0%
RMA	0,0%	5,0%

Vwf: fator de von Willebrand, Cad: T- Caderina, Cav: Caveolina-1, RMA: Rejeição Mediada por Anticorpos, FI-AT: Fibrose intersticial e atrofia tubular

Figura 14. Distribuição dos casos conforme o diagnóstico de RMA e a marcação em capilares peritubulares e vasa recta para Fator de Von Willebrand (A), T-Caderina (B) e Caveolina-1 (C).

O marcador Cad apresentou maior mediana de expressão em casos de RMA crônica ativa, quando comparado a quadros ativos (35,9% vs. 11,7%, $p = 0,001$). Uma maior expressão em casos crônicos também foi observada para Cav (0,0% vs. 0,0%, $p = 0,049$) (Figura 15).



Cad	Mediana	IQR
RMA ativa	11,7%	30,0%
RMA crônica	35,9%	44,2%

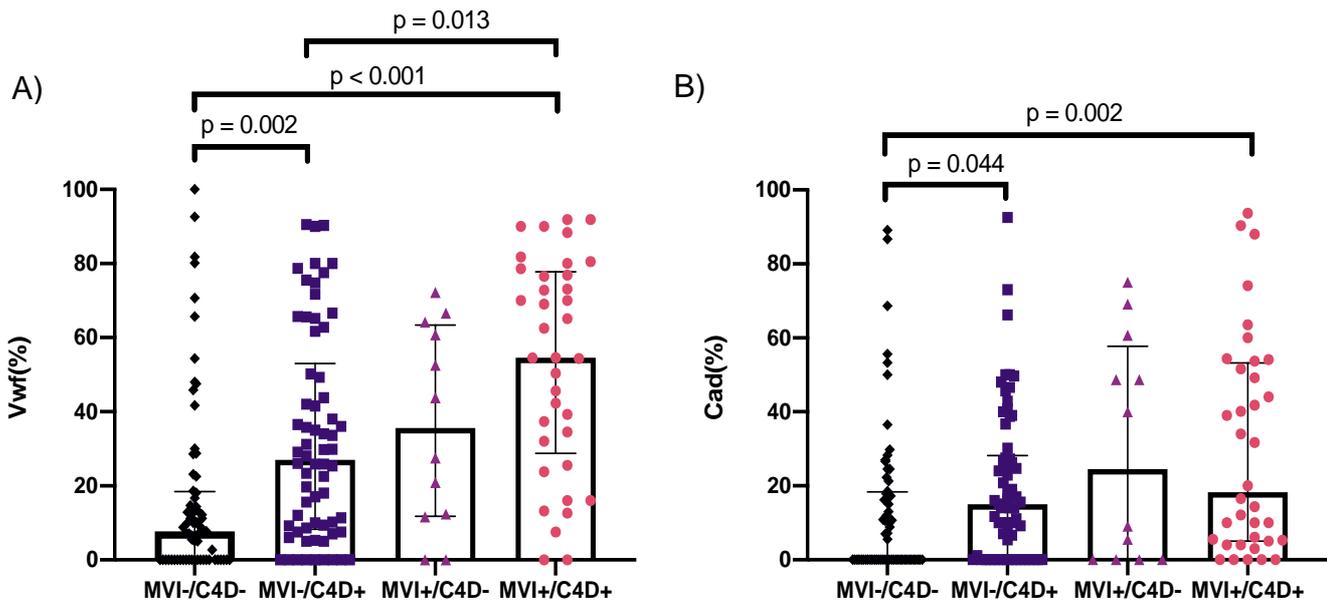
Cav	Mediana	IQR
RMA ativa	0,0%	0,0%
RMA crônica	0,0%	7,2%

RMA: Rejeição Mediada por Anticorpos; Cad: T- Caderina, Cav: Caveolina-1.

Figura 15. Distribuição dos casos conforme o diagnóstico de RMA e a marcação em capilares peritubulares e vasa recta para Fator de Von Willebrand (A), T-Caderina (B) e Caveolina-1 (C).

Quatro grupos foram analisados conforme a presença de MVI e positividade para C4d. A mediana da expressão de Vwf foi significativamente maior no grupo MVI+/C4d+ quando comparado ao grupo MVI-/C4d- (54,6% vs. 7,7%, $p < 0,001$) e ao grupo MVI-/C4d+ (54,6% vs. 27,0%, $p = 0,013$). Casos MVI-/C4d+ também apresentaram maior mediana de expressão quando comparados aos casos do grupo

MVI-/C4d- (27,0% vs. 7,7%, $p = 0,002$) (Figura 16.A). A positividade mediana para Cad nos grupos MVI+/C4d+ (18,3% vs. 0,0%, $p = 0,002$) e MVI-/C4d- (24,6% vs. 0,0%, $p = 0,044$) foi maior que a observada no grupo MVI-/C4d- (Figura 16.B). Não houve diferenças entre os grupos para o marcador Cav (medianas 0,0% vs. 0,0% vs. 0,0% vs. 0,0%, $p = 0,050$)



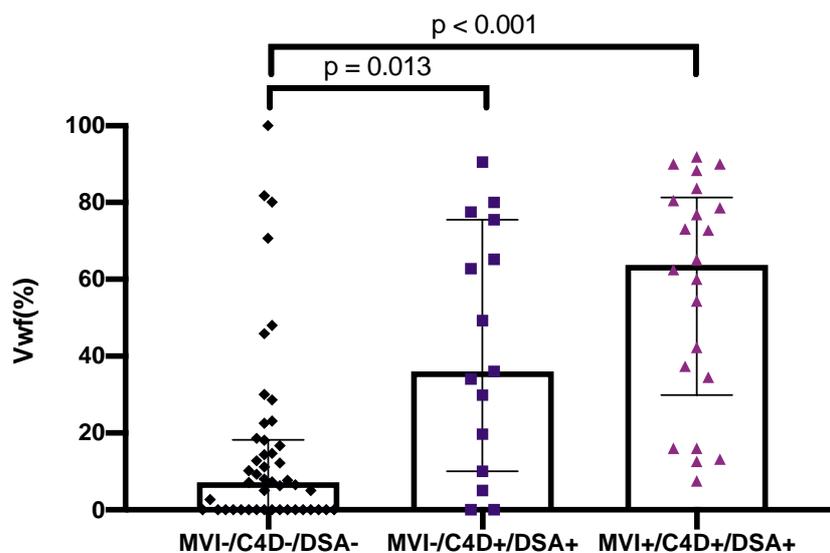
Vwf	Mediana	IQR
MVI-/C4d-	7,7%	18,5%
MVI-/C4d+	27,0%	44,7%
MVI+/C4d-	35,7%	51,6%
MVI+/C4d+	54,6%	48,1%

Cad	Mediana	IQR
MVI-/C4d-	0,0%	18,4%
MVI-/C4d+	15,0%	27,4%
MVI+/C4d-	24,6%	57,7%
MVI+/C4d+	18,3%	51,4%

Vwf: fator de von Willebrand, Cad: T-Caderina, MVI = escore de injúria microvascular.

Figura 16. Distribuição dos casos conforme a combinação de MVI e C4d e a marcação para Fator de Von Willebrand (A) e T-Caderina (B).

Analisaram-se três grupos conforme a combinação da positividade para DSA, MVI e C4d. A mediana da expressão de Vwf foi maior nos grupos DSA+/MVI+/C4d+ (63,8% vs. 7,2%, $p < 0,001$) e DSA+/MVI-/C4d+ (36,0% vs. 7,2%, $p = 0,013$) quando comparados aos casos DSA-/MVI-/C4d-. Não foram observadas diferenças entre os grupos DSA+/MVI-/C4d+ e DSA+/MVI+/C4d+ (63,8% vs. 51,4%, $p = 0,556$) (Figura 17). Os marcadores Cav (0,0% vs. 0,0% vs. 0,0%, $p = 0,174$) e Cad (30,0% vs. 11,7% vs. 10,6%, $p = 0,109$) não apresentaram diferenças quantitativas de medianas de marcação entre os grupos analisados.

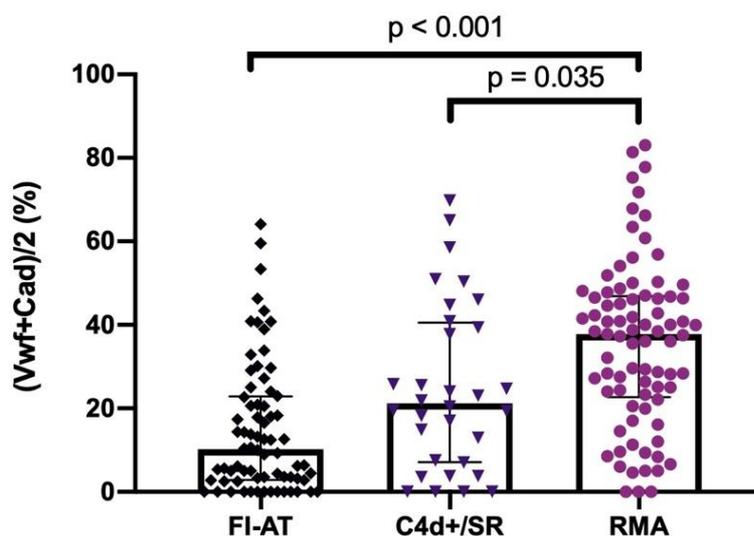


	Mediana	IQR
DSA-/MVI-/C4d-	7,2%	18,2%
DSA+/MVI-/C4d+	36,0%	65,5%
DSA+/MVI+/C4d+	63,8%	51,4%

Vwf: fator de von Willebrand, MVI: escore de injúria microvascular, DSA: anticorpos específicos anti-HLA do doador.

Figura 17. Distribuição dos casos conforme a combinação de DSA, MVI e C4d e a marcação para Fator de Von Willebrand.

A marcação conjunta de Vwf e Cad foi avaliada por meio do cálculo da positividade média - $(Vwf+Cad)/2$ - nos grupos FI-AT, C4d sem sinais de rejeição e RMA. Observou-se maior mediana de expressão em casos de RMA quando comparados a casos C4d positivos sem rejeição (37,8% x 21,2%, $p = 0,035$) e a casos diagnosticados como FI-AT (37,8% vs. 10,2%, $p < 0,001$) (Figura 18). O teste não paramétrico de Spearman mostrou correlação positiva entre as marcações de Vwf e Cad ($r = 0,230$, IC 95% 0,083-0,367, $p = 0,002$).



	Mediana	IQR
FI-AT	10,2%	20,0%
C4d+ sem RMA	21,2%	33,4%
RMA	37,8%	24,2%

Vwf: fator de von Willebrand, Cad: T-Caderina, FI-AT: Fibrose intersticial e atrofia tubular, C4d+/SR: C4d positivo sem sinais de rejeição, RMA: Rejeição Mediada por Anticorpos.

Figura 18. Distribuição dos casos conforme a média de marcação de Fator de Von Willebrand e T-Caderina e os diagnósticos de FI-AT, positividade para C4d sem sinais de rejeição e RMA.

Os resultados das análises quantitativas realizadas encontram-se detalhadas no Apêndice 2.

As figuras 19 e 20 mostram o padrão de marcação à IHQ em amostras diagnosticadas como FI-AT e RMA.

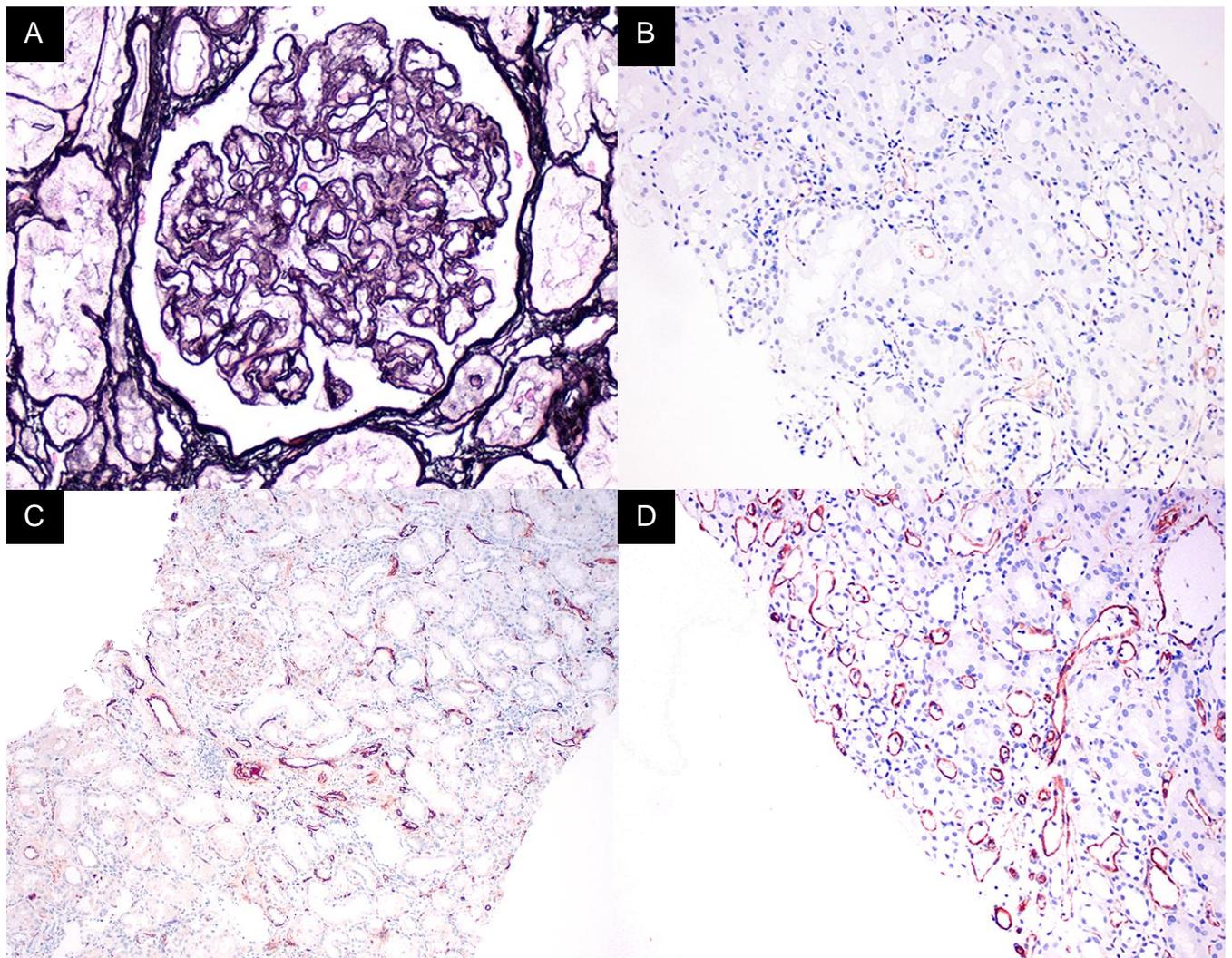


Figura 19. Alterações histopatológicas e marcação imuno-histoquímica em caso de RMA crônica ativa MVI+/C4d+. A) Duplos contornos em alças capilares glomerulares e alterações isquêmicas, caracterizando glomerulopatia crônica do transplante (Prata Jones, 400x). B) Marcação focal para Cav em capilares

peritubulares corticais (200x). C) Marcação moderada de Vwf em capilares peritubulares corticais (100x). D) Marcação difusa para Cav em capilares peritubulares e vasa recta (400x).

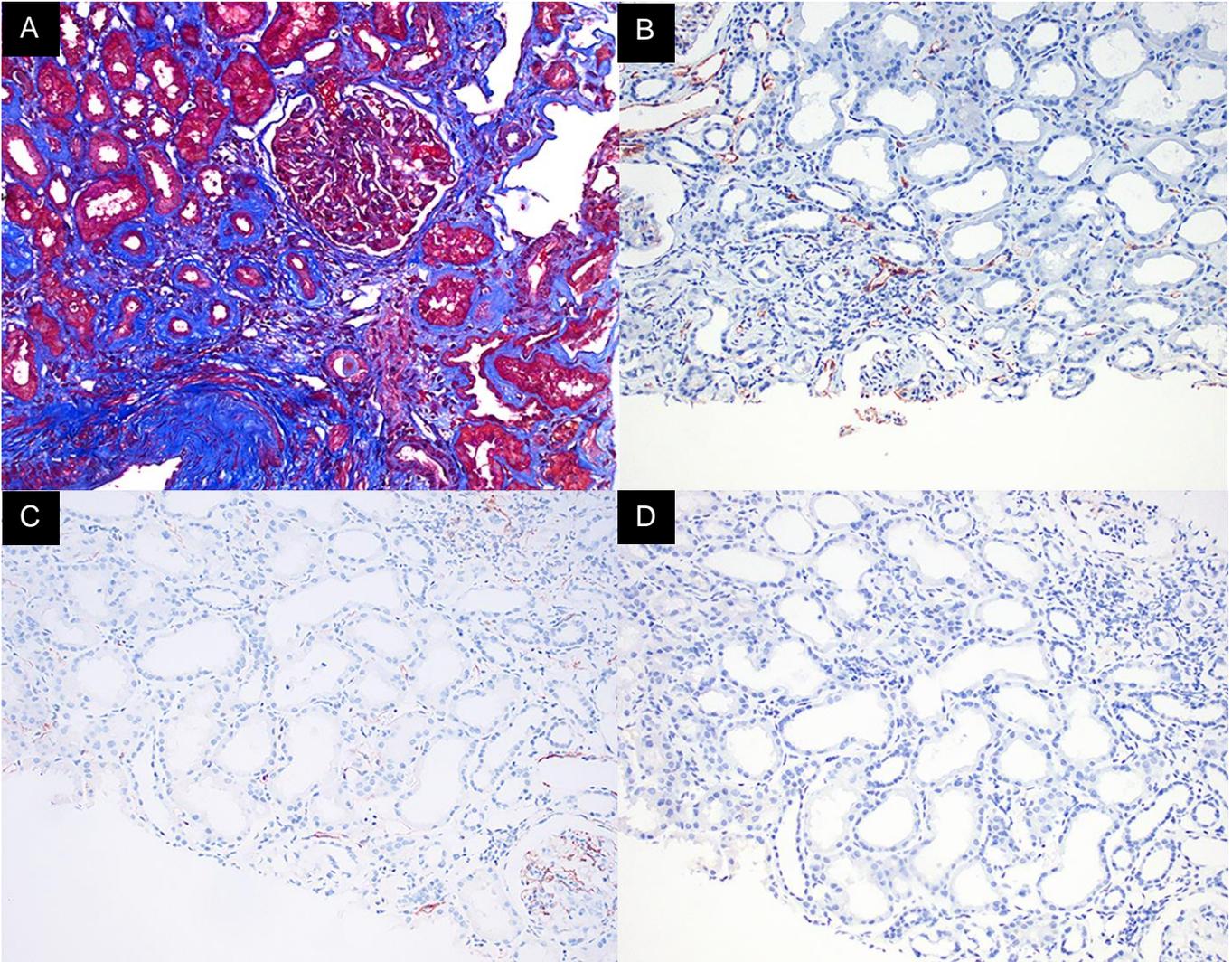


Figura 20. Alterações histopatológicas e marcação imuno-histoquímica em caso de FI-AT, DSA-, MVI-, C4d-. A) Fibrose intersticial e atrofia tubular (Tricrômio de Masson, 200x). B) Marcação focal para Vwf em capilares peritubulares corticais (200x). C) Marcação focal para Cad em capilares peritubulares corticais (200x). D) Ausência de marcação para Cav (200x).

7.1 Estudo 2

Setenta e uma biópsias diagnosticadas como FI-AT, de 65 receptores, foram analisadas. Dezoito casos (25,4%) apresentaram perda do enxerto no período considerado e 2 (2,8%) vieram a óbito por causas infecciosas. Dentre as causas de perda, 6 casos (33,3%) foram relatados como rejeição crônica associada a má aderência ao tratamento imunossupressor (n = 6, 33%), 1 (5,6%) como trombose do enxerto, 1 (5,6%) como fístula arteriovenosa, 1 (5,6%) como nefrite intersticial por BK vírus, 1 (5,6%) como Glomerulosclerose Segmentar e Focal e 1 (5,6%) como infecção bacteriana em loja cirúrgica. Em 7 casos (38,9%) não foi possível definir precisamente a etiologia da perda.

Na análise bivariada, o grupo que evoluiu para perda do enxerto apresentava receptores mais velhos (47,2 vs. 33,5, p = 0,008), menor percentual de pacientes com DSA positivo (11,8% x 37,7%, p = 0,045), maior tempo de transplante (4,6 anos vs. x 2,1 anos, p = 0,011), maior percentual de pacientes em uso de micofenolato (77,7% x 33,9%, p = 0,002) e menor eTFG estimada no momento da biópsia (26,9 ml/min/1,73m² vs. 48,9 ml/min/1,73m², p < 0,001) (Tabela 2).

Tabela 2. Características demográficas dos casos com FI-AT conforme o diagnóstico de perda do enxerto.

Demografia	Perda do enxerto		p
	Não (n = 53)	Sim (n= 18)	
Sexo masculino, n(%)	36 (67,9)	13 (72,2)	0,733
Etnia			
<i>Caucasiano</i>	6 (11,3)	2 (12,5)	
<i>Pardo</i>	44 (83,0)	15 (83,3)	1,000
<i>Negro</i>	3 (5,7)	1 (5,6)	
Idade (anos), mediana (IQR)	33,5 (25)	47,2 (27)	0,008
Etiologia da DRC, n(%)			
<i>Doença hipertensiva</i>	4 (7,5)	5 (27,8)	

<i>Diabetes Mellitus</i>	2 (3,8)	3 (16,7)	
<i>Glomerulopatas</i>	12 (22,6)	3 (16,7)	0,007
<i>Outras</i>	18 (34,0)	0 (0,0)	
<i>Desconhecida/Indeterminada</i>	17 (32,1)	7 (38,9)	
IMC (kg/m ²) , mediana (IQR)	22,7 (6,7)	26,3 (7,9)	0,087
Tempo em diálise (meses), mediana (IQR)	21,0 (24,0)	34,0 (68,0)	0,199
Retransplante, n(%)	6 (11,3)	1 (5,6)	0,478
Tipo de doador, n(%)			
<i>Falecido</i>	44 (83,0)	12 (66,7)	0,142
<i>Vivo</i>	9 (17,0)	6 (33,3)	
Idade do doador (anos), mediana (IQR)	42,0 (23,0)	30,0 (23,0)	0,305
PRA I (%), mediana (IQR)	0,0 (9,3)	0,0 (0,0)	0,234
PRA II, (%), mediana (IQR)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,180
<i>Mismatches</i> , HLA média ± SD	3,2 +/- 1,7	3,7 +/- 0,9	0,833
DSA (n, %)	20 (37,7)	2 (11,8)	0,045
Terapia de indução com ATG, n(%)	44 (84,6)	12 (75,0)	0,378
Imunossupressão inicial, n(%)			
<i>TAC/mTORi</i>	35 (66,0)	4 (22,2)	
<i>TAC/MPA</i>	14 (26,4)	8 (44,4)	0,002
<i>TAC/mTORi/MPA</i>	4 (7,5)	6 (33,3)	
Corticoides (inicial), n(%)	23 (43,4)	9 (52,9)	0,492
<i>Imunossupressão (biópsia), n(%)</i>			
<i>TAC/mTORi</i>	38 (71,7)	8 (44,4)	
<i>TAC/MPA</i>	7 (13,2)	7 (38,9)	0,081
<i>TAC/mTORi/MPA</i>	7 (13,2)	2 (11,1)	
<i>Outros</i>	1 (1,9)	1 (5,6)	
eTFG (ml/min/1,73m ²), mediana (IQR)	48,9 (24,0)	26,9 (20,0)	<0,001
Tempo de transplante (anos), mediana (IQR)	2,1 (4,1)	4,6 (7,3)	0,011

DRC: doença renal crônica, IMC: índice de massa corpóreo, PRA: Painel de Reatividade de Anticorpos, HLA: antígeno leucocitário humano, PRA: painel de reatividade de anticorpos, DSA: anticorpo específico anti-HLA do doador, TAC: Tacrolimo, mTORi: inibidor da via mTOR: MPA: micofenolato de mofetila ou sódico, eTFG: taxa de filtração glomerular.

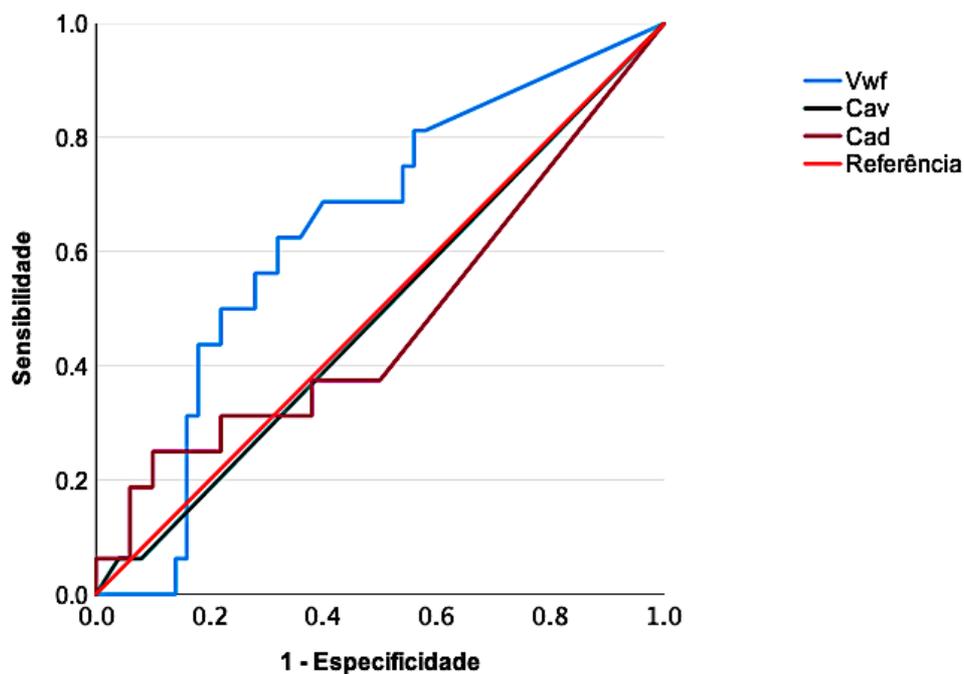
Nos casos que evoluíram com perda do enxerto, foram observados maiores médias dos escores de Banff para os parâmetros fibrose intersticial (ci) (1,6 vs. 1,2, p = 0,026) e fibrose intersticial (ci) + atrofia tubular (ct) (2,9 vs. 2,1, p = 0,003). Não houve diferenças significativas entre os grupos quanto à mediana do percentual de capilares tubulares e *vasa recta* positivos para Cav (0,0% vs. 0,0%, p = 0,842), Vwf (11,6% vs. 7,5%, p = 0,061) e Cad (0,0% vs. 6,3%, p= 0,889) (Tabela 3).

Tabela 3. Alterações histológicas e marcação imuno-histoquímica para Caveolina-1, Fator de Von Willebrand e T-Caderina dos casos com FI-AT conforme o diagnóstico de perda do enxerto.

Banff	Perda do enxerto		p
	Não (n =53)	Sim (n = 18)	
ci, média ± DP	1,2 ± 0,5	1,6 ± 0,7	0,026
ci + ct, média ± DP	2,1 ± 1,1	2,9 ± 1,3	0,003
mm > 0, n (%)	14 (26,9)	8 (47,1)	0,122
i > 0, n (%)	5 (9,4)	1 (5,6)	0,609
t > 0, n (%)	3 (5,7)	1 (5,6)	0,987
ti > 0, n (%)	21 (39,6)	7 (38,9)	0,956
i-ifta > 0, n (%)	22 (41,5)	7 (38,9)	0,845
cv > 0, n (%)	15 (44,1)	8 (57,1)	0,412
ah > 0, n (%)	1 (1,9)	0 (0,0)	0,557
aah > 0, n (%)	6 (11,3)	4 (22,2)	0,251
Imuno-histoquímica			
Cav (%), mediana (IQR)	0,0(0,0)	0,0(0,0)	0,842
Vwf (%), mediana (IQR)	7,5(15,0)	11,6(18,6)	0,061
Cad (%), mediana (IQR)	6,3(17,5)	0,0(28,3)	0,889

ci: fibrose intersticial, ct: atrofia tubular, mm: aumento de matriz mesangial, i: inflamação intersticial, ti: total de inflamação cortical, i-ifta: inflamação em áreas de fibrose, cv: espessamento fibroso intimal, ah = hialinose arteriolar não nodular, aah: hialinose arteriolar nodular, Cav: Caveolina-1, Vwf: fator de von Willebrand, Cad: T-Caderina.

As curvas ROC de Vwf, Cad e Cav para predição de perda do enxerto estão demonstradas na figura 21. De acordo com estas análises, Vwf foi o biomarcador com melhor acurácia para prever perda do enxerto, com AUC-ROC de 0,637 (IC 95% 0,486-0,788, $p = 0,101$). Quando utilizado o ponto de corte de 10,1 % dos capilares peritubulares, encontraram-se valores de sensibilidade e especificidade de, respectivamente, 72,2% (IC 95% 49,1-87,5%) e 58,5% (IC 95% 45,1-70,7). Deste modo, os casos foram agrupados quanto à marcação para Vwf em menor ou igual a 10% e maior que 10%. Os valores de AUC-ROC para Cad e Cav foram, respectivamente de 0,480 (IC 95% 0,304-0,656, $p = 0,811$) e 0,493 (0,329-0,656, $p = 0,928$) (Figura 21).



	AUC	IC 95%	p
Vwf	0,637	0,486-0,788	0,101
Cad	0,480	0,304-0,656	0,811
Cav	0,493	0,329-0,656	0,928

Vwf: fator de von Willebrand, Cav: Caveolina-1, Cad: T-Caderina.

Figura 21. Curvas AUC-ROC dos marcadores Fator de Von Willebrand, T-Caderina e Caveolina-1 para predição de perda do enxerto.

Espécimes com marcação de Vwf em mais de 10% dos capilares peritubulares e *vasa recta* mostraram maior percentual de pacientes mulheres (44,8% vs. 21,4%, $p = 0,036$), caucasianos (25,9% vs. 2,4%, $p = 0,001$) e amostras com fibrose intersticial moderada ou acentuada ($ci > 1$) ao exame anatomopatológico (41,4% vs. 14,3%, $p = 0,010$) (Tabela 4).

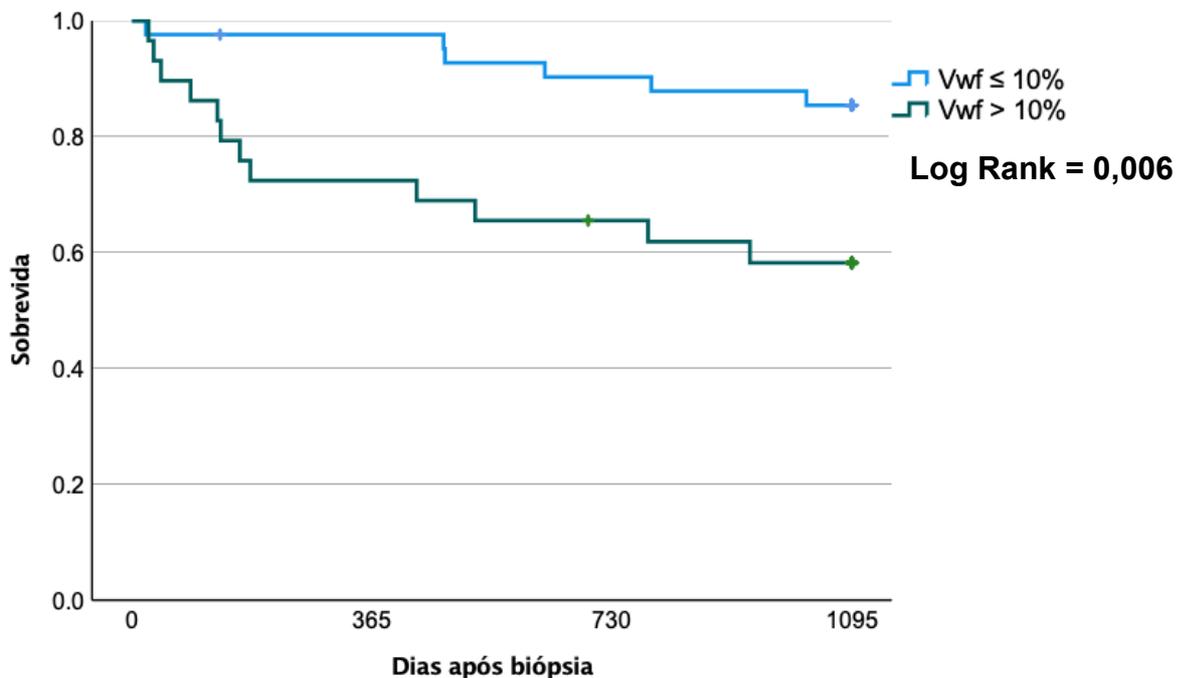
Tabela 4. Características demográficas, laboratoriais e histológicas dos pacientes conforme o percentual de capilares e peritubulares para Fator de Von Willebrand ($\leq 10\%$ e $>10\%$).

Variáveis	Vwf $\leq 10\%$ (n = 42)	Vwf $> 10\%$ (n = 29)	p
Sexo feminino, n(%)	9 (21,4)	13 (44,8)	0,036
Idade (anos), mediana (IQR)	34 (23)	47 (25)	
Etnia, n(%)			
Caucasiano	1 (2,4)	7 (25,9)	0,010
Pardo	38 (92,7)	18 (66,7)	
Negro	2 (4,9)	2 (7,4)	
<i>Mismatches</i> HLA, média \pm DP	3,0 (1,0)	3,0 (2,0)	0,971
PRA I (%), mediana (IQR)	0,0 (5,9)	0,0 (10,0)	0,936
PRA II (%), mediana (IQR)	0,0 (0,0)	0,0 (0,03)	0,702
DSA, n(%)	13 (31%)	9 (32,1)	0,916
Proteinúria, n(%)	26 (61,9)	15 (51,7)	0,393
$ci > 1$, n(%)	6 (14,3)	12 (41,4)	0,010
i-ifta > 0 , n(%)	15 (35,7)	14 (48,3)	0,290
eTFG no momento da biópsia (ml/min/1,73m ²), mediana (IQR)	47,2 (24,9)	37,4 (23,0)	0,085

Tempo de transplante (anos), 2,0 (3,7) 2,2 (5,2) 0,375
 mediana (IQR)

DRC: doença renal crônica, IMC: índice de massa corpóreo, PRA: Painel de Reatividade de Anticorpos, HLA: antígeno leucocitário humano, PRA: painel de reatividade de anticorpos, DSA: anticorpo específico anti-HLA do doador, ci: fibrose intersticial, i-ifta: inflamação em áreas de fibrose, eTFG: taxa de filtração glomerular.

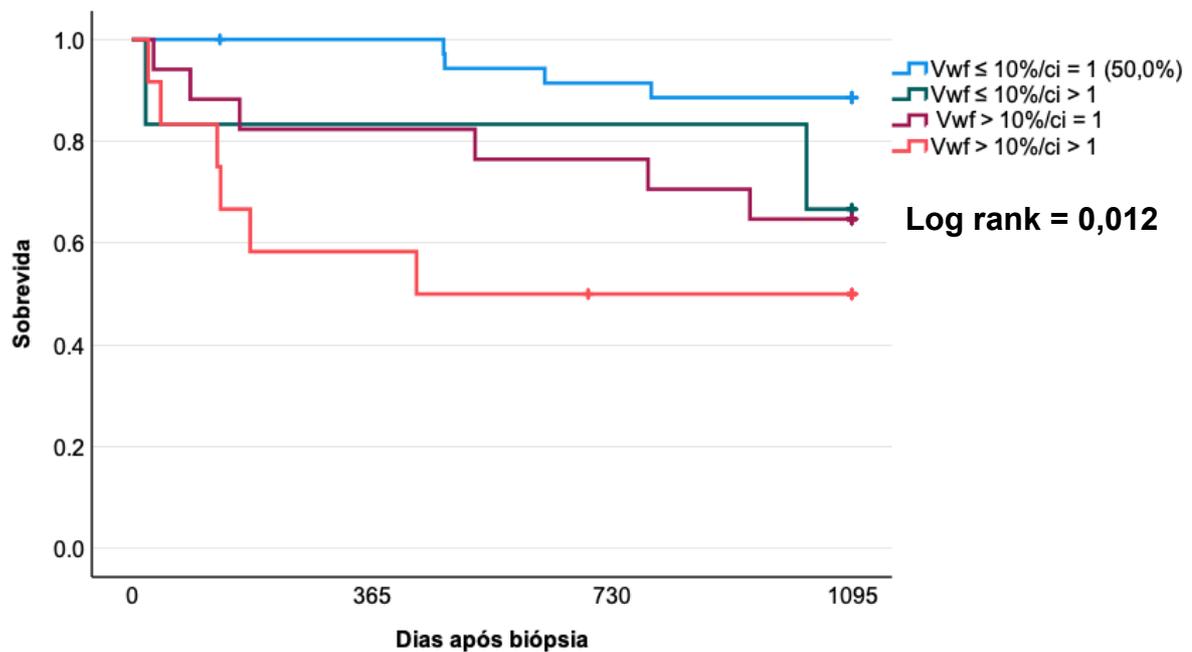
A análise pelo método de Kaplan-Meier da sobrevida do enxerto censurada para os óbitos mostrou menor sobrevida para o grupo Vwf > 10% no período de 3 anos (58,2% x 85,4%) (log rank = 0,006) (Figura 22).



N sob risco	Baseline	1 ano	2 anos	3 anos
Vwf ≤ 10%	42	40	37	35
Vwf > 10%	29	21	18	16

Figura 22. Curva de sobrevida Kaplan-Meier do enxerto em 3 anos censurada para óbitos.

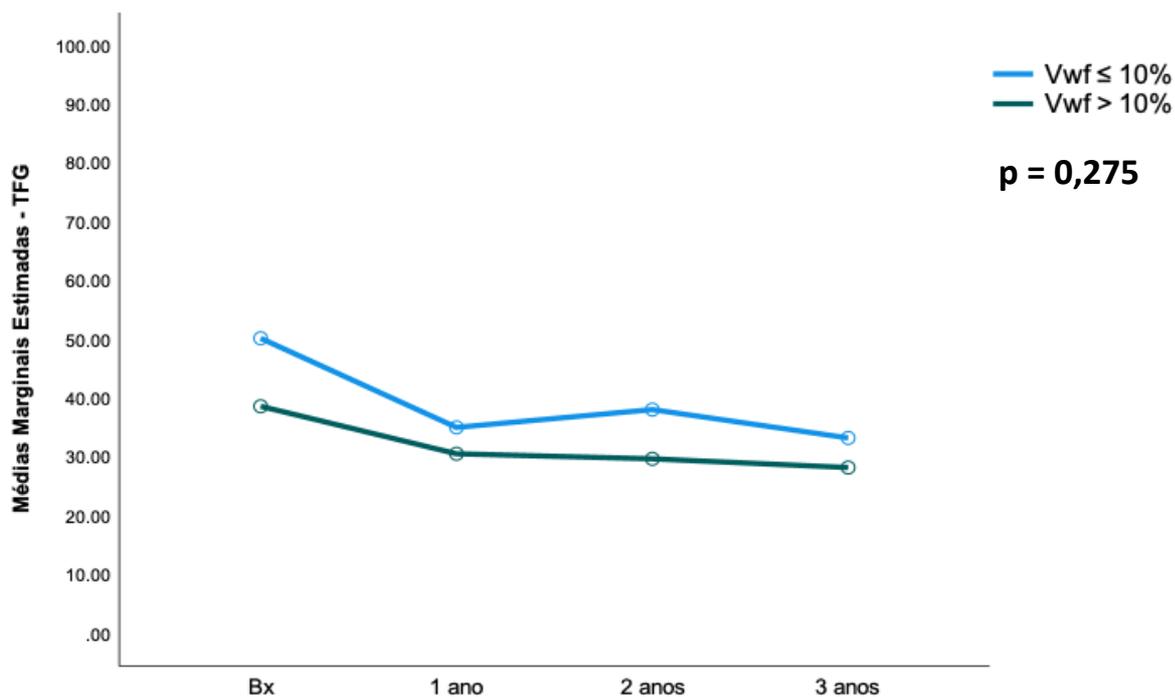
Quando foram associados os parâmetros marcação para Vwf e presença de fibrose intersticial (leve: ci = 1, moderada ou acentuada: ci > 1), observou-se menor sobrevida censurada para óbitos no período de 3 anos para o grupo com Vwf > 10%/ci > 1 (50,0%) quando comparado aos grupos Vwf ≤ 10%/ci = 1 (88,6%), Vwf ≤ 10%/ci > 1 (66,7%) e Vwf > 10%/ci = 1 (64,7%) (log rank = 0,012) (Figura 23).



N sob risco	Baseline	1 ano	2 anos	3 anos
Vwf ≤10%/ci = 1	36	35	32	31
Vwf ≤10%/ci > 1	6	5	5	4
Vwf >10%/ci = 1	17	14	13	11
Vwf >10%/ci > 1	12	7	5	5

Figura 23. Curva de sobrevida Kaplan-Meier do enxerto em 3 anos censurada para óbitos.

A análise da evolução da eTFG(ml/min) estimada no momento da biópsia (50,2 x 38,6) e nos instantes 1 ano (35,1 x 30,6), 2 anos (38,1 x 29,7) e 3 anos (33,3 x 28,2) pós-biópsia, por meio do modelo de médias marginais estimadas, não evidenciou diferença significativa entre os grupos Vwf ≤10% e Vwf > 10% (p = 0, 275) (Figura 24).



eTFG - média ± DP				
	BX	1 ano	2 anos	3 anos
Vwf ≤10%	50,2 ± 22,1	35,1 ± 16,5	38,1 ± 21,9	33,3 ± 21,2
Vwf >10%	38,6 ± 16,5	30,6 ± 28,8	29,7 ± 29,2	28,2 ± 30,4

Figura 24. Médias marginais estimadas da Taxa de Filtração Glomerular no momento da biópsia e 1, 2 e 3 anos após a biópsia.

Em análise multivariada pelo modelo de regressão de Cox, as variáveis independentemente associadas a perda do enxerto foram marcação para Vwf à IHQ (Vwf > 10%) (HR 2,88, IC 95% 1,03-8,02, p = 0,043) e a taxa de filtração glomerular no momento da biópsia (HR 0,92, IC 95% 0,88-0,96, p < 0,001) (Tabela 6).

Tabela 5. Análise univariada e multivariada dos fatores de risco para perda do enxerto.

	ANÁLISE UNIVARIADA			ANÁLISE MULTIVARIADA			
	HR	IC 95%	p	HR	IC 95%	p	
Pré-transplante	Idade do doador (anos)	0,98	0,94-1,02	0,252			
	Sexo masculino	1,20	0,43-3,37	0,728	-	-	-
	Idade (anos)	1,04	1,01-1,07	0,010	1,02	0,97-1,07	0,304
	Etnia (pardo)	1,04	0,94-11,49	0,974	-	-	-
	Diabetes	3,15	1,12-8,87	0,030	1,58	0,45-5,50	0,473
	Tempo em diálise (meses)	1,00	0,99-1,01	0,676	-	-	-
Transplante	Retransplante	0,47	0,06-3,52	0,461	-	-	-
	PRA I (%)	0,99	0,97-1,02	0,742	-	-	-
	PRA II (%)	0,81	0,46-1,45	0,481	-	-	-
	DSA	0,24	0,55-1,06	0,059	0,43	0,92-2,01	0,284
	<i>Mismatches</i>	1,01	0,75-1,37	0,930	-	-	-
	Indução com ATG	0,64	0,21-1,97	0,439	-	-	-
	eTFG na biópsia (ml/min/1,73m²)	0,92	0,89-0,96	<0,001	0,92	0,88-0,96	<0,001
	Nível de tacrolimo (ng/dl)	1,02	0,98-1,07	0,251	-	-	-
	Nível de mTORi (ng/dl)	0,87	0,55-1,38	0,563	-	-	-
	Proteinúria	0,50	0,18-1,40	0,187	-	-	-
Patologia	ci > 1	3,06	1,02-7,76	0,019	0,51	0,18-1,44	0,205
	Vwf > 10%	3,60	1,35-9,62	0,011	2,88	1,03-8,02	0,043
	Cad > 0%	1,58	0,59-4,28	0,366	-	-	-
	Cav > 0%	1,35	0,18,10,16	0,773	-	-	-

- Vwf: fator de von Willebrand, Cav: Caveolina-1, Cad: T-Caderina; PRA: Painel de Reatividade de Anticorpos; eTFG: taxa de filtração glomerular; ci: fibrose intersticial; HR: Hazard-ratio; IC: intervalo de confiança

- Pacientes que faziam uso de micofenolato apresentavam maiores médias de escores Banff para fibrose intersticial em suas biópsias ($1,52 \pm 0,73$ x $1,20 \pm 0,4$; $p = 0,019$) e maior frequência de proteinúria ($78,3$ x $45,7\%$; $p = 0,010$).

- Casos de transplantes com órgãos provenientes de doadores vivos apresentaram maior tempo de transplante (mediana $5,93$, IQR $7,03$) que os transplantes de doadores cadáveres (mediana $1,79$, IQR $3,19$) ($p < 0,001$).

8 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a correlação entre a expressão IHQ de Vwf, Cav e Cad em biópsias de enxerto renal e lesões mediadas por anticorpos. Todos os marcadores mostraram associação significativa com inflamação microvascular. Além disso, Vwf e Cad mostraram maior expressão em amostras positivas para C4d. Vwf mostrou expressão mais difusa em casos DSA positivos e todos os três marcadores apresentaram maiores percentuais de marcação em casos de RMA quando comparados aos diagnosticados como FI-AT.

O diagnóstico de RMA baseia-se essencialmente na combinação de parâmetros como DSA, MVI e positividade para C4d (LOUPY; HAAS; ROUFOSSE; NAESENS *et al.*, 2020). O marcador C4d, amplamente utilizado, apresenta como vantagens o baixo custo, o fato de ser avaliado por meio de plataformas acessíveis, como IHQ e IF, e sua relação direta com ativação do sistema complemento. Os pontos negativos referentes a este marcador são a variação interobservadores em relação à definição dos escores, dificuldades em avaliar marcações focais e a possibilidade de marcação sem relevância clínica, como ocorre em transplantes ABO-incompatíveis ou naqueles sem evidência de rejeição (COHEN; COLVIN; DAHA; DRACHENBERG *et al.*, 2012; SAPIR-PICHHADZE; CURRAN; JOHN; TRICCO *et al.*, 2015). A inclusão da RMA negativa para C4d foi estabelecida após a conferência Banff em 2013, resultando em um incremento na detecção desta entidade (DE SERRES; NOËL; CÔTÉ; LAPOINTE *et al.*, 2016). Esta mudança na classificação foi favorecida por estudos que avaliaram e validaram marcadores moleculares envolvidos no dano mediado por anticorpos (SIS, 2012; SIS; CAMPBELL; MUELLER; HUNTER *et al.*, 2007; SIS; JHANGRI; BUNNAG; ALLANACH *et al.*, 2009; SIS; JHANGRI; RIOPEL; CHANG *et al.*, 2012). No entanto, este marcador ainda é utilizado para demonstrar associação entre a presença de DSA circulantes e lesão ao enxerto, embora a ativação do complemento possa ser incompleta e haver deposição de C4d mesmo sem ativação mediada por anticorpos (DOMINY; WILLICOMBE; AL JOHANI; BECKWITH *et al.*, 2019).

O escore de injúria microvascular, proposto como uma ferramenta adicional para o diagnóstico de RMA em casos C4d negativos, baseia-se na evolução dos

parâmetros glomerulite e pericapilarite. MVI (g+ptc) igual ou maior que dois está significativamente relacionado a expressão aumentada de ENDATs, DSA e RMA . No entanto, cabe ressaltar que sinais de inflamação microvascular podem ser observados em outras condições potencialmente lesivas ao enxerto, como glomerulonefrites (recidivadas ou de novo), injúria tubular aguda e RMCT (GUPTA; BROIN; BAO; PULLMAN *et al.*, 2016).

A reunião para atualização da classificação de Banff em 2017 promoveu o debate acerca da dificuldade para a pesquisa de DSAs e comprovação de seu potencial dano ao enxerto, como a variabilidade nos métodos atualmente empregados, os valores de referência e os mecanismos envolvendo anticorpos não-anti-HLA (HAAS; LOUPY; LEFAUCHEUR; ROUFOSSE; GLOTZ; SERON; NANKIVELL; HALLORAN; COLVIN; AKALIN; ALACHKAR; BAGNASCO; BOUATOU; BECKER; CORNELL; VAN HUYEN *et al.*, 2018). Alguns tipos de DSA, como anti-HLA DQ *de novo*, mostram uma associação mais robusta com deterioração da função do enxerto, quando comparados a outros subtipos sem relevância prognóstica e comumente encontrados em receptores de transplantes renal sem fenótipos patológicos identificados ao exame anatomopatológico (HAYDE; BROIN; BAO; DE BOCCARDO *et al.*, 2014).

Apesar de suas limitações, C4d, MVI e DSA foram os critérios utilizados nos estudos que avaliaram a correlação entre a expressão molecular de ENDATs e os tipos de lesão mediados por anticorpos. Sis *et al* identificaram marcadores moleculares por meio de microarranjos de DNA (SIS; JHANGRI; BUNNAG; ALLANACH *et al.*, 2009). A expressão de ENDAT's mostrou associação com glomerulite, capilarite, glomerulopatias do transplante, multilaminação da membrana basal de capilares peritubulares, inflamação intersticial, DSA e fibrose. A análise por meio de RT-PCR para validação dos microarranjos mostrou ainda expressão aumentada de produtos de transcrição dos genes Cav, Vwf e CDH13. Achados similares foram observados em estudos subsequentes (AUBERT; LOUPY; HIDALGO; DUONG VAN HUYEN *et al.*, 2017; GUPTA; BROIN; BAO; PULLMAN *et al.*, 2016; HAYDE; BAO; PULLMAN; YE; CALDER; CHUNG; SCHWARTZ; LUBETZKY *et al.*, 2013; HAYDE; BROIN; BAO; DE BOCCARDO *et al.*, 2014; SIS, 2012; SIS; JHANGRI; BUNNAG; ALLANACH *et al.*, 2009). O presente estudo mostrou associações similares

entre a expressão IHQ e os parâmetros relacionados a RMA, mas não foram avaliados outros tipos de rejeição, como RMCT.

Observou-se que o marcador Vwf apresentou expressão mais difusa quando comparado aos demais utilizados. Vwf é uma glicoproteína plasmática de grandes dimensões produzida por megacariócitos e células endoteliais (GRAGNANO; SPERLONGANO; GOLIA; NATALE *et al.*, 2017). Embora este marcador seja considerado um marcador de ativação/dano endotelial (SIS; JHANGRI; BUNNAG; ALLANACH *et al.*, 2009), há escassos estudos considerando sua aplicabilidade como marcador diagnóstico por meio de plataformas como IHQ. Ozdemir *et al* observaram que a expressão glomerular estava relacionada a rejeição vascular, glomerulosclerose global e infiltração por células histiocitárias em uma amostra de 72 pacientes (OZDEMIR; SAR; HABERAL, 2006) embora este estudo não tenha classificado o tipo de rejeição e não avaliou a marcação para Vwf em capilares peritubulares.

A marcação de proteínas endoteliais como Vwf pode não estar diretamente relacionada a injúria vascular devido a sua tendência de apresentar marcação basal no endotélio renal (SIS; JHANGRI; BUNNAG; ALLANACH *et al.*, 2009). Foram encontradas dificuldades similares neste estudo, devido à expressão frequente de Vwf em casos sem lesões mediadas por anticorpos. No entanto, observou-se que um padrão de expressão difusa (mais de 50% dos capilares peritubulares e *vasa recta*) foi mais comum em casos com MVI significativa, DSA e RMA. Além disso, Vwf foi o biomarcador com diferenças mais significativas, quando comparado a Cad e Cav.

A expressão de Vwf foi similar entre amostras DSA+/MVI-/C4d+ (suspeitos para RMA) e DSA+/MVI+/C4d+ (RMA clássica). A maior parte dos casos DSA+/MVI-/C4d+ apresentavam apenas sinais de injúria tubular aguda ao exame anatomopatológico. Esta alteração, antigamente denominada necrose tubular aguda, não é específica para RMA e representa frequentemente um desafio para o diagnóstico da causa relacionada a disfunção do enxerto. Para o diagnóstico confirmatório de RMA, outras causas devem ser afastadas, como lesão pós-reperusão, toxicidade medicamentosa e eventos hemodinâmicos (LOUPY; HAAS; ROUFOSSE; NAESENS *et al.*, 2020). A expressão difusa de Vwf nestes casos pode ser útil, desta forma, para favorecer o diagnóstico de RMA neste cenário desafiador. Deve-se ainda frisar que uma maior

acurácia pode ser obtida com o emprego simultâneo de dois marcadores, como Vwf e Cad, que, neste estudo, mostraram diferença significativa de expressão quantitativa entre casos de RMA e casos com positividade para C4d sem rejeição.

Foi também observada uma associação entre a expressão de Cad e quadros de lesão mediada por anticorpos. Além disso, este marcador foi o que apresentou maior diferença de expressão entre casos de RMA ativa e crônica. Sabe-se que Cad está envolvida na migração de células endoteliais e células musculares lisas, e sua expressão mostra-se aumentada em locais de injúria vascular crônica (IVANOV; PHILIPPOVA; ANTROPOVA; GUBAEVA *et al.*, 2001; JOSHI; PHILIPPOVA; IVANOV; ALLENSPACH *et al.*, 2005). A RMA crônica também é caracterizada por um remodelamento estrutural da microvasculatura, que pode ser evidenciado por meio de duplicações da membrana basal de capilares glomerulares e multilaminação da membrana basal de capilares peritubulares. Este padrão de rejeição, embora denominado crônico, pode estar presente já nos primeiros meses após o transplante. Sabe-se que amostras com inflamação microvascular mas sem positividade para C4d representam frequentemente um desafio diagnóstico para o patologista de transplantes (HAAS; SIS; RACUSEN; SOLEZ *et al.*, 2014). Além disso, não são incomuns casos de RMA crônica C4d-negativos. Em nosso estudo, Cad foi expressada em 85,3% dos casos de RMA crônica, enquanto a positividade para C4d foi observada em 79,5% destes. Deste modo, a expressão de Cad pode ser útil para o diagnóstico de lesão crônica ao enxerto mediada por anticorpos em casos onde não foi observada positividade C4d.

A avaliação do marcador Cav mostrou expressão em uma menor proporção de casos, quase sempre focal (menos de 10% dos capilares peritubulares e *vasa recta*), porém ainda assim associada com MVI e RMA crônica. Nakada *et al* investigaram a expressão IHQ de Cav em capilares peritubulares e observaram maiores taxas de positividade, bem como associação entre a expressão difusa deste biomarcador e parâmetros morfológicos como fibrose intersticial, glomerulite, pericapilarite, duplicações de alças e MVI (NAKADA; YAMAMOTO; HORITA; KOBAYASHI *et al.*, 2016). Foram incluídos apenas casos de RMA crônica e o tempo médio de transplante (mais de 7 anos) foi significativamente maior que o observado na presente casuística.

Assim, a expressão de Cav pode estar mais relacionada a lesão mediada por anticorpos em enxertos com maior tempo de transplante.

O presente estudo mostrou também que a expressão de Vwf superior a 10% em amostras com FI-AT de etiologia indeterminada esteve associada a menor sobrevida do enxerto em 3 anos. Além disso, amostras com maior expressão deste marcador apresentavam maiores médias do escore Banff de fibrose intersticial.

O diagnóstico de FI-AT não deve ser considerado como uma entidade específica, e sim uma via final comum de lesão para diversos mecanismos de agressão ao enxerto. Sabe-se que a presença de fibrose no enxerto renal carrega importantes implicações para o seguimento do paciente, mas ainda mostra pouca especificidade quanto à definição etiológica. O processo de fibrogênese pode se iniciar nos primeiros meses pós-transplante, mas é frequentemente lento, assintomático e com alterações não específicas e tardias em exames laboratoriais (VAN LOON; BERNARDS; VAN CRAENENBROECK; NAESENS, 2020).

O desenvolvimento e a extensão do dano intersticial crônico representa um importante fator prognóstico, sendo um marcador de perda de néfrons, que leva a uma hiperfiltração compensatória e hipertensão no compartimento glomerular, iniciando processos como apoptose e inflamação, os quais contribuem para o aumento da fibrogênese e promovem um ciclo vicioso associado a deterioração da função renal (AKALIN; O'CONNELL, 2010).

A dificuldade para a determinação das causas de dano crônico ao enxerto persiste como um dos maiores desafios em centros de transplante (DE FIJTER, 2010). Pacientes com disfunções crônicas muitas vezes são biopsiados em poucos momentos, o que contribui para a elevada frequência de diagnósticos pouco específicos (SELLARÉS; DE FREITAS; MENGEL; REEVE *et al.*, 2012). A classificação de Banff, por seu caráter dicotômico e pela pouca ênfase ainda dada a lesões crônicas, dificulta a avaliação e o diagnóstico de processos muitas vezes contínuos, como o caso dos diversos tipos de rejeição cujos critérios morfológicos não consideram aspectos como variações tempo-dependentes em sua progressão (VAN LOON; BERNARDS; VAN CRAENENBROECK; NAESENS, 2020).

Ainda assim, o conceito de que falhas tardias do enxerto ocorrem por mecanismos desconhecidos tem sido crescentemente substituído pelo conceito de que esta condição tem como fundamento um processo não controlado, muitas vezes de etiologia aloimune, o que pode ser corroborado pelo reconhecimento de alterações morfológicas (glomerulopatias do transplante, lesões arteriais, inflamação em áreas de fibrose), ultraestruturais (multilaminação de membrana basal de capilares peritubulares, lesões endoteliais incipientes) e moleculares (pesquisa positiva de ENDATs) (HAAS; LOUPY; LEFAUCHEUR; ROUFOSSE; GLOTZ; SERON; NANKIVELL; HALLORAN; COLVIN; AKALIN; ALACHKAR; BAGNASCO; BOUATOU; BECKER; CORNELL; DUONG VAN HUYEN *et al.*, 2018; HAAS; SIS; RACUSEN; SOLEZ *et al.*, 2014; RACUSEN; REGELE, 2010). Entidades como RMA e RMCT, mesmo que subclínicas, possuem elevado potencial pró-fibrótico, em especial nos casos de tempo de transplante superior a 1 ano. Deve-se ressaltar que estratégias como o uso de marcadores não invasivos e biópsias protocolares têm sido úteis para investigação e diagnóstico precoce de fenótipo distintos de lesão imunológica ao enxerto, diminuindo assim a clássica associação entre falha do enxerto crônica e toxicidade à terapia imunossupressora (HENDERSON; NANKIVELL; CHAPMAN, 2011; NANKIVELL; BORROWS; FUNG; O'CONNELL *et al.*, 2003; RACUSEN; REGELE, 2010). Além disso, outras etiologias devem ser ativamente investigadas e afastadas, como como fibrose proveniente do doador, lesão pós-reperfusão, quadros infecciosos e recidiva de doenças de base (SELLARÉS; DE FREITAS; MENGEL; REEVE *et al.*, 2012).

No entanto, a detecção de mecanismos imunológicos silenciosos antes do comprometimento acentuado da função do enxerto ainda persiste como um dilema para clínicos e patologistas. A informação obtida por meio de biópsias por indicação pode ser tardia e pouco específica para confirmação diagnóstica e decisão terapêutica. A presença de inflamação em biópsias do enxerto, embora mostre relação com quadros de rejeição, nem sempre está associada a este diagnóstico e a menores taxas de sobrevida, uma vez que esta alteração não é específica para o diagnóstico de rejeição e nem todas as células que infiltram o enxerto são necessariamente patogênicas (TSUJI; YANAI; ITAMI; ISHII *et al.*, 2015).

Assim, outros mecanismos de lesão têm sido paralelamente avaliados para o refinamento diagnóstico neste contexto, com especial destaque para o estudo

alterações na homeostasia das células endoteliais. A função endotelial pode ser alterada por diversos mecanismos, como resistência a insulina, aumento da pressão arterial, infecção viral e fenômenos aloimunes. A presença de disfunção endotelial, avaliada indiretamente por métodos não invasivos, mostra associação com pior prognóstico já no primeiro ano pós-transplante, com tendência a menor sobrevida do enxerto (DANE; KHAIRON; LEE; VAN DEN BERG *et al.*, 2014). Esta associação também foi observada em estudos que validaram a pesquisa de ENDATs em biópsias de enxerto renal e que utilizaram a pesquisa de marcadores por IHQ (NAKADA; YAMAMOTO; HORITA; KOBAYASHI *et al.*, 2016; SIS; JHANGRI; BUNNAG; ALLANACH *et al.*, 2009).

Outro aspecto crucial consiste no fato de que recentemente as células endoteliais têm sido reconhecidas não apenas como vítimas, mas também como agentes ativos na fisiopatologia de episódios de rejeição (CROSS; GLOTZ; MOONEY, 2018). A aloestimulação expõe o endotélio a inflamação e ativação do complemento, contribuindo assim para a ativação destas células (LOUPY; LEFAUCHEUR, 2018). Células endoteliais ativadas induzem a proliferação de linfócitos T CD4+, estimulam respostas mediadas por linfócitos T CD8+ e recrutam ativamente monócitos e células NK. A expressão de moléculas de HLA-DQ na superfície do endotélio está constantemente aumentada no pós-transplante renal, mesmo em enxertos estáveis, o que pode contribuir para um estado persistente de lesão ao enxerto mesmo na vigência de imunossupressão, não detectável ao exame histopatológico (HUBSCHER; ADAMS; ELIAS, 1990). Deste modo, a presença de sinais de ativação da célula endotelial em espécimes anatomopatológicos pode indicar uma maior associação a episódios prévios ou futuros de RMA, mesmo sem outros achados sugestivos desta entidade.

O presente estudo evidenciou que a expressão aumentada do marcador Vwf, mesmo quando não associado a outros parâmetros de injúria microvascular, mostrou relação com menor sobrevida do enxerto em 3 anos. Deve ser ressaltado que estas biópsias apresentavam um estado avançado de fibrogênese, dificultando a definição mais precisa do agente etiológico associado à disfunção crônica. A imunoexpressão observada pode ter associação com episódios prévios de RMA, muitas vezes já resolvidos no momento da biópsia. A negatividade para C4d nestes espécimes

poderia ter relação com o fato de que baixos níveis de ativação do complemento não são usualmente detectáveis por métodos como IHQ e IF (RACUSEN; REGELE, 2010).

Além disso, a presença de Vwf em amostras sem DSA patogênicos ou C4d pode indicar a necessidade de um rastreio criterioso para mecanismos de lesão aloimune ao enxerto, devendo ser investigados mais ativamente aspectos como diagnósticos prévios de rejeição, documentação de DSA's patogênicos, histórico de má aderência ao tratamento imunossupressor e investigação de anticorpos não anti-HLA. A utilização de protocolos específicos pode aumentar substancialmente a associação entre mecanismos imunológicos e falha do enxerto, e a IHQ para Vwf pode ser útil nesta etapa. Sabe-se que lesões capilares progressivas podem ainda ser detectadas por métodos como microscopia eletrônica (HAAS; SIS; RACUSEN; SOLEZ *et al.*, 2014), porém deve ser considerado o fato de este método ainda ser pouco disponíveis em centros brasileiros de transplante e as alterações não serem completamente específicas.

A positividade difusa para marcadores como Vwf poderá ser útil ainda para indicar possíveis alvos terapêuticos. O tratamento com tacrolimo em um modelo *in vitro* mostrou redução da produção e secreção de Vwf após sua estimulação por anticorpos anti-HLA em culturas celulares, diminuindo a adesão plaquetária em células endoteliais aloestimuladas. Estes resultados indicam que a alteração de mecanismos relacionados à hemostasia podem representar um mecanismo potencial de lesão associada ao enxerto (BÉLAND; DÉSY; UNG; VALLIN *et al.*, 2018; BÖHMIG; ESKANDARY; DOBERER; HALLORAN, 2019) . O aprimoramento de terapias para a regulação da hemostasia microvascular pode ser benéfico para a prevenção de lesões microangiopáticas relacionadas à RMA. Embora a RMA crônica tenha sido cada vez mais reconhecida como uma das principais causas de disfunção crônica do enxerto, e se manifeste como um processo contínuo e silencioso, ainda não há opções terapêuticas específicas para este subtipo. A positividade para marcadores como Vwf mesmo em espécimes onde não há outras alterações sugestivas indica a necessidade de que a ativação endotelial também seja considerada um potencial alvo terapêutico.

Esta pesquisa possui limitações que devem ser consideradas, como o fato de a expressão IHQ não ter sido correlacionada com a expressão molecular destes

marcadores nas amostras avaliadas. Além disso, não foram avaliadas outras classes diagnósticas de Banff e outros subtipos de rejeição, houve uma pequena quantidade de casos de RMA C4d-negativos e um número reduzido de casos avaliado no estudo de coorte.

Como pontos fortes, destaca-se o achado de que marcadores de lesão endotelial também podem ser avaliados por IHQ, um método mais difundido, de menor custo, mais padronizado e acessível ao médico patologista, contribuindo para uma análise mais aprofundada de mecanismos de lesão ao enxerto mesmo em amostras com achados pouco específicos. Os autores encorajam o desenvolvimento de novos estudos com coortes confirmatórias que possibilitem correlacionar padrões de expressão por diversos métodos com alterações histopatológicas e a evolução do enxerto.

9 CONCLUSÃO

- A expressão de IHQ de Vwf, Cad e Cav mostrou associação com parâmetros de inflamação microvascular, C4d e diagnóstico final de RMA em biópsias de enxerto renal
- Houve maior expressão de Cad e Cav em casos de RMA crônica quando comparados a quadros agudos/ativos.
- Vwf e Cad, quando avaliados conjuntamente, mostraram maiores escores de expressão em casos de RMA quando comparados aos de positividade para C4d sem sinais de rejeição.
- A expressão aumentada de Vwf em biópsias com fibrose intersticial de etiologia indeterminada mostrou associação com maior risco de perda do enxerto.

REFERÊNCIAS

- AKALIN, E.; O'CONNELL, P. J. Genomics of chronic allograft injury. **Kidney Int Suppl**, n. 119, p. S33-37, Dec 2010.
- ALLISON, S. J. Transplantation: the role of platelets in antibody-mediated rejection. **Nat Rev Nephrol**, 10, n. 11, p. 614, Nov 2014.
- AUBERT, O.; LOUPY, A.; HIDALGO, L.; DUONG VAN HUYEN, J. P. *et al.* Antibody-Mediated Rejection Due to Preexisting versus. **J Am Soc Nephrol**, 28, n. 6, p. 1912-1923, Jun 2017.
- BALDWIN, W. M.; KASPER, E. K.; ZACHARY, A. A.; WASOWSKA, B. A. *et al.* Beyond C4d: other complement-related diagnostic approaches to antibody-mediated rejection. **Am J Transplant**, 4, n. 3, p. 311-318, Mar 2004.
- BANASIK, M.; BORATYŃSKA, M.; KOŚCIELSKA-KASPRZAK, K.; MAZANOWSKA, O. *et al.* Long-term follow-up of non-HLA and anti-HLA antibodies: incidence and importance in renal transplantation. **Transplant Proc**, 45, n. 4, p. 1462-1465, May 2013.
- BATAL, I.; GIRNITA, A.; ZEEVI, A.; SAAB, B. A. *et al.* Clinical significance of the distribution of C4d deposits in different anatomic compartments of the allograft kidney. **Mod Pathol**, 21, n. 12, p. 1490-1498, Dec 2008.
- BHOWMIK, D. M.; DINDA, A. K.; MAHANTA, P.; AGARWAL, S. K. The evolution of the Banff classification schema for diagnosing renal allograft rejection and its implications for clinicians. **Indian J Nephrol**, 20, n. 1, p. 2-8, Jan 2010.
- BLUME, O. R.; YOST, S. E.; KAPLAN, B. Antibody-mediated rejection: pathogenesis, prevention, treatment, and outcomes. **J Transplant**, 2012, p. 201754, 2012.
- BÉLAND, S.; DÉSY, O.; UNG, R. V.; VALLIN, P. *et al.* Tacrolimus prevents von Willebrand factor secretion by allostimulated human glomerular endothelium. **Am J Transplant**, 18, n. 9, p. 2314-2321, 09 2018.
- BÖHMIG, G. A.; ESKANDARY, F.; DOBERER, K.; HALLORAN, P. F. The therapeutic challenge of late antibody-mediated kidney allograft rejection. **Transpl Int**, 32, n. 8, p. 775-788, Aug 2019.
- CARDINAL, H.; DIEUDÉ, M.; HÉBERT, M. J. The Emerging Importance of Non-HLA Autoantibodies in Kidney Transplant Complications. **J Am Soc Nephrol**, 28, n. 2, p. 400-406, Feb 2017.

CHAND, S.; EDWARDS, N. C.; CHUE, C. D.; JESKY, M. *et al.* Caveolin-1 single-nucleotide polymorphism and arterial stiffness in non-dialysis chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant**, 31, n. 7, p. 1140-1144, 07 2016.

COHEN, D.; COLVIN, R. B.; DAHA, M. R.; DRACHENBERG, C. B. *et al.* Pros and cons for C4d as a biomarker. **Kidney Int**, 81, n. 7, p. 628-639, Apr 2012.

COLLOT-TEIXEIRA, S.; MCGREGOR, J. L.; MORSER, K.; CHALABREYSSE, L. *et al.* T-cadherin expression in cardiac allograft vasculopathy: bench to bedside translational investigation. **J Heart Lung Transplant**, 29, n. 7, p. 792-799, Jul 2010.

COSIO, F. G.; GRANDE, J. P.; LARSON, T. S.; GLOOR, J. M. *et al.* Kidney allograft fibrosis and atrophy early after living donor transplantation. **Am J Transplant**, 5, n. 5, p. 1130-1136, May 2005.

CROSS, A. R.; GLOTZ, D.; MOONEY, N. The Role of the Endothelium during Antibody-Mediated Rejection: From Victim to Accomplice. **Front Immunol**, 9, p. 106, 2018.

DANE, M. J.; KHAIROUN, M.; LEE, D. H.; VAN DEN BERG, B. M. *et al.* Association of kidney function with changes in the endothelial surface layer. **Clin J Am Soc Nephrol**, 9, n. 4, p. 698-704, Apr 2014.

DE FIJTER, J. W. Rejection and function and chronic allograft dysfunction. **Kidney Int Suppl**, n. 119, p. S38-41, Dec 2010.

DE SERRES, S. A.; NOËL, R.; CÔTÉ, I.; LAPOINTE, I. *et al.* 2013 Banff Criteria for Chronic Active Antibody-Mediated Rejection: Assessment in a Real-Life Setting. **Am J Transplant**, 16, n. 5, p. 1516-1525, 05 2016.

DOMINY, K. M.; WILLICOMBE, M.; AL JOHANI, T.; BECKWITH, H. *et al.* Molecular Assessment of C4d-Positive Renal Transplant Biopsies Without Evidence of Rejection. **Kidney Int Rep**, 4, n. 1, p. 148-158, Jan 2019.

DRAGUN, D.; CATAR, R.; PHILIPPE, A. Non-HLA antibodies in solid organ transplantation: recent concepts and clinical relevance. **Curr Opin Organ Transplant**, 18, n. 4, p. 430-435, Aug 2013.

DRAGUN, D.; MÜLLER, D. N.; BRÄSEN, J. H.; FRITSCHKE, L. *et al.* Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. **N Engl J Med**, 352, n. 6, p. 558-569, Feb 2005.

FAMULSKI, K. S.; EINECKE, G.; REEVE, J.; RAMASSAR, V. *et al.* Changes in the transcriptome in allograft rejection: IFN-gamma-induced transcripts in mouse kidney allografts. **Am J Transplant**, 6, n. 6, p. 1342-1354, Jun 2006.

FARRIS, A. B.; CHAN, S.; CLIMENHAGA, J.; ADAM, B. *et al.* Banff fibrosis study: multicenter visual assessment and computerized analysis of interstitial fibrosis in kidney biopsies. **Am J Transplant**, 14, n. 4, p. 897-907, Apr 2014.

FRANK, P. G.; WOODMAN, S. E.; PARK, D. S.; LISANTI, M. P. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 23, n. 7, p. 1161-1168, Jul 2003.

GRAGNANO, F.; SPERLONGANO, S.; GOLIA, E.; NATALE, F. *et al.* The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation: From Pathogenesis to Targeted Therapy. **Mediators Inflamm**, 2017, p. 5620314, 2017.

GUPTA, A.; BROIN, P.; BAO, Y.; PULLMAN, J. *et al.* Clinical and molecular significance of microvascular inflammation in transplant kidney biopsies. **Kidney Int**, 89, n. 1, p. 217-225, Jan 2016.

HAAS, M. An updated Banff schema for diagnosis of antibody-mediated rejection in renal allografts. **Curr Opin Organ Transplant**, 19, n. 3, p. 315-322, Jun 2014.

HAAS, M. Evolving criteria for the diagnosis of antibody-mediated rejection in renal allografts. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, 27, n. 3, p. 137-143, May 2018.

HAAS, M.; LOUPY, A.; LEFAUCHEUR, C.; ROUFOSSE, C. *et al.* The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. **Am J Transplant**, 18, n. 2, p. 293-307, 02 2018.

HAAS, M.; LOUPY, A.; LEFAUCHEUR, C.; ROUFOSSE, C. *et al.* The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. **Am J Transplant**, 18, n. 2, p. 293-307, 02 2018.

HAAS, M.; SIS, B.; RACUSEN, L. C.; SOLEZ, K. *et al.* Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. **Am J Transplant**, 14, n. 2, p. 272-283, Feb 2014.

HALLORAN, P. F.; FAMULSKI, K. S.; REEVE, J. Molecular assessment of disease states in kidney transplant biopsy samples. **Nat Rev Nephrol**, 12, n. 9, p. 534-548, 09 2016.

HALLORAN, P. F.; VENNER, J. M.; MADILL-THOMSEN, K. S.; EINECKE, G. *et al.* Review: The transcripts associated with organ allograft rejection. **Am J Transplant**, 18, n. 4, p. 785-795, 04 2018.

HAYDE, N.; BAO, Y.; PULLMAN, J.; YE, B. *et al.* The clinical and molecular significance of C4d staining patterns in renal allografts. **Transplantation**, 95, n. 4, p. 580-588, Feb 2013.

HAYDE, N.; BAO, Y.; PULLMAN, J.; YE, B. *et al.* The clinical and genomic significance of donor-specific antibody-positive/C4d-negative and donor-specific antibody-negative/C4d-negative transplant glomerulopathy. **Clin J Am Soc Nephrol**, 8, n. 12, p. 2141-2148, Dec 2013.

HAYDE, N.; BROIN, P.; BAO, Y.; DE BOCCARDO, G. *et al.* Increased intragraft rejection-associated gene transcripts in patients with donor-specific antibodies and normal biopsies. **Kidney Int**, 86, n. 3, p. 600-609, Sep 2014.

HEBBARD, L. W.; GARLATTI, M.; YOUNG, L. J.; CARDIFF, R. D. *et al.* T-cadherin supports angiogenesis and adiponectin association with the vasculature in a mouse mammary tumor model. **Cancer Res**, 68, n. 5, p. 1407-1416, Mar 2008.

HENDERSON, L. K.; NANKIVELL, B. J.; CHAPMAN, J. R. Surveillance protocol kidney transplant biopsies: their evolving role in clinical practice. **Am J Transplant**, 11, n. 8, p. 1570-1575, Aug 2011.

HERMANT, B.; BIBERT, S.; CONCORD, E.; DUBLET, B. *et al.* Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. **J Biol Chem**, 278, n. 16, p. 14002-14012, Apr 2003.

HIDALGO, L. G.; SELLALES, J.; SIS, B.; MENGEL, M. *et al.* Interpreting NK cell transcripts versus T cell transcripts in renal transplant biopsies. **Am J Transplant**, 12, n. 5, p. 1180-1191, May 2012.

HUBSCHER, S. G.; ADAMS, D. H.; ELIAS, E. Changes in the expression of major histocompatibility complex class II antigens in liver allograft rejection. **J Pathol**, 162, n. 2, p. 165-171, Oct 1990.

IVANOV, D.; PHILIPPOVA, M.; ANTROPOVA, J.; GUBAEVA, F. *et al.* Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature. **Histochem Cell Biol**, 115, n. 3, p. 231-242, Mar 2001.

JEONG, H. J. Diagnosis of renal transplant rejection: Banff classification and beyond. **Kidney Res Clin Pract**, 39, n. 1, p. 17-31, Mar 2020.

JOSHI, M. B.; PHILIPPOVA, M.; IVANOV, D.; ALLENSPACH, R. *et al.* T-cadherin protects endothelial cells from oxidative stress-induced apoptosis. **FASEB J**, 19, n. 12, p. 1737-1739, Oct 2005.

KENTA, I.; TAKAOKI, K. Molecular Mechanisms of Antibody-Mediated Rejection and Accommodation in Organ Transplantation. **Nephron**, 144 Suppl 1, p. 2-6, 2020.

KIKIĆ, Ž.; KAINZ, A.; KOZAKOWSKI, N.; OBERBAUER, R. *et al.* Capillary C4d and Kidney Allograft Outcome in Relation to Morphologic Lesions Suggestive of Antibody-Mediated Rejection. **Clin J Am Soc Nephrol**, 10, n. 8, p. 1435-1443, Aug 2015.

KITA, S.; MAEDA, N.; SHIMOMURA, I. Interorgan communication by exosomes, adipose tissue, and adiponectin in metabolic syndrome. **J Clin Invest**, 129, n. 10, p. 4041-4049, 10 2019.

LOUPY, A.; HAAS, M.; ROUFOSSE, C.; NAESENS, M. *et al.* The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. **Am J Transplant**, 20, n. 9, p. 2318-2331, 09 2020.

LOUPY, A.; HAAS, M.; SOLEZ, K.; RACUSEN, L. *et al.* The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. **Am J Transplant**, 17, n. 1, p. 28-41, 01 2017.

LOUPY, A.; LEFAUCHEUR, C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. **N Engl J Med**, 379, n. 12, p. 1150-1160, 09 2018.

LOUPY, A.; LEFAUCHEUR, C.; VERNEREY, D.; CHANG, J. *et al.* Molecular microscope strategy to improve risk stratification in early antibody-mediated kidney allograft rejection. **J Am Soc Nephrol**, 25, n. 10, p. 2267-2277, Oct 2014.

MANNUCCI, P. M. Treatment of von Willebrand's Disease. **N Engl J Med**, 351, n. 7, p. 683-694, Aug 2004.

MARTINS, S. R.; ALVES, L. V.; CARDOSO, C. N.; SILVA, L. G. *et al.* Cell-derived microparticles and von Willebrand factor in Brazilian renal transplant recipients. **Nephrology (Carlton)**, 24, n. 12, p. 1304-1312, Dec 2019.

MCCAUGHAN, J. A.; TINCKAM, K. J. Donor specific HLA antibodies & allograft injury: mechanisms, methods of detection, manifestations and management. **Transpl Int**, 31, n. 10, p. 1059-1070, 10 2018.

MOORE, J.; MCKNIGHT, A. J.; SIMMONDS, M. J.; COURTNEY, A. E. *et al.* Association of caveolin-1 gene polymorphism with kidney transplant fibrosis and allograft failure. **JAMA**, 303, n. 13, p. 1282-1287, Apr 2010.

MOROZUMI, K.; TAKEDA, A.; OTSUKA, Y.; HORIKE, K. *et al.* Reviewing the pathogenesis of antibody-mediated rejection and renal graft pathology after kidney transplantation. **Nephrology (Carlton)**, 21 Suppl 1, p. 4-8, Jul 2016.

MUELLER, T. F.; EINECKE, G.; REEVE, J.; SIS, B. *et al.* Microarray analysis of rejection in human kidney transplants using pathogenesis-based transcript sets. **Am J Transplant**, 7, n. 12, p. 2712-2722, Dec 2007.

NAKADA, Y.; YAMAMOTO, I.; HORITA, S.; KOBAYASHI, A. *et al.* The prognostic values of caveolin-1 immunoreactivity in peritubular capillaries in patients with kidney transplantation. **Clin Transplant**, 30, n. 11, p. 1417-1424, 11 2016.

NANKIVELL, B. J.; BORROWS, R. J.; FUNG, C. L.; O'CONNELL, P. J. *et al.* The natural history of chronic allograft nephropathy. **N Engl J Med**, 349, n. 24, p. 2326-2333, Dec 2003.

OZDEMIR, B. H.; SAR, A.; HABERAL, M. The importance of glomerular deposits of von Willebrand factor in human renal allografts. **Ren Fail**, 28, n. 4, p. 315-321, 2006.

POULIQUEN, E.; KOENIG, A.; CHEN, C. C.; SICARD, A. *et al.* Recent advances in renal transplantation: antibody-mediated rejection takes center stage. **F1000Prime Rep**, 7, p. 51, 2015.

PUTTARAJAPPA, C.; SHAPIRO, R.; TAN, H. P. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review. **J Transplant**, 2012, p. 193724, 2012.

QUAGLIA, A.; JUTAND, M. A.; DHILLON, A.; GODFREY, A. *et al.* Classification tool for the systematic histological assessment of hepatocellular carcinoma, macroregenerative nodules, and dysplastic nodules in cirrhotic liver. **World J Gastroenterol**, 11, n. 40, p. 6262-6268, Oct 2005.

QUAGLIA, M.; MERLOTTI, G.; GUGLIELMETTI, G.; CASTELLANO, G. *et al.* Recent Advances on Biomarkers of Early and Late Kidney Graft Dysfunction. **Int J Mol Sci**, 21, n. 15, Jul 2020.

RACUSEN, L. C.; HALLORAN, P. F.; SOLEZ, K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. **Am J Transplant**, 4, n. 10, p. 1562-1566, Oct 2004.

RACUSEN, L. C.; REGELE, H. The pathology of chronic allograft dysfunction. **Kidney Int Suppl**, n. 119, p. S27-32, Dec 2010.

RACUSEN, L. C.; SOLEZ, K.; COLVIN, R. B.; BONSI, S. M. *et al.* The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. **Kidney Int**, 55, n. 2, p. 713-723, Feb 1999.

RESINK, T. J.; PHILIPPOVA, M.; JOSHI, M. B.; KYRIAKAKIS, E. *et al.* Cadherins and cardiovascular disease. **Swiss Med Wkly**, 139, n. 9-10, p. 122-134, Mar 2009.

RIELLA, L. V.; DJAMALI, A.; PASCUAL, J. Chronic allograft injury: Mechanisms and potential treatment targets. **Transplant Rev (Orlando)**, 31, n. 1, p. 1-9, 01 2017.

ROUFOSSE, C.; SIMMONDS, N.; CLAHSSEN-VAN GRONINGEN, M.; HAAS, M. *et al.* A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. **Transplantation**, 102, n. 11, p. 1795-1814, 11 2018.

SAPIR-PICHHADZE, R.; CURRAN, S. P.; JOHN, R.; TRICCO, A. C. *et al.* A systematic review of the role of C4d in the diagnosis of acute antibody-mediated rejection. **Kidney Int**, 87, n. 1, p. 182-194, Jan 2015.

SELLARÉS, J.; DE FREITAS, D. G.; MENGEL, M.; REEVE, J. *et al.* Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. **Am J Transplant**, 12, n. 2, p. 388-399, Feb 2012.

SELLARÉS, J.; REEVE, J.; LOUPY, A.; MENGEL, M. *et al.* Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. **Am J Transplant**, 13, n. 4, p. 971-983, Apr 2013.

SERVAIS, A.; MEAS-YEDID, V.; NOËL, L. H.; MARTINEZ, F. *et al.* Interstitial fibrosis evolution on early sequential screening renal allograft biopsies using quantitative image analysis. **Am J Transplant**, 11, n. 7, p. 1456-1463, Jul 2011.

SHIHATA, W. A.; MICHELL, D. L.; ANDREWS, K. L.; CHIN-DUSTING, J. P. Caveolae: A Role in Endothelial Inflammation and Mechanotransduction? **Front Physiol**, 7, p. 628, 2016.

SIS, B. Endothelial molecules decipher the mechanisms and functional pathways in antibody-mediated rejection. **Hum Immunol**, 73, n. 12, p. 1218-1225, Dec 2012.

SIS, B.; CAMPBELL, P. M.; MUELLER, T.; HUNTER, C. *et al.* Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. **Am J Transplant**, 7, n. 7, p. 1743-1752, Jul 2007.

SIS, B.; HALLORAN, P. F. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. **Curr Opin Organ Transplant**, 15, n. 1, p. 42-48, Feb 2010.

SIS, B.; JHANGRI, G. S.; BUNNAG, S.; ALLANACH, K. *et al.* Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. **Am J Transplant**, 9, n. 10, p. 2312-2323, Oct 2009.

SIS, B.; JHANGRI, G. S.; RIOPEL, J.; CHANG, J. *et al.* A new diagnostic algorithm for antibody-mediated microcirculation inflammation in kidney transplants. **Am J Transplant**, 12, n. 5, p. 1168-1179, May 2012.

SOLEZ, K.; AXELSEN, R. A.; BENEDIKTSSON, H.; BURDICK, J. F. *et al.* International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. **Kidney Int**, 44, n. 2, p. 411-422, Aug 1993.

SOLEZ, K.; BENEDIKTSSON, H.; CAVALLO, T.; CROKER, B. *et al.* Report of the Third Banff Conference on Allograft Pathology (July 20-24, 1995) on classification and lesion scoring in renal allograft pathology. **Transplant Proc**, 28, n. 1, p. 441-444, Feb 1996.

SOLEZ, K.; COLVIN, R. B.; RACUSEN, L. C.; HAAS, M. *et al.* Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. **Am J Transplant**, 8, n. 4, p. 753-760, Apr 2008.

SOLEZ, K.; COLVIN, R. B.; RACUSEN, L. C.; SIS, B. *et al.* Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). **Am J Transplant**, 7, n. 3, p. 518-526, Mar 2007.

STITES, E.; LE QUINTREC, M.; THURMAN, J. M. The Complement System and Antibody-Mediated Transplant Rejection. **J Immunol**, 195, n. 12, p. 5525-5531, Dec 2015.

SUTHANTHIRAN, M. Acute rejection of renal allografts: mechanistic insights and therapeutic options. **Kidney Int**, 51, n. 4, p. 1289-1304, Apr 1997.

SÜSAL, C.; ROELEN, D. L.; FISCHER, G.; CAMPOS, E. F. *et al.* Algorithms for the determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients. **Tissue Antigens**, 82, n. 2, p. 83-92, Aug 2013.

TSUJI, T.; YANAI, M.; ITAMI, H.; ISHII, Y. *et al.* Microvascular inflammation in early protocol biopsies of renal allografts in cases of chronic active antibody-mediated rejection. **Nephrology (Carlton)**, 20 Suppl 2, p. 26-30, Jul 2015.

VALENZUELA, N. M.; REED, E. F. Antibodies in transplantation: the effects of HLA and non-HLA antibody binding and mechanisms of injury. **Methods Mol Biol**, 1034, p. 41-70, 2013.

VALENZUELA, N. M.; REED, E. F. Antibody-mediated rejection across solid organ transplants: manifestations, mechanisms, and therapies. **J Clin Invest**, 127, n. 7, p. 2492-2504, Jun 2017.

VAN DER HAUWAERT, C.; SAVARY, G.; PINÇON, C.; GNEMMI, V. *et al.* Donor caveolin 1 (CAV1) genetic polymorphism influences graft function after renal transplantation. **Fibrogenesis Tissue Repair**, 8, p. 8, 2015.

VAN LOON, E.; BERNARDS, J.; VAN CRAENENBROECK, A. H.; NAESENS, M. The Causes of Kidney Allograft Failure: More Than Alloimmunity. A Viewpoint Article. **Transplantation**, 104, n. 2, p. e46-e56, 02 2020.

VANHOVE, T.; GOLDSCHMEDING, R.; KUYPERS, D. Kidney Fibrosis: Origins and Interventions. **Transplantation**, 101, n. 4, p. 713-726, Apr 2017.

WOLFE, R. A.; ASHBY, V. B.; MILFORD, E. L.; OJO, A. O. *et al.* Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. **N Engl J Med**, 341, n. 23, p. 1725-1730, Dec 1999.

WOOD, K. J.; GOTO, R. Mechanisms of rejection: current perspectives. **Transplantation**, 93, n. 1, p. 1-10, Jan 2012.

YAMAMOTO, I.; HORITA, S.; TAKAHASHI, T.; KOBAYASHI, A. *et al.* Caveolin-1 expression is a distinct feature of chronic rejection-induced transplant capillaropathy. **Am J Transplant**, 8, n. 12, p. 2627-2635, Dec 2008.

ZBROCH, E.; MAŁYSZKO, J.; KOC-ŻÓRAWSKA, E.; MYŚLIWIEC, M. Renalase, kidney function, and markers of endothelial dysfunction in renal transplant recipients. **Pol Arch Med Wewn**, 122, n. 1-2, p. 40-44, 2012.

APÊNDICE A – PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DA CLASSIFICAÇÃO DE BANFF

- **Glomerulite:** oclusão parcial ou completa de um ou mais capilar glomerular por infiltração leucocitária (mononucleares ou polimorfonucleares) e tumefação das células endoteliais. O denominador nesta proporção consistiu no número de glomérulos não esclerosados presentes na biópsia.

- g0: alterações ausentes.

- g1: glomerulite global ou segmentar em menos de 25% dos glomérulos.

- g2: glomerulite global ou segmentar em 25 a 75% dos glomérulos.

- g3: glomerulite em mais de 75% dos glomérulos.

- **Pericapilarite:** infiltração leucocitária em ao menos 10% dos capilares peritubulares, habitualmente associada a dilatação destes vasos e tumefação (alterações reativas) em células endoteliais. A extensão desta alteração na biópsia deve ser informada, mas a gradação será baseada no capilar peritubular mais afetado, ou seja, com maior número de células inflamatórias. Áreas afetadas por pielonefrite, necrose ou córtex subcapsular devem ser desconsiderados.

- ptc0: máximo número de leucócitos menor que 3.

- ptc1: pelo menos 1 leucócito em $\geq 10\%$ dos capilares peritubulares corticais, com 3 a 4 leucócitos no capilar mais comprometido.

- ptc2: pelo menos 1 leucócito em $\geq 10\%$ dos capilares peritubulares corticais, com 5 a 10 leucócitos no capilar mais comprometido.

- ptc3: pelo menos de 1 leucócito em $\geq 10\%$ dos capilares peritubulares corticais, com mais de 10 leucócitos no capilar mais comprometido.

- **Arterite:** presença de células inflamatórias, principalmente linfócitos e monócitos, no espaço subendotelial de uma ou mais artérias. Artérias são definidas como vasos com ao menos duas camadas de células musculares na camada média.

- v0: ausência de arterite.

- v1: arterite leve a moderada em ao menos uma secção transversal de vaso.

- v2: arterite intimal grave, com perda de pelo menos de 25% da área luminal em uma secção transversal de vaso.

- v3: arterite transmural e/ou necrose fibrinoide associadas a necrose de células musculares com infiltrado linfocítico.

- **Glomerulopatia do transplante:** duplos contornos ou multilaminação da membrana basal no glomérulo mais afetado. Este escore deve ser estabelecido com base na análise das colorações de PAS e Prata Jones.

- cg0: ausência de duplicações da membrana basal glomerular (MBG).

- cg1a: ausência de duplicações da MBG à MO, presença de duplicações de MBG (incompleta ou circunferencial) em ao menos três capilares glomerulares observadas em microscopia eletrônica (ME), associadas a tumefação endotelial e alargamento do espaço subendotelial.

- cg1b: duplicação de MBG em 1 a 25% das alças glomerulares no glomérulo não esclerosado mais afetado à MO, sendo recomendada confirmação por ME.

- cg2: duplicação de MBG afetando 26 a 50% de alças capilares periféricas no glomérulo mais afetado.
- cg3: duplicação de MBG afetando mais de 50% de alças capilares periféricas no glomérulo mais afetado.
- **Fibrose arterial intimal *de novo***: espessamento fibroso *de novo* da íntima de artérias amostradas (Figura 20).
- cv0: ausência de alterações vasculares crônicas.
- cv1: estreitamento da área luminal em mais de 25% por espessamento fibroso intimal.
- cv1: estreitamento da área luminal em 26 a 50% por espessamento fibroso intimal.
- cv3: estreitamento da área luminal em mais de 50% por espessamento fibroso intimal.

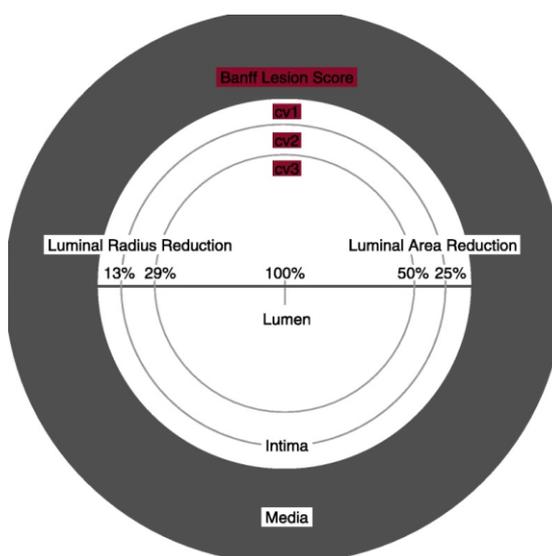


Figura 25. Esquema visual para definição da porcentagem de estreitamento da área luminal.

Fonte: Roufosse et al, Transplantation, 2018 (ROUFOSSE; SIMMONDS; CLAHSSENVAN GRONINGEN; HAAS *et al.*, 2018).

- **Positividade para C4d:** este escore avalia a extensão da marcação para C4d em células endoteliais de capilares peritubulares ou *vasa recta* por meio de IHQ de material fixado em formalina e emblocado em parafina. Deste modo, determina-se a porcentagem de capilares peritubulares e *vasa recta* com marcação linear e circunferencial. A amostra mínima para avaliação consiste em 5 campos microscópicos de grande aumento em córtex ou medula, devendo ser evitadas áreas de infarto.

- c4d0: ausência de marcação em capilares peritubulares e *vasa recta* medulares (0%).

- c4d1: marcação mínima (> 0% e < 10% em capilares e *vasa recta* medulares).

- c4d2: marcação focal (10-50% de capilares e *vasa recta*).

- c4d3: marcação difusa (> 50% em capilares e *vasa recta*).

- **Índice de injúria microvascular (MVI):** o índice de injúria microvascular é calculado com base na soma dos escores *g* e *ptc* da classificação de Banff. Valores iguais ou maiores que 2 são considerados fortes indicativos de lesão mediada por anticorpos (GUPTA; BROIN; BAO; PULLMAN *et al.*, 2016).

- **Fibrose intersticial:** este escore avalia a extensão da fibrose no compartimento cortical, ou seja, a semiquantificação do percentual da área cortical comprometida por tecido fibroconjuntivo (Figura 21).

- ci0: fibrose intersticial em mais de 5% da área cortical.

- ci1: fibrose intersticial em 6 a 25% da área cortical (fibrose leve).
- ci2: fibrose intersticial em 26 a 50% da área cortical (fibrose intersticial moderada).
- ci3: fibrose intersticial em mais de 50% da área cortical (fibrose acentuada).

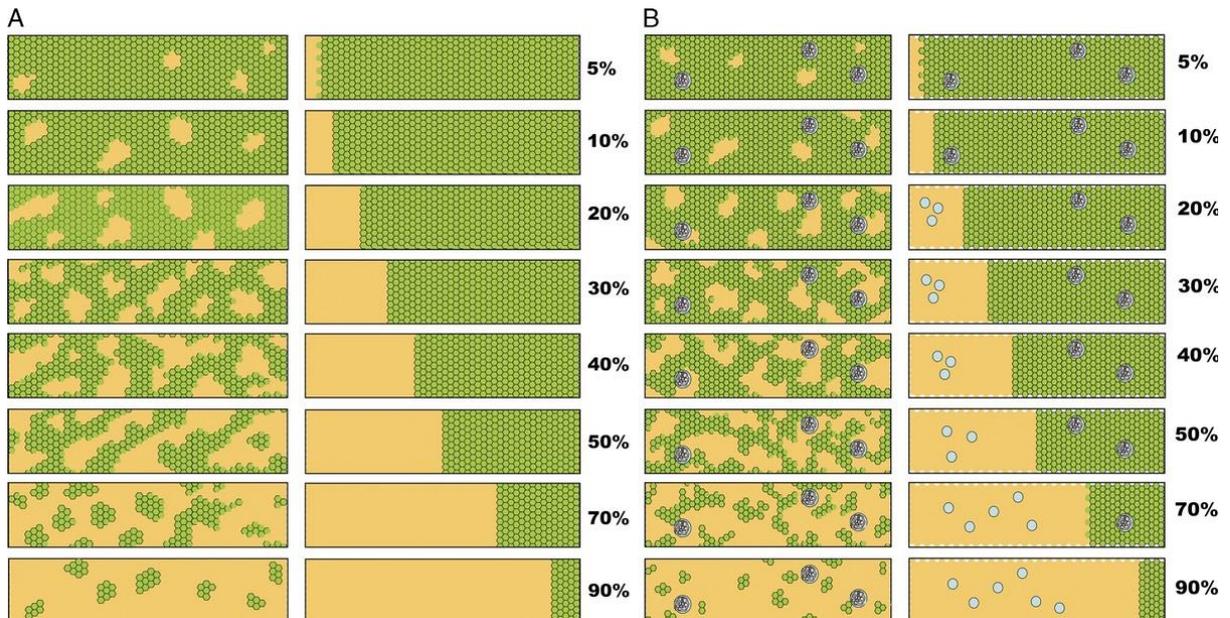


Figura 26. Escala visual para determinação da porcentagem de fibrose intersticial no córtex. A: escala para determinação de fibrose focal (esquerda) e confluyente (direita) sem glomérulos. B: escala para fibrose focal (esquerda) e confluyente (direita) com glomérulos na amostra

Fonte: Farris et al. Am J Transplant, 2014(FARRIS; CHAN; CLIMENHAGA; ADAM *et al.*, 2014).

- **Atrofia tubular:** extensão de atrofia tubular cortical, habitualmente associada a fibrose intersticial. São considerados atróficos os túbulos com membrana basal espessada ou com uma redução em mais de 50% de seu diâmetro (SOLEZ; BENEDIKTSSON; CAVALLO; CROKER *et al.*, 1996).

- ct0: atrofia tubular ausente

- ct1: atrofia tubular envolvendo mais de 25% da área dos túbulos corticais.
- ct2: atrofia tubular envolvendo de 26 a 50% da área dos túbulos corticais.
- ct3 atrofia tubular envolvendo mais de 50% da área dos túbulos corticais

Para o diagnóstico de RMA, utilizou-se a classificação de Banff atualizada (HAAS, 2014; LOUPY; HAAS; ROUFOSSE; NAESENS *et al.*, 2020), cujos critérios encontram-se explicitados a seguir:

Quadro 1: Critérios diagnósticos para RMA segundo a classificação de Banff.

	Histopatologia	Anticorpo/endotélio	DSA	Observações
RMA ativa	<ul style="list-style-type: none"> - Inflamação microvascular (g > 0 e/ou ptc > 0) - Arterite intimal ou transmural (v > 0) - Microangiopatia trombótica (MAT), na ausência de outra causa - Necrose tubular aguda, na ausência de outra causa aparente 	<ul style="list-style-type: none"> - Marcação linear para C4d em capilares peritubulares ou <i>vasa recta</i> medulares (C4d2 ou C4d3 em IF ou C4d > 0 em IHQ) - Escore de injúria microvascular (MVI) ≥ 2, na ausência de glomerulonefrite recorrente ou <i>de novo</i>. Na presença de RMCT aguda, infiltrado borderline ou infecção, a presença de ptc isolada não é suficiente e g deve ser > 1. - Aumento da expressão de produtos de transcrição associados a RMA em material de biópsia. 	Evidência sorológica de DSA (anti-HLA ou outros antígenos)	A positividade para C4d ou expressão molecular de marcadores validados podem substituir a presença de DSA
RMA crônica ativa	- Glomerulopatia do transplante (cg > 0), sem evidências de MAT crônica, ou Glomerulonefrite recorrente/de novo. Pode ser utilizada microscopia eletrônica (ME) (cg1a).	Idem RMA ativa	Idem RMA ativa. Considerar evidência recente ou pregressa de DSA <i>de novo</i> .	

	<p>- Multilaminação da membrana basal de capilares peritubulares à ME (ptcml1).</p> <p>- Fibrose arterial intimal de novo, podendo ou não haver infiltrado leucocitário, desde que excluídas outras causas.</p>			
RMA crônica inativa	- cg > 0 e/ou ptcml 1	Ausentes	Documentação prévia de DSA	Diagnóstico prévio de RMA ativa ou crônica
Positividade para C4d sem sinais de rejeição	Ausentes	- Marcação linear para C4d em capilares peritubulares ou <i>vasa recta</i> medulares (C4d2 ou C4d3 em IF ou C4d > 0 em IHQ)	Ausente	<p>- Sem evidências moleculares de RMA</p> <p>- Ausência de RMCT ativa ou crônica ou de infiltrados borderline</p>

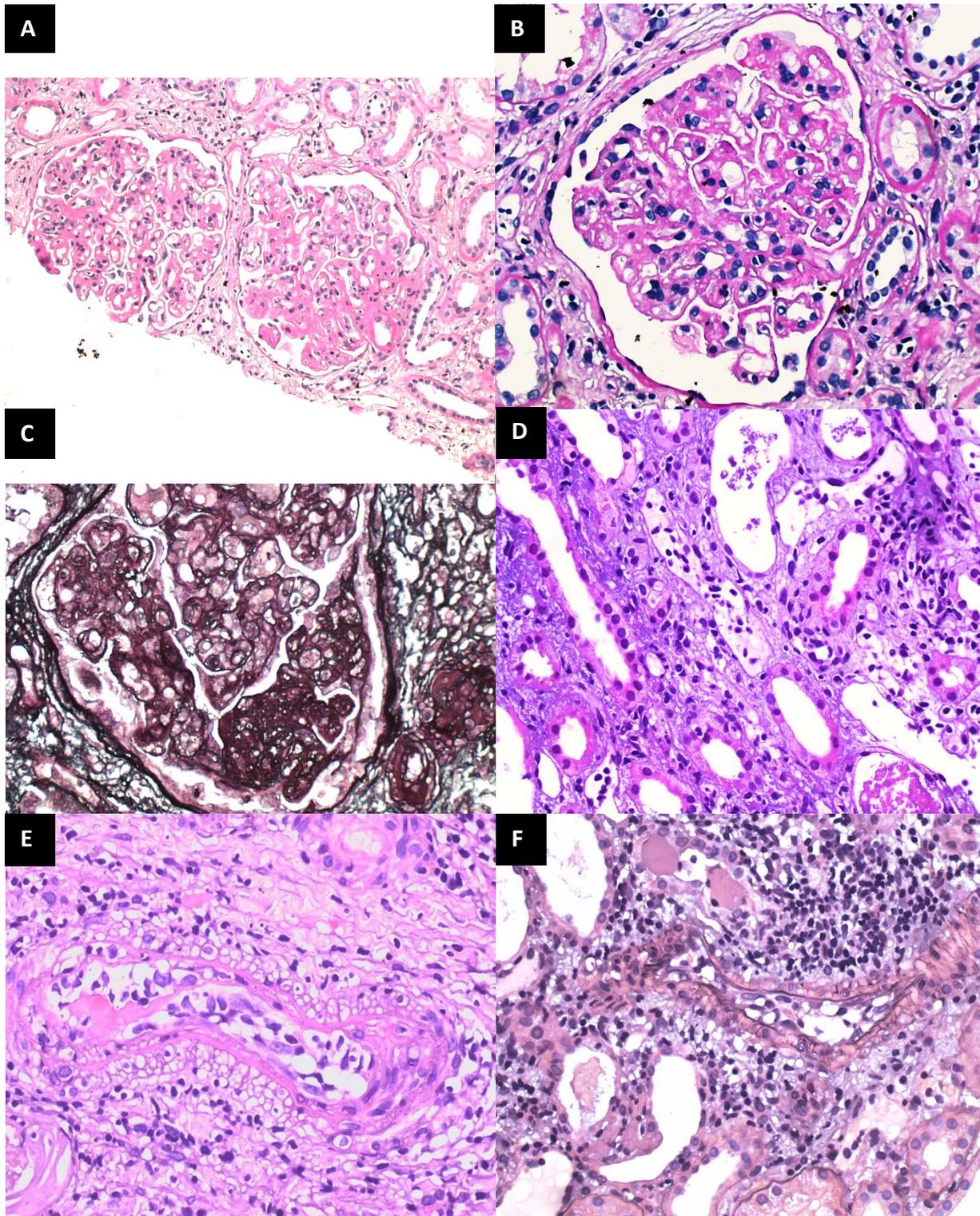


Figura 27: Alterações histopatológicas presentes em casos de RMA. A) Glomérulos aumentados de tamanho, com infiltração por células inflamatórias (PAS, 200x). B) Glomérulo com infiltração de células inflamatórias e tumefação

do endotélio (PAS, 400x). C) Duplicações em alças capilares glomerulares (cg) em caso de RMA crônica (Prata Jones, 400x). D) Congestão de capilares peritubulares por células inflamatórias e alterações reativas em endotélio, caracterizando pericapilarite (HE, 400x). E) Arterite moderada (v2), com semioclusão luminal, destacamento de células endoteliais e infiltrado leucocitário (HE, 400x). F) Arterite leve (v1), com destacamento endotelial e infiltrado leucocitário adjacente ao endotélio (Prata Jones, 400x).

Fonte: o autor.

APÊNDICE B – ANÁLISES ESTATÍSTICAS DO ESTUDO 1

	Cav		Cad		Vwf	
	Median(IQR)	p	Median(IQR)	p	Median(IQR)	p
MVI = 0	0,0(0,0)		10,6(24,8)		12,5(34,9)	
MVI = 1	0,0(0,0)	0,029	22,0(49,1)	0,015	25,6(37,6)	<0,001
MVI > 1	0,0(6,6)		20,0(48,7)		61,7(43,0)	
C4d0	0,0(0,0)		5,5(24,0)		9,7(28,3)	
C4d1	0,0(0,0)	0,117	5,3(20,0)	0,005	29,8(54,6)	<0,001
C4d2	0,0(5,0)		16,3(32,8)		29,9(55,1)	
C4d3	0,0(0,0)		16,3(38,3)		62,9(49,0)	
DSA -	0,0(0,0)	0,942	15,0(32,9)	0,173	16,9(38,4)	0,016
DSA +	0,0(0,0)		8,2(33,0)		35,3(59,0)	
FI-AT	0,0(0,0)	0,016	0,0(18,4)	<0,001	8,4(21,5)	<0,001
RMA	0,0(5,0)		16,5(36,8)		44,7(54,0)	
RMA (ativa)	0,0(0,0)	0,049	11,7(30,0)	0,001	34,3(54,9)	0,082
RMA (crônica)	0,0(7,2)		35,9(44,2)		57,5(38,6)	
MVI-/C4d-	0,0(0,0)		0,0(18,4)		7,7(18,5)	
MVI-/C4d+	0,0(0,0)	0,050	15,0(27,4)	0,002	27,0(44,7)	<0,001
MVI+/C4d-	0,0(6,6)		24,6(57,7)		35,7(51,6)	
MVI+/C4d+	0,0(5,0)		18,3(50,0)		54,6(48,1)	
DSA-/MVI-/C4d-	0,0(0,0)		10,6(26,1)		7,2(18,2)	
DSA+/MVI/C4d+	0,0(0,0)	0,174	11,7(27,5)	0,109	36,0(65,5)	<0,001
DSA+/MVI+/C4+	0,0(10,0)		30,0(43,8)		63,8(51,4)	