



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

ADRIANA REGINA VILARINHO DE OLIVEIRA

**IMUNOEXPRESSÃO DE C4d EM TRANSPLANTADOS RENAIIS:
ESTUDO RETROSPECTIVO COM AVALIAÇÃO DE SUA RELAÇÃO
COM VARIÁVEIS CLÍNICAS E MORFOLÓGICAS**

FORTALEZA
2022

ADRIANA REGINA VILARINHO DE OLIVEIRA

**IMUNOEXPRESSÃO DE C4d EM TRANSPLANTADOS RENAIIS:
ESTUDO RETROSPECTIVO COM AVALIAÇÃO DE SUA RELAÇÃO COM
VARIÁVEIS CLÍNICAS E MORFOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida

FORTALEZA

2022

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)~~

D32i Oliveira, Adriana Regina Vilarinho de
Imunoexpressão de C4d em Transplantados Renais: Estudo retrospectivo com avaliação de sua
relação com variáveis clínicas e morfológicas. / Adriana Regina Vilarinho de Oliveira. – 2022.
76 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós- Graduação em Patologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida .

1. Transplante de Rim. 2. Rejeição de Enxerto. 3. Imuno-Histoquímica. I. Título.

CDD 571.9

ADRIANA REGINA VILARINHO DE OLIVEIRA

**IMUNOEXPRESSÃO DE C4d EM TRANSPLANTADOS RENAIIS:
ESTUDO RETROSPECTIVO COM AVALIAÇÃO DE SUA RELAÇÃO COM
VARIÁVEIS CLÍNICAS E MORFOLÓGICAS**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Cláudia Maria Costa de Oliveira
Unichristus

Prof. Dr. André Costa Teixeira
Unichristus

*Aos meus mentores espirituais,
Aos meus pais, Regina e Aderbal,
À minha família.*

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus a oportunidade de estar realizando essa pesquisa e poder estar concluindo mais essa etapa da minha vida profissional.

Agradeço a minha mãe Maria Regina Vilarinho de Oliveira por sempre me incentivar, me guiar e me apoiar em todos os momentos, e por ser uma pessoa tão inspiradora. Agradeço ao meu pai Aderbal Carlos de Oliveira por seu apoio e conselhos, estando sempre ao meu lado.

Agradeço o apoio constante do meu marido Jamisson Morais Melo, companheiro de todas as horas, que esteve comigo em cada etapa desta jornada, me incentivando sempre. Agradeço aos meus filhos Isaac e Benício pelos abraços e trocas de carinho, sempre compreendendo minhas ausências.

Agradeço ao Professor Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida, meu orientador, pela confiança, pelo acolhimento e pela paciência, me mostrando o caminho necessário para meu amadurecimento científico.

Agradeço à Dra. Régia Maria do Socorro Vidal do Patrocínio e toda a equipe do Laboratório Biopse que foram tão prestativos e solícitos.

Agradeço aos colegas patologistas e toda a equipe de trabalho do Departamento de Patologia e Medicina Legal, pelo apoio e compreensão.

Agradeço aos colegas patologistas e técnicos do Laboratório CAC, me apoiando e compreendendo sempre que precisei.

Agradeço aos professores do Programa de Pós Graduação de Patologia por terem sido fundamentais na minha formação acadêmica.

À Valéria, pela amizade, pela eficiência e por ser solícita sempre que precisei.

RESUMO

A rejeição mediada por anticorpos representa um desafio significativo e contínuo para a sobrevivência duradoura do enxerto no transplante renal, sendo considerada a principal causa de perda do enxerto a longo prazo. A detecção do C4d em biópsias é uma importante ferramenta adjuvante para ajudar a compreender a resposta aloimune e, em particular, para diagnosticar a rejeição mediada por anticorpos. O objetivo deste trabalho foi avaliar e investigar se a expressão de C4d tem relação com variáveis clinicopatológicas, com ênfase na rejeição ou não do aloenxerto, bem como avaliar as alterações histológicas em biópsias de rim transplantado e a sua relação com a evolução do enxerto. Foram analisadas as biópsias e a expressão do marcador C4d por imuno-histoquímica de 22 pacientes que fizeram transplante renal entre 2013 e 2014, com seguimento por um período mínimo de 1 ano; o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará sob o parecer de nº. 26154918.8.0000.5054. Quando se compara o tempo de evolução do transplante, as biópsias realizadas no seguimento tiveram uma piora dos parâmetros do Banff, tanto dos critérios de atividade como dos critérios de cronicidade. A grande maioria dos casos com leve infiltrado intersticial ($i=1$) manteve o status C4d e o único caso com escore máximo ($i=3$) apresentou aumento na expressão de C4d. Todos os casos com proteinúria mantiveram o status C4d inalterado, sendo $p<0,032$. As biópsias realizadas no seguimento mostraram piora dos escores de Banff, tanto em termos de atividade quanto de critérios de cronicidade, e a manutenção do status C4d esteve fortemente associada à proteinúria.

Palavras chave: Transplante de Rim, Rejeição de Enxerto, Imuno-Histoquímica

ABSTRACT

Antibody-mediated rejection represents a significant and ongoing challenge to long-lasting graft survival in renal transplantation and is considered the leading cause of long-term graft loss. Detection of C4d in biopsies is an important adjunctive tool to help understand the alloimmune response and, in particular, to diagnose antibody-mediated rejection. The aim of this study was to evaluate and investigate whether the expression of C4d is related to clinicopathological variables, with an emphasis on rejection of the allograft or not, as well as to evaluate the histological alterations in transplanted kidney biopsies and their relationship with the evolution of the graft. Biopsies and C4d immunohistochemistry expression from 22 patients who underwent kidney transplantation between 2013 and 2014 were analyzed, with a follow-up period of at least 1 year. Follow-up biopsies from patients which underwent renal transplant for a longer period of time showed worsening of the Banff criteria for chronicity. Patients who maintained C4d staining throughout the course of transplant showed a strong association with proteinuria. All cases with proteinuria maintained unchanged C4d status, with $p < 0.032$. The vast majority of cases with mild lesion ($i=1$) maintained C4d status and the only case with maximum score ($i=3$) showed an increase in C4d expression. When comparing different post-transplant biopsies time point, biopsies performed in the follow-up showed a worsening of the Banff scores, both in terms of activity and chronicity criteria, and the maintenance of the C4d status was strongly associated with proteinuria.

Keywords: Kidney Transplantation, Graft Rejection, Immunohistochemistry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Linha do Tempo de evolução do Transplante renal.....	13
Figura 2.	Alterações morfológicas ao longo do tempo na RMA.....	19
Figura 3.	Patogênese dos DSA na Rejeição Mediada por Anticorpo.....	20
Figura 4.	Cascata de ativação do Complemento e formação do C4d.....	21
Figura 5.	Fluxograma com critérios de inclusão e exclusão.....	37
Figura 6.	Fluxograma com a divisão dos pacientes em grupos recente e antigo.....	40
Figura 7.	Fotomicrografia de Glomerulopatia do transplante – biópsia realizada no seguimento do paciente, 5 anos após o transplante.....	48
Figura 8.	Fotomicrografia de Expressão do C4d por imunohistoquímica.....	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Distribuição dos transplantes renais pelo ano de sua realização.....41

Gráfico 2 Distribuição dos pacientes transplantados em relação à primeira biópsia renal pós-
enxerto (T1): grupos antigo e recente.....41

Gráfico 3 Distribuição dos pacientes transplantados em relação ao grau de Incompatibilidade.42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Variáveis Clínicas e Laboratoriais relacionadas à primeira biópsia pós-transplante (T1), comparando os grupos antigo e recente.....43
- Tabela 2 - Achados morfológicos na primeira biópsia (T1) em relação ao tempo do transplante.....44
- Tabela 3 - Achados morfológicos da segunda biópsia (T2) em relação à evolução do transplante, comparando os grupos antigo e recente.....46
- Tabela 4 - Expressão do C4d em biópsias assíncronas em transplantados e avaliação do *status* de C4d ao longo da evolução do transplante.....50
- Tabela 5 - Comparação do *status* do C4d levando-se em conta a 1ª e 2ª biópsias, entre os grupos Antigo e Recente de transplantados renais.....51
- Tabela 6 - Condição (*status*) do C4d em relação ao intervalo da biópsia e aos grupos recente e antigo.....52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC	Anticorpo
APC	Células Apresentadoras de Antígeno
C4d-	C4d Negativo
C4d+	C4d Positivo
CAM	Complexo de Ataque à Membrana
Células NK	Células Natural Killer
DSA	Anticorpos Específicos dos Doadores
ENDAT	Genes de Ativação Endotelial
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-1	Interleucina 1
Linfócitos Th	Linfócitos T Helper
MAT	Microangiopatia Trombótica
ME	Microscopia Eletrônica
MO	Microscopia Óptica
PTC	Capilar peritubular
RMA	Rejeição Mediada Por Anticorpos
TCE	Traumatismo Crânio Encefálico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
.		
1.1	Considerações Iniciais.....	13
1.2	Rejeição mediada por anticorpos.....	16
1.3	Ativação do sistema do complemento – C4d.....	21
1.4	Classificação de Banff: Evolução da rejeição mediada por anticorpos.....	26
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS.....	34
.		
3.1	Objetivo Geral.....	34
3.2	Objetivos Específicos.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	Tipo de Estudo.....	35
4.2	População do Estudo.....	35
4.3	Amostra.....	35
.		
4.4	Critérios	de 36
	Inclusão.....	
4.5	Critérios de Exclusão.....	36
4.6	Análise de Dados.....	38
4.7	Aspectos Éticos.....	38
5	RESULTADOS.....	40
6	DISCUSSÃO.....	53
.		

7	CONCLUSÃO.....	57
----------	-----------------------	-----------

SUMÁRIO

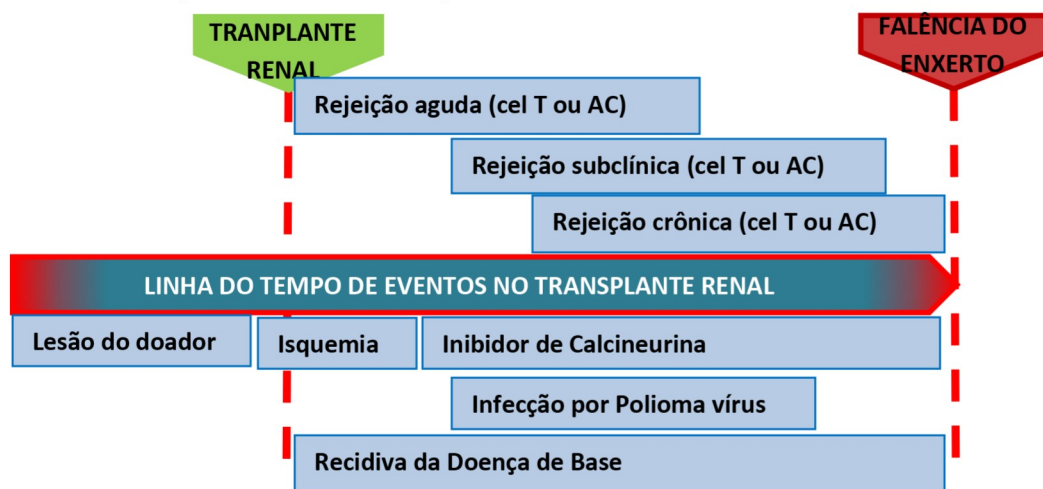
8	REFERÊNCIAS.....	58
	Apêndice A - Dados clínicos.....	64
	Apêndice B - Alterações morfológicas de acordo com Banff 2019 – 1ª. Biópsia.....	65
	Apêndice C - Alterações morfológicas de acordo com Banff 2019 – 2ª. Biópsia.....	66
	.	
	Anexo 1 - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará.....	67
	Anexo 2 - Rejeição Mediada por Anticorpos ao longo das Classificações de Banff.....	71
	Anexo 3 - Padronização dos Escores de Banff – 2019.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

A disfunção do enxerto é uma complicação comum em geral decorrente de lesão de isquemia reperfusão e afeta a sobrevida do enxerto a curto e longo prazo, incluindo um risco maior para rejeição aguda (QUAGLIA *et al*,2020). A figura 1 mostra os principais eventos que podem afetar o rim transplantado ao longo do tempo.

Figura 1. Linha do Tempo de evolução do Transplante renal



Fonte: Adaptado de QUAGLIA, M. *et al*. Recent Advances on Biomarkers of Early and Late Kidney Graft Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 5404.

Rejeição mediada por anticorpos (RMA) tem um papel importante na sobrevida do enxerto tanto a curto como a longo prazo e está bem estabelecido que a compatibilidade de pacientes e doadores com relação às moléculas HLA (antígeno leucocitário humano) tem um grande impacto na sobrevida do transplante (ETTA, 2020; HABETS *et al*, 2018).

A detecção de anticorpos anti-HLA ocorre em quase um terço dos pacientes que estão aguardando na fila do transplante, sendo que o grau de incompatibilidade (graduado de 0 a 6) influencia na sobrevida do enxerto a longo prazo (ETTA, 2020; HABETS *et al*, 2018). O risco de rejeição é maior quando os anticorpos anti-doador estão presentes ou são formados após o transplante.

A rejeição em transplantes renais pode ser mediada por reação imune celular (mediada por linfócitos T) ou humoral (mediada por anticorpos), em geral contra antígenos HLA. A RMA ativa pode ocorrer em decorrência de reação contra antígenos HLA I e II, enquanto a RMA crônica está mais fortemente associada a antígenos contra HLA II (ETTA, 2020).

Na rejeição humoral, anticorpos específicos contra antígenos renais do doador podem se ligar a fatores do complemento e iniciar a ativação dos mesmos através da via clássica. Durante a cascata de ativação do sistema complemento, C4d, um dos componentes da cascata, é formado e pode se ligar covalentemente a moléculas-alvo no endotélio dos capilares peritubulares, sendo assim sua detecção é considerada um fator de risco para RMA (DOMINY *et al*, 2019; BOTERMANS *et al*, 2011).

A detecção do C4d em biópsias de transplante renal é uma importante ferramenta adjuvante para ajudar a compreender a resposta aloimune e, em particular, para diagnosticar a RAM (KLEIN, 2019). Essa deposição pode ocorrer habitualmente no mesângio sem inflamação, na membrana basal glomerular, na membrana basal tubular, nas arteríolas e na íntima arterial nos rins nativos e transplantados e pode ser demonstrada por coloração de anticorpos mono e policlonais através de imuno-histoquímica (IHQ) e por imunofluorescência (COHEN *et al*, 2012; LEE *et al*, 2019). Sua presença em capilares peritubulares, juntamente com a pesquisa de anticorpos específicos do receptor e evidência de dano histológico foram incorporados no sistema de classificação Banff, revisto como critério para o diagnóstico de RMA em pacientes transplantados renais (TROXELL *et al*, 2006; LOUPY *et al*, 2017). Entretanto, influência de C4d sobre a função e o desfecho do enxerto nas diferentes categorias de Banff ainda não está devidamente esclarecida (TROXELL *et al*, 2006; SENEV *et al*, 2019).

Os episódios de RMA e celular são difíceis para analisar porque a maioria ocorre meses ou anos depois do transplante e a biópsia pode apresentar alterações agudas e crônicas.

Nestes casos, é difícil definir qual ramo do sistema imunológico (celular ou humoral) foi responsável por mais danos. Sabe-se que IHQ para C4d em capilares peritubulares combinados com altos níveis de anticorpo antidoador no soro sugere que a RMA seja a principal causa de lesão do enxerto (ETTA, 2020).

Há um número significativo de casos com presença de inflamação microvascular (pericapilarite e glomerulite), porém com marcação negativa para C4d (SIS, 2010), sendo considerados Rejeição Mediada por Anticorpos C4d- (RMA C4d-) pela classificação de Banff (DOMINY *et al*, 2019).

Estes casos foram associados à expressão elevada de genes de ativação endotelial (ENDATs), anticorpos antidoador e histologia de rejeição crônica mediada por anticorpos e, menos frequentemente por alterações ativas (SIS, 2010).

O assunto tem sido motivo de debates. Apesar dos desenvolvimentos significativos nas modalidades diagnósticas para a lesão imune no transplante renal, a biópsia renal continua a ser o padrão-ouro para a avaliação da disfunção do enxerto. Fornece informações valiosas sobre a patogênese da lesão precoce e tardia do enxerto e é indispensável para o diagnóstico da rejeição do transplante renal e seu manejo clínico (DEVADASS *et al*, 2016), além de diagnosticar outras causas de disfunção do enxerto, como necrose tubular aguda, isquemia, infecções, reações a drogas, glomerulonefrites recidivadas ou de novo (HASSAN, 2013). E a presença e intensidade da expressão ou não de C4d nestas biópsias e sua relação com o prognóstico de aloenxerto continua envolto em controvérsias, o que motivou este estudo.

1.2 Rejeição mediada por anticorpos

A rejeição do enxerto renal é um processo complexo e envolve numerosas vias celulares e moleculares diferentes. A intensidade da reação imune e, portanto, o grau e a velocidade da rejeição, dependem da histocompatibilidade entre receptor e doador, já que

enxertos HLA compatíveis sobrevivem mais tempo que os incompatíveis (BOTERMANS, 2011).

Esta ativação pode ocorrer por duas vias distintas. Na via direta (sistema adaptativo celular), ocorre ativação de linfócitos T CD4⁺ pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) do doador, que vão desencadear a ativação de outras células do sistema imune, principalmente os linfócitos T helper 2 (Th2), com secreção de diferentes tipos de citocinas. Na via indireta (sistema adaptativo humoral), os antígenos do doador ativam as APCs do receptor, que estimulam a atividade de linfócitos B ativados, levando à produção de anticorpos contra o enxerto - Donor Specific Antibodies – DAS = anticorpos específicos contra doadores (GARCES *et al*, 2017; BHATTI, 2015). Estes anticorpos se ligam às moléculas HLA e não-HLA das células endoteliais do rim transplantado (DJAMALI *et al*, 2014).

As duas vias, direta e indireta, estão interligadas e uma acentua a outra, de modo que as citocinas produzidas pelos linfócitos Th2 podem promover a produção de anticorpos, por exemplo. Os linfócitos B e os anticorpos anti-HLA tem um papel fundamental na RMA, quer seja aguda ou crônica, sendo a presença de linfócitos B CD20⁺ e de plasmócitos indicativo de lesão irreversível, proporcionando imunidade duradoura contra o enxerto, em decorrência da produção de anticorpos (BHATTI, 2015).

Estes anticorpos se ligam às moléculas HLA e não-HLA nas células endoteliais (DJAMALI *et al*, 2014). As moléculas HLA classe I são expressas por todas as células nucleadas e apresentam os antígenos para células T CD8⁺ citotóxicas; as da classe II, são expressas por linfócitos B, APCs e células endoteliais ativadas, e apresentam antígenos para linfócitos Th, influenciando a produção de anticorpos (WANG *et al*, 2017).

As células endoteliais do enxerto, presentes nos glomérulos e capilares peritubulares, são o alvo de escolha em decorrência do contato íntimo com as células sanguíneas do

receptor, levando a interações com células inflamatórias circulantes, citocinas, anticorpos e agentes farmacológicos (CARDINAL, 2018).

A ativação das células endoteliais produz uma resposta pró-inflamatória e aumentam a expressão de moléculas pró-coagulantes. A ativação do tipo I é induzida por histamina e trombina, sendo uma resposta rápida independente de fatores de transcrição; a do tipo II é iniciada em resposta a citocinas como IL-1 e TNF- α , sendo, portanto, um processo mais lento (WANG *et al*, 2017).

Os DSA classe I e classe II agredem as células endoteliais através da ativação da via do complemento e por citotoxicidade mediada por anticorpos. Além disso, os DSA classe I induzem uma sinalização intracelular que resulta em migração, proliferação e resistência à apoptose, bem como morte induzida por ativação da cascata do complemento, que pode impactar no remodelamento vascular e levar à rejeição crônica do enxerto (HASSAN, 2013; CARDINAL, 2018).

A ligação dos DSAs com antígenos expressos nas células endoteliais do enxerto pode ativar ou não a via clássica do complemento (DJAMALI *et al*, 2014; ZHANG, 2017). Quando ocorre a formação de DSAs que se fixam ao complemento (IgG1 e IgG3) ocorrerá a ativação da via clássica do complemento, levando à RMA ativa C4d+. Os DSAs não ativadores da via do complemento (IgG4) estão mais relacionados à RMA subclínica e crônica, bem como glomerulopatia do transplante e fibrose (ETTA, 2020).

Na ausência da ativação da cascata do complemento, os DSAs podem causar danos nas células endoteliais do enxerto através da ativação de células do sistema imune inato. Nesse caso, neutrófilos, macrófagos e células NK (natural killers) se ligam à porção Fc dos DSAs o que causaria uma degranulação destas células e liberação de enzimas gerando dano tecidual e morte celular. Este tipo de injúria é mais frequente na RMA ativa, exibindo

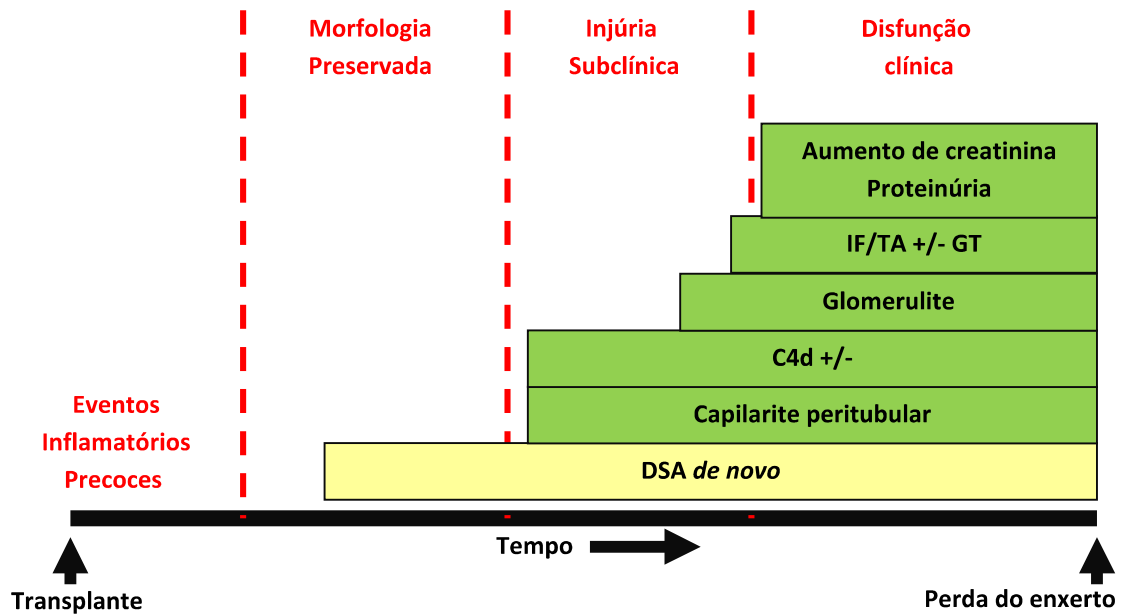
agregação plaquetária, microangiopatia trombótica (MAT) e acúmulos de neutrófilos (DJAMALI *et al*, 2014; ZHANG, 2017).

Sellarés *et al* demonstraram em estudos preliminares que as moléculas mais relacionadas à RMA apontam uma interação entre as células NK e os DSAs aderidos na superfície das células endoteliais, com liberação de IFNG e induzindo e produzindo transcrição de proteínas como CXCL11 (SELLARÉS *et al*, 2013).

Em pacientes com RMA, foi observado níveis elevados de fatores de transcrição endoteliais como Fator de von Willebrand, moléculas de adesão plaquetárias/endotelial, Caveolina 1 e Selectina E (CARDINAL, 2018). Além disso, os pacientes com DSA e elevação dos fatores de transcrição, tem pior prognóstico a longo prazo, mesmo sem evidência de ativação da cascata do complemento (CARDINAL, 2018; PUTTARAJAPPA *et al*, 2012).

Os DSAs podem ainda induzir diretamente a proliferação das células endoteliais através da produção do fator de crescimento vascular endotelial, aumentando receptores do fator de crescimento fibroblástico, e aumentando as vias de sinalização para recrutamento celular (ZHANG, 2017). A injúria celular repetitiva causa o reparo tecidual, que se manifesta microscopicamente como a Glomerulopatia do transplante, havendo declínio da função renal (DJAMALI *et al*, 2014), bem como diminuição da população de capilares peritubulares e laminação da membrana basal (CARDINAL, 2018). A figura 2 mostra as alterações morfológicas nas biópsias de transplante renal, ao longo do tempo, em relação aos DSAs.

Figura 2. Alterações morfológicas ao longo do tempo na RMA

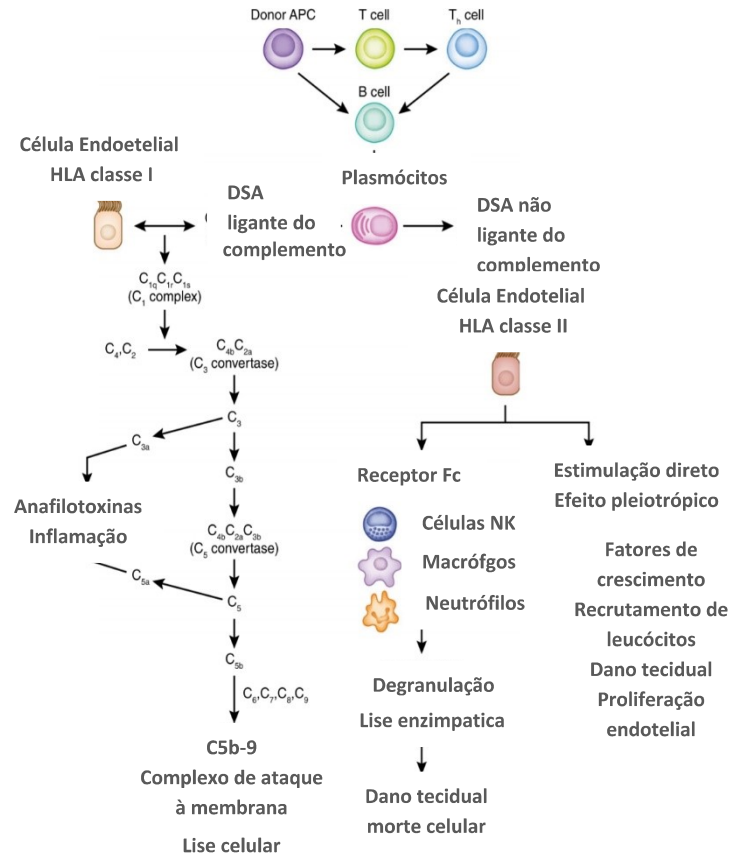


Fonte: Adaptado de: DJAMALI, A. *et al.* Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. *Am J Transplant.* 2014, Feb;14(2):255-71

Assim, a presença de DSA pré-formados (em caso de gestação, transfusão sanguínea, transplante prévio) ou “de novo” (formados após o transplante) está relacionado a menor tempo de sobrevida do enxerto, maior incidência de RMA e disfunção do enxerto (WANG *et al.*, 2017; ZHANG, 2017). Os pacientes com RMA ativa tem maior risco de uma nova rejeição, RMA crônica e perda do enxerto (DJAMALI *et al.*, 2014).

A figura 3 mostra esquematicamente as vias de atuação dos DSAs nas células endoteliais, ativando ou não da cascata do complemento.

Figura 3. Patogênese dos DSA na Rejeição Mediada por Anticorpo



Fonte: Adaptado de ZHANG, R. Donor-specific antibodies in kidney transplant recipients. Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 2017, vol 13 (1): 182-192

Tratamentos que visam RMA estão sendo desenvolvidos, incluindo combinações de plasmaférese, Ig intravenosa (IVIg), imunoadsorção, tacrolimus / micofenolato mofetil e Rituximab, entre outros. Estes tratamentos são substancialmente diferentes do tratamento convencional para rejeição mediada por células T, tais como esteróides por impulsos e reagentes anti-células T (por exemplo, globulina anti-timócito, OKT3) etc (DEVADASS *et al*, 2016).

Portanto, a detecção de anticorpos anti-doador e se há ou não deposição de C4d em biópsias de transplante tornaram-se uma parte importante do diagnóstico e do prognóstico destes pacientes.

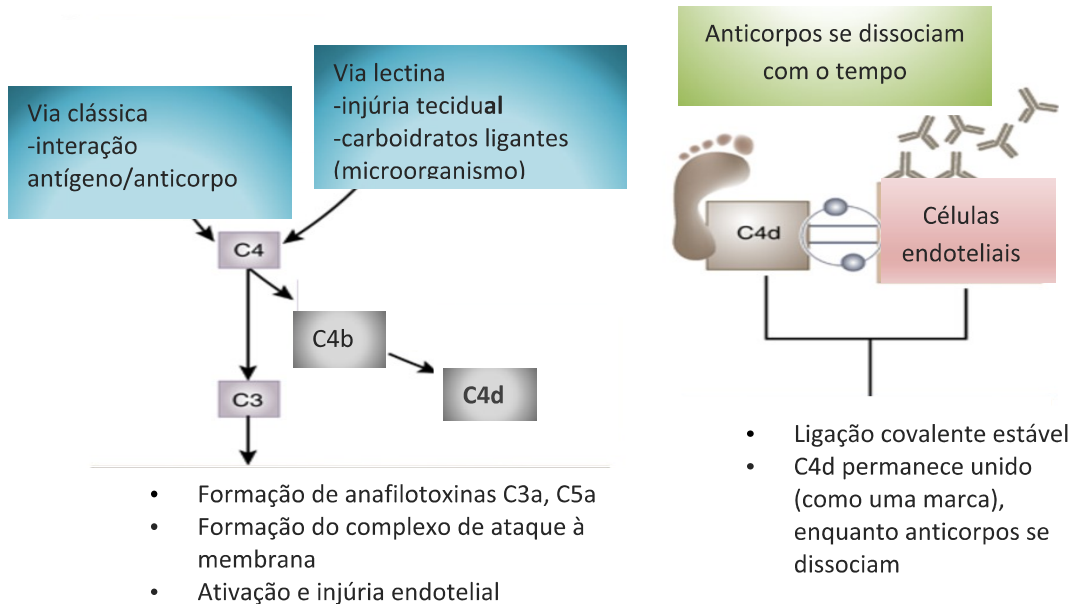
1.3 Ativação do sistema do complemento – C4d

Halloran *et al* descreveram pela primeira vez a RMA aguda na década de 1990, sendo identificado no mesmo período a presença de C4d como um marcador de atividade humoral antidoador (GARCES *et al*, 2017). Desde 2003, o sistema de Classificação de Banff para enxerto Renal reconheceu a importância dos anticorpos na rejeição e a marcação para C4d nos capilares peritubulares foi aceita como RMA (DJAMALI *et al*, 2014; BHOWMIK *et al*, 2010).

O C4d é um subproduto da ativação do C4 e não tem uma função definida. É formado quando há ativação da via clássica do complemento, após a ativação do C1q por complexos antígeno-anticorpo, bem como pela ativação direta da via da Lectina (DJAMALI *et al*, 2014; FILIPPONE, 2018), sem que haja a ligação com os DSAs (ETTA, 2020).

A figura 4 representa esquematicamente a formação do C4d durante a ativação da cascata do complemento, através das vias clássica e Lectina.

Figura 4. Cascata de ativação do Complemento e formação do C4d.



Fonte: Adaptado de COHEN, D. *et al.* Pros and Cons for C4d as a Biomarker. *Kidney Int.* 2012; Apr;81(7):628-39.

A avaliação do C4d pode ser feita por IHQ ou imunofluorescência, utilizando-se anticorpos poli ou monoclonais, com marcação positiva nos capilares peritubulares e vasa recta, indicando que houve atividade de anticorpos e interação com as células endoteliais.

A marcação para C4d é temporária e sucessivas biópsias podem ser positivas ou negativas (FILIPPONE, 2018). Tal fato, associado a menor quantidade de capilares peritubulares num contexto de fibrose e atrofia tubular, podem levar a marcações fracas do C4d (HASSAN, 2013; GARG, 2017).

Além disso, marcação falsa ou negativa para C4d em pacientes DAS+, pode ser decorrente de erro na reação de imuno-histoquímica ou ativação do DSA por outra via não-complemento dependente (ZHANG, 2018). A marcação para C4d pode ainda ser negativa em decorrência de baixa fixação do complemento por alguns DSAs (NIGAM et al, 2018).

Glomérulos normais podem marcar para C4d na região mesangial e mais raramente nos capilares glomerulares (FILIPPONE, 2018). Porém Yoo Jin Lee et al demonstraram uma correlação entre marcação positiva para C4d nos glomérulos de enxertos com glomerulite,

pericapilarite e glomerulopatia do transplante e DAS (LEE *et al*, 2019). Esta marcação também pode ser encontrada em micro-angiopatia trombótica e glomerulonefrites mediadas por imuno-complexos, como no caso da Glomerulonefrite Membranosa (CARDINAL, 2018).

Segundo os critérios de Banff de 2017, o diagnóstico de RMA ativa é baseado em três pilares: (1) presença de DSA anti-HLA ou outros anticorpos, (2) evidência de interação dos anticorpos com o endotélio vascular, com marcação positiva para C4d nos capilares peritubulares e vasa recta, e (3) evidência histológica de injúria tecidual aguda. A RMA crônica também possui três critérios: (1) evidência histológica de injúria tecidual crônica, (2) acentuado espessamento da membrana basal dos capilares peritubulares visto na microscopia eletrônica, e (3) fibrose arterial intimal (HAAS *et al*, 2018).

Nesta classificação, a positividade para C4d foi considerada uma alternativa nos casos em que a avaliação do DSA não é possível ou falso negativo. Foi considerado como C4d+, qualquer marcação linear e circunferencial, mesmo focal (>0), sendo os achados classificados em 3 categorias: (1) RMA ativa, (2) RMA crônica/ativa, e (3) C4d positivo sem evidência histológica de rejeição (HAAS, 2018).

Foram destacados dois fenótipos de RMA. O primeiro ocorre precocemente, em pacientes pré-sensibilizados, em geral C4d+. O segundo ocorre tardiamente, provavelmente por formação de DSA “de novo”, com grande chance de ser C4d (NIGAM *et al*, 2018). A RMA tardia é um importante fator para a perda do enxerto.

Embora a presença de casos C4d+ sem evidência histológica de rejeição, em transplantes ABO compatíveis, seja raro, em casos de pacientes pré-sensibilizados, casos de reperfusão ou pacientes biopsiados precocemente, há associação com RMA subsequente. Biópsias tardias de pacientes com C4d+ sem evidência histológica de rejeição, com ou sem disfunção do enxerto, revelam resultados ambíguos e prognóstico variável em termos de sobrevida do enxerto (DOMINY *et al*, 2019).

É importante ressaltar que a pesquisa de DSA pode ser negativa, pois os testes disponíveis não avaliam todos os possíveis anticorpos que poderiam afetar o enxerto (HAAS *et al*, 2018). Um exemplo são anticorpos contra receptores da angiotensina II (GARG, 2017). Neste contexto, a RMA pode ser DSA- e C4d+, pois os anticorpos formados são não-HLA, mas ativam a cascata do complemento (ZHANG, 2018). Outra possibilidade para casos DSA- e C4d+ é a deposição de C4d através da ativação da via da lectina (DOMINY *et al*, 2019).

Alguns estudos demonstraram uma associação clara e independente entre C4d e injúria na microcirculação, com pior prognóstico, mesmo na ausência de alterações histológicas típicas de RMA (DJAMALI *et al*, 2014; ZHANG, 2017). Estes dados favorecem a hipótese que a RMA C4d+ pode ser decorrente de citotoxicidade direta dependente da via do complemento, enquanto que nos casos de RMA C4d- parece haver outros mecanismos não dependentes desta via (ZHANG, 2017). A presença de RMA C4d- pode ocorrer em decorrência de aloanticorpos contra o endotélio, causando uma reação intensa com ativação intracelular que provocam fortes respostas como a proliferação e ativação de vias de sinalização, gerando lesão do endotelial. Nestes casos, há grande quantidade de transcritos endoteliais, um indicativo de RMA ativa e baixa expectativa de vida do enxerto (KHAIRWA, 2020). Morfológicamente, as duas categorias de RMA, C4d+ e C4d- podem ser observadas.

Apesar de a pesquisa para C4d ser essencial e uma recomendação da classificação de Banff, não é um marcador muito sensível uma vez que há casos com intensa inflamação na microcirculação, porém com marcação fraca ou focal para C4d (KHAIRWA, 2020), especialmente nos casos crônicos.

Goutaudier *et al* não demonstraram associação entre sobrevida do enxerto e depósitos de C4d em capilares peritubulares ou glomerulares (GOUTAUDIER *et al*, 2019).

Para estes autores, a deposição de C5b9 indica a ativação completa da via, clássica ou alternativa, com a formação do complexo de ataque à membrana (CAM). Este se liga à

membrana das células endoteliais e provoca a formação de poros, que permitem um influxo descontrolado de água e íons, com turgência e lise celular subsequente, além de promover o recrutamento de células inflamatórias. Diferentemente da formação do C4d, que ocorre somente durante a ativação da via clássica e antes da formação do CAM. Assim, sugerem a análise conjunta do C4 e do C5b9, bem como a possibilidade de terapias anti-C5 (GOUTAUDIER *et al*, 2019; STEGALL, 2012).

Outros estudos demonstraram que a ativação da via clássica e alternativa do complemento pode resultar na deposição de C3d, sendo sugerido como mais sensível nas RMA complemento dependente (GARG, 2017).

Além disso, a positividade para C4d em capilares peritubulares está presente na maioria dos transplantes renais com incompatibilidade ABO, sem disfunção do enxerto ou injúria na microcirculação (DOMINY *et al*, 2019; FILIPPONE, 2018; GARG, 2017). A positividade do C4d sem evidência de rejeição ainda não está esclarecida (GARG, 2017), sendo incorporada com categoria C4d+ sem evidência de rejeição no Banff 2013 (HAAS *et al*, 2014).

Com a recomendação de pesquisa de C4d em todas as biópsias de transplante renal, quer seja por IHQ, quer seja por imunofluorescência, há muitos relatos na literatura demonstrando biópsias com alterações morfológicas de rejeição com DSAs +, porém C4d- (ETTA, 22). Estudos demonstram que nestes casos, há uma expressão alterada dos genes endoteliais, em decorrência da ação dos aloanticorpos agindo na microcirculação, sendo identificadas ENDATs, independente da marcação para o C4d - positivo ou negativo (ETTA, 2020; SIS, 2009). As alterações moleculares envolvidas na elevação dos ENDATs poderiam explicar a injúria e disfunção das células endoteliais, reparo e ativação das células endoteliais e/ou angiogênese.

A análise molecular das biópsias de enxerto tem demonstrado novos biomarcadores potenciais para predizer prognóstico e resposta terapêutica, bem como melhorar o diagnóstico,

principalmente nos casos C4d+ sem evidência de rejeição (DOMINY *et al*, 2019), bem como em casos de pacientes com pesquisa positiva para DSA, porém marcação negativa para C4d (QUALIA *et al*, 2020). Neste sentido, a aplicação da proteômica para diagnóstico de doenças relacionadas ao transplante é bastante promissor, acrescentando novas abordagens diagnósticas e melhor compreensão da patogênese (MARX *et al*, 2019; SOARES, 2007). Estes estudos apontam biomarcadores promissores, plasmáticos e urinários, para detecção de Rejeição Mediada por Células T e por Anticorpos, ativa e crônica .

Os mecanismos patogênicos envolvidos na rejeição do transplante renal são complexos e muitas vezes os achados morfológicos e de IHQ nas biópsias renais são inespecíficos. Assim, foi proposto na classificação de Banff de 2017, a inclusão de dados referente a expressão gênica para suprir as limitações das biópsias (HAAS *et al*, 2018).

1.4 Classificação de Banff: Evolução da rejeição mediada por anticorpos

Em decorrência da necessidade de estabelecer uma adequada orientação e tratamento dos transplantes renais, foi desenvolvido um esquema de padronização internacional da nomenclatura e dos critérios para o diagnóstico histológico de rejeição. O primeiro encontro aconteceu na cidade de Banff, Canadá em 1991, que inspirou o nome de todos esses encontros. (SOLEZ *et al*, 1993). Uma sinopse das classificações está apresentada no Anexo 2.

O objetivo dos Grupos de Trabalho do Banff é reunir o conteúdo atual da Classificação, melhorar sua acessibilidade, bem como fornecer uma avaliação crítica das áreas da Classificação do Banff que requerem esclarecimentos e fornecer uma perspectiva para desenvolvimentos futuros.

Na primeira classificação, foi utilizado o termo Rejeição Hiperaguda incluído na Categoria 2, geralmente ocorrendo uma hora após o transplante, e caracterizado pelo acúmulo

de polimorfonucleares nos capilares glomerulares e peritubulares, presumidamente devido a anticorpos pré-formados, com lesão endotelial subsequente e trombose capilar (SOLEZ *et al*, 1993).

Foi definido também o termo Glomerulopatia do transplante, podendo ser precoce ou tardia. A precoce era caracterizada por glomerulite e foi definida como acúmulo endocapilar de linfócitos e monócitos com edema das células endoteliais, indicando um dano imunológico glomerular por antígenos presentes no órgão transplantado. A tardia, caracterizada por proliferação celular mesangial, interposição mesangial periférica e às vezes crescentes celulares (SOLEZ *et al*, 1993).

Em 1997, o esquema foi reavaliado, juntamente com pesquisadores baseados em ensaios clínicos colaborativos em transplante renal, sendo proposto uma atualização, chamada Classificação de Trabalho Banff 97. Nesta época, embora a presença de glomerulite ainda fosse controversa, foi mantida a definição anterior, alterando a forma de pontuação com a quantificação por porcentagem (%) de acometimento glomerular e deveria ser graduada pois havia relação com a perda tardia do enxerto. A presença de polimorfonucleares nos capilares glomerulares e peritubulares poderia estar relacionada com rejeição mediada por anticorpos ou microangiopatia trombótica precoce, devendo-se considerar a possibilidade de lesão endotelial aguda grave. A avaliação da glomerulite não era utilizada como critério para rejeição (RACUSEN, 1999).

Na tabela das categorias, optou-se pelo termo Rejeição Mediada por Anticorpos ao invés de Rejeição Hiperaguda, podendo ser imediata ou tardia; e quando não ocorresse imediatamente após o transplante, a presença de DSA deveria ser constatada (RACUSEN, 1999).

Foi somente no encontro de 2001, após crescente publicação na área, que a RMA se tornou cada vez mais reconhecida. Além disso, houve maior constatação desta condição,

melhores técnicas para detectar anticorpos antidoadores, aumento do número de pacientes retransplantados e aumento de transplante de pacientes com barreiras imunológicas, em decorrência da escassez de doadores de órgãos (RACUSEN, 2003).

A presença da marcação para C4d nos capilares peritubulares foi descrita e reconhecida como importante fator preditor de sobrevida do enxerto, sendo a positividade por imuno-histoquímica caracterizada como linear e brilhante em mais de 50% dos capilares amostrados (RACUSEN, 2003).

Assim, foi proposto uma alteração na Classificação do transplante renal, com a inclusão da RMA na Categoria 2, que incluía três critérios: (1) Evidência morfológica de lesão tecidual aguda, como: (a) lesão tubular aguda, (b) neutrófilos e / ou mononucleares em capilares peritubulares e / ou glomerulares e / trombose capilar, (c) arterite intimal / necrose fibrinóide / inflamação intramural arterial; (2) Evidência imunológica da ação de anticorpos: (a) marcação + para C4d e / ou (raramente) imunoglobulinas nos capilares peritubulares ou (b) imunoglobulina e complemento em vasos com necrose fibrinóide; (3) Evidência sorológica de anticorpos circulantes anti-HLA ou outros antígenos (RACUSEN, 2003).

Para o diagnóstico definitivo, a presença dos três critérios era obrigatória. Se houvesse uma ou mais características morfológicas da RMA, sem evidência sorológica de anticorpo anti-doador, a biópsia seria interpretada como suspeita ou consistente com RMA.

Em 2003, chegou-se ao consenso de que a pesquisa para C4d deveria ser realizada em todos os casos de transplante renal. A positividade para C4d por Imunofluorescência foi definida como marcação linear, forte, difusa e circunferencial nos capilares peritubulares tanto do córtex como da medula, exceto nas áreas de fibrose. A marcação glomerular deveria ser desconsiderada.

Caso a marcação para C4d fosse fraca ou focal, seria sugestivo de presença de anticorpo ou lesão endotelial mediada por complemento, porém não definitiva. Somente a presença de DSA permanecia como padrão ouro para o diagnóstico de RMA.

Foi definido também os critérios para pontuação da pericapilarite (ptc), com a inclusão de todas as células inflamatórias (linfócitos, neutrófilos, monócitos/macrófagos), evitando áreas subcapsulares ou necróticas. Foi recomendado que esta avaliação fosse feita na coloração de PAS ou Prata.

Foi mencionado que infiltração de macrófagos pode ser útil no diagnóstico de rejeição humoral, e que os macrófagos glomerulares e túbulo-intersticiais estão associados à deposição de C4d. Foi mencionado também que a presença de macrófagos está associada a pior prognóstico (RACUSEN, 2004).

Durante o encontro de 2005, foram definidos os critérios para RMA crônica / tardia, ativa: 1) características morfológicas como Glomerulopatia do transplante (duplicação das membranas basais glomerulares) e / ou multilaminação da membrana basal dos capilares peritubulares e / ou fibrose e atrofia tubular com ou sem perda de capilares peritubulares e / ou espessamento fibroso intimal das artérias, sem duplicação da elástica interna; (2) deposição difusa de C4d nos capilares peritubulares e (3) presença de DSA. A deposição difusa para C4d foi definida como marcação linear brilhante ao longo dos capilares, em mais de 50% do fragmento (SOLEZ, 2007).

Outros achados morfológicos poderiam acompanhar a RMA crônica ativa como agregados mononucleares envolvendo capilares peritubulares, glomerulite do transplante e infiltrado de plasmócitos no interstício. O termo 'sugestivo de RMA crônica' poderia ser usado se apenas estivessem presentes depósitos C4d, sem DSA ou DSA sem marcação para C4d (SOLEZ, 2007).

A RMA crônica ativa seria uma acomodação do enxerto, permitindo que este sobreviva o tempo suficiente para adquirir rejeição crônica, uma resistência aos aloanticorpos, suficiente para evitar a lise celular por inibição incompleta do complemento, mas insuficiente para evitar lesões e ativação endotelial. (COLVIN, 2005)

Durante este encontro em 2005, muito se discutiu sobre a importância da deposição de C4d e sua relação com glomerulopatia do transplante e multilaminação da membrana basal dos capilares peritubulares, com acúmulos de mononucleares. Porém foram relatados casos de glomerulopatia do transplante e multilaminação, sem marcação para C4d, podendo ser decorrente de erro técnico, lesão residual de RMA anterior, uma vez que a marcação é temporária, ou glomerulopatia do transplante mediada por células T; outra possibilidade seria causas não aloimune, como microangiopatia trombótica, glomerulonefrites, etc. Foram descritos também, casos histologicamente normais, mas C4d +, como nos casos de transplantes entre paciente com incompatibilidade ABO. Assim, para o diagnóstico definitivo de RMA crônica / tardia, era necessário a presença das alterações histológicas e presença de DSA e marcação para C4d (SOLEZ, 2007).

Marginação capilar de células inflamatórias é um importante marcador histológico da RMA em aloenxertos renais, sendo a presença de neutrófilos mais específico; porém tanto neutrófilos quanto mononucleares foram associados à deposição de C4d em capilares peritubulares. Durante este encontro, os critérios quantitativos para pericapilarite ('ptc') definidos no encontro anterior, foram revalidados, devendo ser classificado em focal se $\leq 50\%$ da área ou difuso, se $\geq 50\%$.

No encontro de 2007, foi recomendado que em toda biópsia de aloenxerto renal deve ser feita a pesquisa para C4d por IHQ ou imunofluorescência. Embora marcação difusa de C4d ($> 50\%$) fosse definida como positivo, a definição e o significado clínico da marcação

focal permanecia em debate, assim como o relato de casos C4d+, sem alterações morfológicas (SOLEZ, 2008).

Baseados nestes casos, a categoria diagnóstica 2 de Banff, passou a ser chamada Alterações Mediadas por Anticorpo, devendo ser documentado a presença de DSA, bem como C4d+. Foi introduzido o item Depósito de C4d sem evidência morfológica de rejeição, além de RMA aguda e RMA crônica ativa (SOLEZ, 2008).

Assim como o escore para a pericapilarite, o escore para C4d também foi subdividido em 0 a 3, baseado na porcentagem de córtex/medula comprometido (mínimo 10%), devendo ser pesquisado em no mínimo 5 CGA, e classificado em negativo, mínimo, focal ou difuso, com marcação linear e circunferencial (SOLEZ, 2008).

No encontro que ocorreu em 2009, começaram a discutir sobre os aspectos moleculares no transplante renal e fatores prognósticos, principalmente nos casos mais problemáticos, classificados como suspeitos, RMA C4d negativo, casos com arterite mas com pouca ou nenhuma inflamação intersticial, bem como casos com altos níveis de DSA na presença de elevada expressão gênica endotelial (SIS, 2010).

Dois mil e onze foi marcado por novas discussões sobre os critérios de RMA, especialmente na busca de melhores definições para RMA aguda versus crônico/ativa. Foi reconhecida a RMA C4d-, sendo criado um grupo de trabalho sobre Rejeição Mediada por Anticorpo, independente da marcação para o C4d (MENGEL, 2012).

No encontro de 2013, a classificação da RMA foi dividida em ativa/aguda, crônica ativa e incluiu-se a categoria C4d+ sem evidência de rejeição. Também definiram glomerulite como oclusão parcial ou completa dos capilares glomerulares por células inflamatórias e reação das células endoteliais, com escores de g0 a g3, dependendo da porcentagem de glomérulos envolvidos. Foi também definido os critérios para cg (HAAS, 2014).

As discussões durante o encontro de 2015 centraram nos aspectos da rejeição mista, (mediada por anticorpos e celular), na RMA subclínica, bem como na pesquisa de anticorpos não-HLA e perspectivas para patologia molecular. Não houve alteração na tabela das categorias para as biópsias renais (LOUPY, 2017).

Em 2017, a positividade para o C4d ganhou maior evidência, uma vez que poderia substituir a testagem de DSA, quando a pesquisa destes não estiver disponível ou quando houvesse possibilidade de ser falso negativo. Na presença de inflamação na microcirculação e marcação positiva para C4d, o diagnóstico de RMA pode ser constatado, mesmo na ausência de DSA. A categoria suspeito para rejeição foi retirada, uma vez que era considerada confusa (HAAS, 2018).

O último encontro do Banff foi em 2019, muitos questionamentos foram feitos a respeito do diagnóstico de RMA que tem se tornado cada vez mais complexo e a interpretação dos laudos baseados nas categorias do Banff podem confundir clínicos menos experientes. Foi também discutido a importância dos DSA não-HLA e dos casos C4d-, na presença de alterações morfológicas de inflamação na microcirculação, podendo o diagnóstico molecular esclarecer situações como estas citadas (LOUPY, 2020).

Apesar da expressão do C4d ser muito importante para os transplantes renais, sendo uma ferramenta para complementar o diagnóstico de RMA, sua marcação positiva ou negativa ainda não está totalmente esclarecida. Os grupos de trabalhos com ênfase em pesquisas relacionadas com o C4d foram criados na busca de melhor entendimento sobre este marcador. Estes grupos e outras pesquisas ajudarão no melhor entendimento sobre o papel do C4d no transplante renal.

2 JUSTIFICATIVA

A rejeição mediada por anticorpos representa um desafio significativo e contínuo para a sobrevivência a longo prazo do enxerto no transplante renal. Após a deposição de anticorpos contra antígenos do enxerto, ocorre a cascata de ativação do sistema complemento, sendo formado C4d, um de seus componentes, que pode se ligar covalentemente a moléculas-alvo no endotélio dos capilares peritubulares, sendo assim considerado um fator de risco para rejeição mediada por anticorpos. Na classificação de Banff de 2013 ficou estabelecido que a positividade para o C4d não seria mais uma exigência para o diagnóstico de rejeição mediada por anticorpos. Entretanto, na classificação de Banff de 2017, o C4d voltou a ser protagonista importante neste contexto. Assim, a presença ou não de C4d nestas biópsias, como fator essencial para a patogênese da lesão e no prognóstico do rim transplantado, continua assunto controverso.

Vale ressaltar que o estado do Ceará está entre os estados que mais fazem transplante no Brasil, ocupando o 10º. lugar em 2020 de acordo com o Registro Brasileiro de Transplante, sendo o Hospital Universitário Walter Cantídio/UFC um centro de referência. Deve também ser enfatizado que ainda existem poucos estudos relacionados a estes pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Investigar se a expressão de C4d nas biópsias renais tem relação com variáveis clinicopatológicas e alterações morfológicas.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar as alterações histológicas em biópsias dos rins transplantados, segundo os critérios de Banff.
- Verificar a relação ou não da positividade de C4d, através de imuno-histoquímica, com variáveis como idade, gênero, diagnóstico que motivou o transplante, tempo de evolução da doença básica, proteinúria e variáveis do Banff.
- Averiguar se a expressão ou não do C4d tem relação com a evolução do enxerto renal por um período mínimo de 1 ano, comparando os grupos antigo e recente..

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de estudo retrospectivo longitudinal.

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Pacientes transplantados renais do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará, pelo período de 2 anos (2013 e 2014) com biópsias realizadas entre 2013 e 2014.

4.3 AMOSTRA

Durante o período de 2013 a 2014, foram recebidas pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC(DPML/UFC) 112 amostras de biópsias de transplantados renais.

Foram selecionados apenas os pacientes que realizaram a pesquisa para o marcador C4d nestas biópsias nos anos de 2013 /2014, sendo denominado T1, e que posteriormente fizeram nova biópsia e nova pesquisa para C4d dentro de um período mínimo de 1 ano, denominado T2.

Após a seleção dos pacientes, foram coletados os seguintes dados do prontuário: nome, idade, sexo, doença de base, data do transplante, tipo de doador, idade de doador, causa da morte do doador, pesquisa de incompatibilidade, valor da creatinina antes da biópsia, presença de proteinúria antes da biópsia e se houve necessidade de diálise após o transplante.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo os pacientes que fizeram duas biópsias com intervalo mínimo de 1 ano e que realizaram a pesquisa do C4d nas duas biópsias.

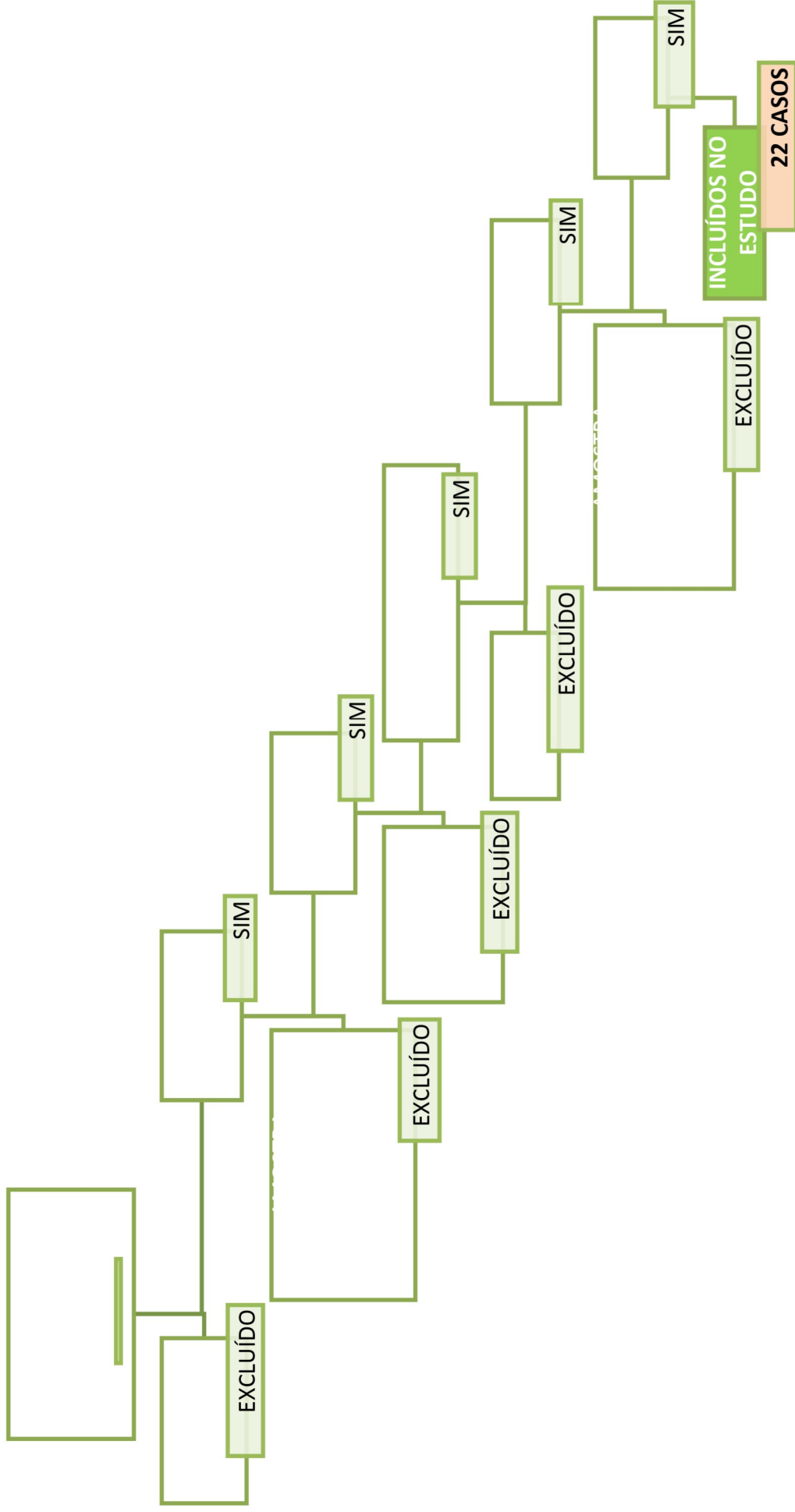
4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos todos os pacientes cujas amostras foram insatisfatórias (menos de 7 glomérulos e menos de 2 artérias), os não que não tinham realizado a segunda biópsia ou que apresentaram intervalo menor que 1 ano entre as duas biópsias, pacientes com recidiva da doença de base ou glomerulopatia “de novo”, bem como aqueles que não fizeram a pesquisa para o C4d nas duas biópsias.

Após todos os critérios de exclusão serem aplicados, a amostra definitiva para estudo constituiu de 22 casos.

A Figura 5 mostra o fluxograma com os critérios de inclusão e exclusão.

Figura 5. Fluxograma com critérios de inclusão e exclusão



Fonte: Elaborada pela autora.

4.6 ANÁLISE DE DADOS

Foram analisadas as lâminas das biópsias, com colorações em HE, PAS, Tricrômico de Masson e Prata Metanamina, da primeira e última biópsia dos pacientes selecionados.

Todas as lâminas foram avaliadas e reclassificadas pelos Critérios de Banff de 2019 para transplantes renais, localizado no anexo 3 (LOUPY *et al*, 2020). Todas as variáveis do protocolo do Banff 2019 foram comparadas entre os grupos (antigo e recente) e entre as duas amostras (T1 e T2).

Foram avaliadas também as lâminas coradas através de imuno-histoquímica pelo anticorpo anti-C4d (Anticorpo monoclonal de coelho anti-C4d humano, clone SP91, código M3914), arquivadas pelo Laboratório Biopse, correspondentes aos casos do Arquivo do DPML, que foram submetidas a coloração automatizada pelo sistema Roche-Ventana®, segundo especificações do fabricante (ROCHE, 2021).

As lâminas de IHQ foram analisadas por dois observadores, independentemente, sendo bom o grau de concordância através do coeficiente de Kappa ($\kappa = 0,72$), segundo Landis e Koch (1977; boa quando $\kappa = 0.61-0.8$).

Os pacientes foram classificados, de acordo com o tempo de evolução pós-transplante, em evolução curta (média 2 meses) ou longa (média 4 anos e 1 mês).

Os dados foram tabulados utilizando-se o programa Microsoft Excel e exportados para o SPSS e GraphPad Prism 9 no qual as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95%. Foram usados os testes exato de Fisher ou Qui-quadrado de Pearson para os dados categóricos e Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis/Dunn para os dados quantitativos.

4.7 ASPECTOS ÉTICOS

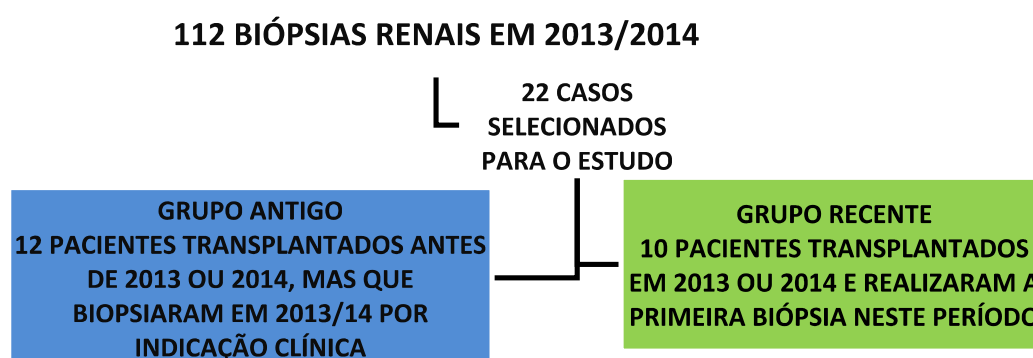
Este estudo foi realizado perante aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob o parecer de nº. 26154918.8.0000.5054. A investigadora principal e os demais colaboradores envolvidos no projeto utilizaram os dados provenientes dessa pesquisa apenas para os fins descritos e cumpriram todas as diretrizes e normas regulamentadoras descritas na Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, no que diz respeito ao sigilo e confidencialidade dos dados coletados.

Ressalta-se que a divulgação das informações coletadas ocorreu somente de forma anônima.

5 RESULTADOS

Durante os anos de 2013 e 2014 o serviço de Patologia do DPML recebeu 112 amostras de transplantes renais. Destes, 22 casos foram incluídos no estudo, uma vez que realizaram 2 biópsias com intervalo mínimo de 1 ano, sendo a primeira entre 2013 e 2014, a segunda após 1 ano, com a respectiva pesquisa de C4d por IHQ nas duas biópsias.

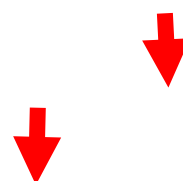
Figura 6. Fluxograma com a divisão dos pacientes em grupos recente e antigo



Fonte: Elaborada pela autora.

Os pacientes foram divididos em dois grupos denominados recente e antigo. Foi denominado grupo recente, os pacientes que fizeram o transplante em 2013 ou 2014 e a primeira biópsia renal feita logo após o transplante, em média 2 meses após o transplante. Foi denominado grupo antigo, aqueles cujo transplante foi realizado alguns anos antes, porém foram biopsiados em 2013 ou 2014, por indicação clínica. Neste grupo, o tempo médio de transplante antes da biópsia coletada em 2013 ou 2014 foi de 4 anos a 1 mês, variando de 1 ano e 1 mês até 15 anos e 7 meses.

Gráfico 1. Distribuição dos transplantes renais pelo ano de sua realização



Fonte: Elaborada pela autora.

Ressaltamos que em ambos os grupos, foram realizadas as 2 biópsias conforme descrito o primeiro parágrafo dos resultados e em ambas as biópsias, foi avaliado a expressão do C4d. A primeira amostra analisada em 2013 / 2014 foi chamada de T1 e a amostra subsequente, de T2.

Gráfico 2. Distribuição dos pacientes transplantados em relação à primeira biópsia renal pós-enxerto (T1): grupos antigo e recente.

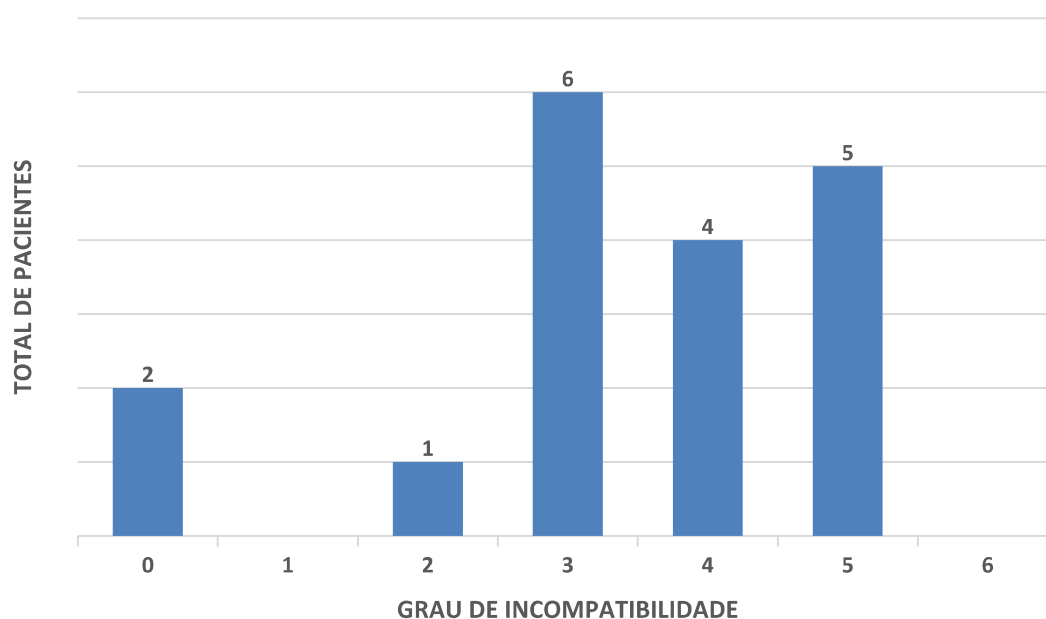
■ Grupo antigo
■ Grupo recente



Fonte: Elaborada pela autora.

Dos pacientes analisados, 14 (64%) eram do sexo masculino e 8 (36%) do sexo feminino; 3 (14%) pacientes receberam órgão de doador vivo e 19 (87%) de doador falecido, sendo morte por TCE a causa mais relatada. A idade média dos pacientes foi de 37 anos, sendo 19 anos a idade mínima encontrada e 63 anos a idade máxima. Com relação à pesquisa de incompatibilidade, 2 pacientes não tinham incompatibilidade (11%), 1 (6%) incompatibilidade 2, 6(33%) incompatibilidade 3, 4(22%) incompatibilidade 4, 5(28%) incompatibilidade 5; nenhum paciente apresentou incompatibilidade 1 e 6. Cinco pacientes não apresentaram proteinúria (36%) e 9 pacientes apresentaram (64%).

Gráfico 3. Distribuição dos pacientes transplantados em relação ao grau de incompatibilidade



Fonte: Elaborada pela autora.

A dosagem de creatinina sérica foi de 2.99 mg/dl \pm 2.92 mg/dl, sendo a mediana de 2,05mg/dl. A tabela 1 mostra algumas variáveis clínicas e laboratoriais comparando dois grupos de pacientes.

Tabela 1. Variáveis Clínicas e Laboratoriais relacionadas à primeira biópsia pós-transplante (T1), comparando os grupos antigo e recente.

	Tempo transplante		p-Valor
	Antigo	Recente	
Idade			
Até 30	5 (42%)	2 (20%)	0,277
>30	7 (58%)	8 (80%)	
Sexo			
Feminino	5 (42%)	3 (30%)	0,571
Masculino	7 (58%)	7 (70%)	
Doador			
Falecido	10 (83%)	9 (90%)	0,650
Vivo	2 (17%)	1 (10%)	
Incompatibilidade			
0	1 (12%)	1 (10%)	0,797
1	0 (0%)	0 (0%)	
2	1 (12%)	0 (0%)	
3	2 (25%)	4 (40%)	
4	2 (25%)	2 (20%)	
5	2 (25%)	3 (30%)	
6	0 (0%)	0 (0%)	
Proteinúria			
Não	2 (25%)	3 (50%)	0,334
Sim	6 (75%)	3 (50%)	
Creatinina prévia	2.17±1.29	3.98±3.98	0,151

*p<0,05, Valor de p calculado pelo Teste Qui-quadrado ou exato de Fisher (n, %).

Fonte: Elaborada pela autora.

A tabela 2 mostra a comparação das variáveis da Classificação do Banff 2019, na primeira biópsia (T1), entre os grupos recente e antigo.

Tabela 2. Achados morfológicos na primeira biópsia (T1) em relação ao tempo do transplante.

	Tempo transplante		p-Valor
	Antigo	Recente	
T1 i			
0	0 (0%)	1 (10%)	0,345
1	11 (92%)	8 (80%)	
2	1 (8%)	0 (0%)	
3	0 (0%)	1 (10%)	
T1 t			
0	12 (100%)	9 (90%)	0,262
1	0 (0%)	1 (10%)	
2, 3	0 (0%)	0 (0%)	
T1 v			
0	12 (100%)	10 (100%)	1,000
1, 2, 3	0 (0%)	0 (0%)	
T1 ptc			
0	10 (83%)	8 (80%)	0,500
1	2 (17%)	1 (10%)	
2	0 (0%)	1 (10%)	
T1 g			
0	11 (92%)	9 (90%)	0,361
1	1 (8%)	0 (0%)	
3	0 (0%)	1 (10%)	
T1 ah			
0	8 (67%)	7 (70%)	0,525
1	1 (8%)	1 (10%)	
2	1 (8%)	2 (20%)	
3	2 (17%)	0 (0%)	
T1 ci			
0	7 (58%)	10 (100%)	0,145
1	1 (8%)	0 (0%)	
2	3 (25%)	0 (0%)	
3	1 (8%)	0 (0%)	
T1 ct			
0	7 (58%)	10 (100%)	0,145
1	1 (8%)	0 (0%)	
2	3 (25%)	0 (0%)	
3	1 (8%)	0 (0%)	

Continuação da Tabela 2

	Tempo transplante		p-Valor
	Antigo	Recente	
T1 cv			
0	6 (50%)	5 (50%)	0,632
1	5 (42%)	5 (50%)	
2	1 (8%)	0 (0%)	
T1 cg			
0	11 (92%)	10 (100%)	0,350
1	1 (8%)	0 (0%)	
T1 ti			
0	0 (0%)	1 (10%)	0,267
1	8 (67%)	8 (80%)	
2	4 (33%)	1 (10%)	
T1 i IF TA			
0	7 (58%)	10 (100%)	0,067
1	2 (17%)	0 (0%)	
2	3 (25%)	0 (0%)	
T1 t IF TA			
0	11 (92%)	10 (100%)	0,350
1	1 (8%)	0 (0%)	
T1 NTA			
0	10 (83%)	6 (60%)	0,221
1	2 (17%)	4 (40%)	
T1 C4d			
Não	5 (42%)	4 (40%)	0,937
Sim	7 (58%)	6 (60%)	

*p<0,05, Valor de p calculado pelo Teste Qui-quadrado ou exato de Fisher (n, %).

**De acordo com a classificação de Banff de 2019 –anexo 3.

Fonte: Elaborada pela autora.

A tabela 3 mostra a comparação das variáveis na segunda biópsia (T2), entre os grupos recente e antigo. A segunda biópsia foi realizada no mínimo 1 ano após a primeira biópsia. O intervalo médio de acompanhamento foi de 5 anos e 7 meses, sendo o menor intervalo 1 ano e o maior intervalo 19 anos, sendo este doador vivo.

Tabela 3. Achados morfológicos da segunda biópsia (T2) em relação à evolução do transplante, comparando os grupos antigo e recente.

	Tempo transplante		p-Valor
	Antigo	Recente	
T2 i			
0	0 (0%)	3 (30%)	0,093
1	11 (92%)	7 (70%)	
3	1 (8%)	0 (0%)	
T2 t			
0	11 (92%)	9 (90%)	0,892
1	1 (8%)	1 (10%)	
T2 v			
0	12 (100%)	9 (90%)	1,000
1	0 (0%)	1 (10%)	
T2 ptc			
0	12 (100%)	10 (100%)	1,000
1	0 (0%)	0 (0%)	
T2 g			
0	12 (100%)	9 (90%)	0,262
1	0 (0%)	1 (10%)	
T2 ah			
0	3 (25%)	4 (40%)	0,849
1	2 (17%)	2 (20%)	
2	5 (42%)	3 (30%)	
3	2 (17%)	1 (10%)	
T2 ci			
0	1 (8%)	7 (70%)*	0,029
1	3 (25%)*	1 (10%)	
2	5 (42%)*	1 (10%)	
3	3 (25%)*	1 (10%)	

	Tempo transplante		p-Valor
	Antigo	Recente	
T2 ct			
0	1 (8%)	7 (70%)*	0,026
1	3 (25%)*	1 (10%)	
2	6 (50%)*	1 (10%)	
3	2 (17%)	1 (10%)	
T2 cv			
0	3 (25%)	4 (44%)	0,558
1	5 (42%)	2 (22%)	
2	4 (33%)	3 (33%)	
T2 cg			
0	9 (75%)	7 (70%)	0,528
1	2 (17%)	3 (30%)	
3	1 (8%)	0 (0%)	
T2 ti			
0	0 (0%)	2 (20%)	0,137
1	5 (42%)	6 (60%)	
2	6 (50%)	1 (10%)	
3	1 (8%)	1 (10%)	
T2 i IF TA			
0	1 (8%)	7 (70%)*	0,021
1	4 (33%)	1 (10%)	
2	6 (50%)*	1 (10%)	
3	1 (8%)	1 (10%)	
T2 t IF TA			
0	11 (92%)	10 (100%)	0,350
1	1 (8%)	0 (0%)	
T2 NTA			
0	11 (92%)	8 (80%)	0,427
1	1 (8%)	2 (20%)	
T2 C4d			
Não	5 (42%)	6 (60%)	0,392
Sim	7 (58%)	4 (40%)	

*p<0,05, Valor de p calculado pelo Teste Qui-quadrado ou exato de Fisher (n, %).

**De acordo com a classificação de Banff de 2019 –anexo 3.

Fonte: Elaborada pela autora.

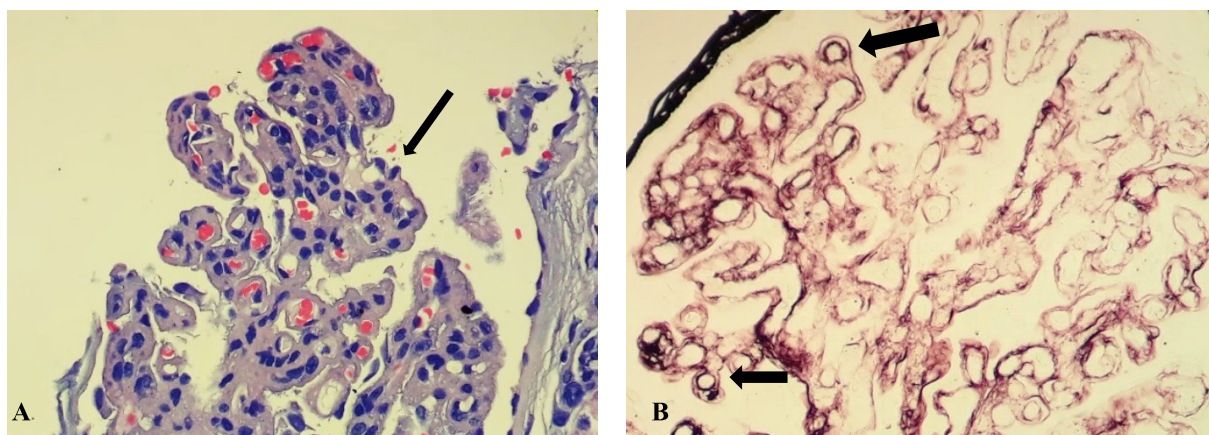
Avaliando a biópsia de seguimento dos pacientes do grupo antigo, os que transplantaram o rim antes de 2013/2014, há piora dos critérios do Banff de cronicidade (fibrose intersticial, atrofia tubular e inflamação nas áreas de IF/TA), quando comparados com a biópsia de seguimento do grupo recente. Houve piora também em relação à glomerulopatia do transplante (cg) e inflamação em área de IF/TA (i-IF/TA), nos dois grupos.

Como pode ser observado na Tabela 3, as variáveis de cronicidade foram predominantes no grupo antigo em relação ao grupo recente, nos seguintes critérios de BANFF 2019:

- T2 ci: antigo 92% & 30% do recente, $p= 0,029$;
- T2 ct: antigo 92% & 30% do recente, $p= 0,026$;
- T2 i IF/TA : antigo 92% & 30% do recente, $p= 0,021$;

A figura 7 revela o espessamento das alças glomerulares com duplo contorno, alteração típica da Glomerulopatia do Transplante (cg), característica da RMA crônica e associada à proteinúria.

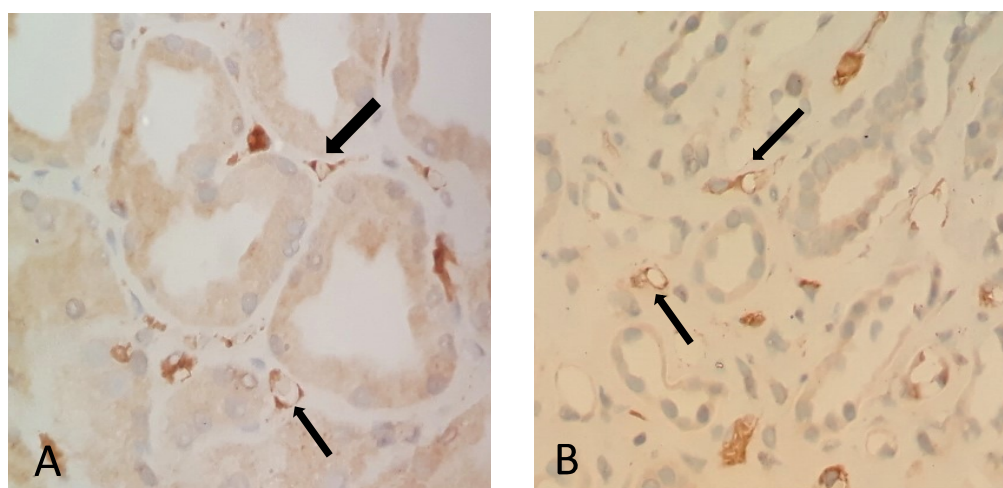
Figura 7. Glomerulopatia do transplante – biópsia realizada no seguimento do paciente (T2), 5 anos após o transplante. Observar as alças capilares com duplo contorno (setas). Microscopia ótica, , 400x. **A)** Hematoxilina e Eosina. **B)** Prata Metenamina



Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 8 é possível observar a expressão do C4d nos capilares peritubulares de um mesmo paciente, ao longo de 3 anos.

Figura 8. Expressão do C4d por imuno-histoquímica. Observar a marcação linear /circular acastanhada dos capilares peritubulares (setas) - Microscopia ótica, 400x. **A)** C4d positivo nos capilares em 2014. **B)** Após 3 anos, há atrofia tubular e fibrose intersticial e a expressão do C4d permaneceu positiva nos capilares peritubulares.



Fonte:

Elaborada pela autora.

Foi avaliado também o status da expressão do C4d ao longo da evolução do transplante e em relação às variáveis clínicas. Os resultados são exibidos na tabela 4. Os pacientes que mantiveram a marcação para C4d ao longo da evolução do transplante mostraram forte associação com proteinúria. Todos os casos com proteinúria, mantiveram o *status* inalterado de C4d, com $p < 0,032$.

Tabela 4. Expressão do C4d em biópsias assíncronas em transplantados e avaliação do *status* de C4d ao longo da evolução do transplante

	Total	T1 C4d		p-Valor	T2 C4d		p-Valor	Variacã
		Não	Sim		Não	Sim		Diminuiu
Idade								
Até 30	7 (32%)	3 (33%)	4 (31%)	0,899	3 (27%)	4 (36%)	0,647	1 (33%)
>30	15 (68%)	6 (67%)	9 (69%)		8 (73%)	7 (64%)		2 (67%)
Sexo								
Feminino	8 (36%)	2 (22%)	6 (46%)	0,251	2 (18%)	6 (54%)	0,076	1 (33%)
Masculino	14 (64%)	7 (78%)	7 (54%)		9 (82%)	5 (45%)		2 (67%)
Doador								
Falecido	19 (86%)	8 (89%)	11 (85%)	0,774	10 (91%)	9 (82%)	0,534	3 (100%)
Vivo	3 (14%)	1 (11%)	2 (15%)		1 (9%)	2 (18%)		0 (0%)

Incompatibilidade											
0	2 (11%)	0 (0%)	2 (20%)	0,319	0 (0%)	2 (22%)	0,525	0 (0%)	2 (13%)	0 (0%)	0,764
2	1 (6%)	1 (12%)	0 (0%)		1 (11%)	0 (0%)		0 (0%)	1 (7%)	0 (0%)	
3	6 (33%)	2 (25%)	4 (40%)		3 (33%)	3 (33%)		1 (50%)	5 (33%)	0 (0%)	
4	4 (22%)	3 (37%)	1 (10%)		2 (22%)	2 (22%)		0 (0%)	3 (20%)	1 (100%)	
5	5 (28%)	2 (25%)	3 (30%)		3 (33%)	2 (22%)		1 (50%)	4 (27%)	0 (0%)	
Proteinúria											
Não	5 (36%)	2 (33%)	3 (37%)	0,872	3 (43%)	2 (29%)	0,577	2 (100%)*	2 (18.2%)	1 (100%)*	0,032
Sim	9 (64%)	4 (67%)	5 (62%)		4 (57%)	5 (71%)		0 (0%)	9 (81.8%)*	0 (0%)	
Creatinina prévia											
Média ± DP	2.99±2.92	2.97±3.54	3.01±2.56	0,975	3.17±3.29	2.81±2.65	0,778	3.60±1.91	2.91±3.17	2.60	0,929

*p<0,05, Teste Qui-quadrado ou exato de Fisher (n, %) ou Mann-Whitney/Kruskal-Wallis (média ± DP).

**Status = manutenção da expressão ou ausência de expressão do C4d.

Fonte: Elaborada pela autora.

Enquanto na Tabela 4 foi avaliado o status de C4d no conjunto dos grupos Antigo + Recente, em seguida, foi verificado esse *status* de C4d discriminando entre os 2 sub-grupos citados (Antigos & Recentes). Os resultados estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Comparação do *status* do C4d levando-se em conta a 1ª e 2ª biópsias, entre os grupos Antigo e Recente de transplantados renais.

BANFF	Variação C4d (T1 para T2) (Antigo)				Variação C4d (T1 para T2) (Recente)			
	Diminuiu	Manteve	Aumentou	p-Valor	Diminuiu	Manteve	Aumentou	p-Valor
T2 i								
0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,002	1 (50%)	2 (25%)	0 (0%)	0,490
1	1 (100%)*	10 (100%)*	0 (0%)		1 (50%)	6 (75%)	0 (0%)	
2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
3	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)*		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
T2 t								
0	1 (100%)*	10 (100%)*	0 (0%)	0,002	2 (100%)	7 (87%)	0 (0%)	0,598
1	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)*		0 (0%)	1 (12%)	0 (0%)	

*p<0,05, Teste Qui-quadrado ou exato de Fisher (n, %) ou Mann-Whitney/Kruskal-Wallis (média ± DP).

***Status* = manutenção da expressão ou ausência de expressão do C4d.

Fonte: Elaborada pela autora.

A tabela 6 compara a marcação do C4d em relação ao intervalo da biópsia, demonstrando se houve mudança do *status*, ou seja, se negativou (positivo→negativo), permaneceu (negativo→negativo ou positivo→ positivo) ou positivou (negativo → positivo), bem como compara os grupos recente e antigo.

Tabela 6. Condição (*status*) do C4d em relação ao intervalo da biópsia e aos grupos recente e antigo.

	Tempo transplante		p-Valor
	Antigo	Recente	
T2 T1 C4d			
Diminuiu	1 (8%)	2 (20%)	0,500
Manteve	10 (83%)	8 (80%)	
Aumentou	1 (8%)	0 (0%)	
T2 T1 C4d			
Diminuiu	1 (8%)	2 (20%)	0,427
Manteve/Aumentou	11 (92%)	8 (80%)	

* $p < 0,05$, Valor de p calculado pelo Teste Qui-quadrado ou exato de Fisher (n, %).

***Status* = manutenção da expressão ou ausência de expressão do C4d.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados mostram que, no grupo Antigo, no critério T2 i de Banff, a grande maioria de casos com lesão discreta (grau1) manteve o status (10/11=91%; $p=0,002$) e o único caso com escore máximo (=3) apresentou aumento na expressão de C4d. No critério T2 t, a manutenção do status foi muito predominante no escore negativo (também 10/11=91%; $p=0,002$). Não houve diferença significativa entre os escores, nos dois critérios, no grupo Recente.

6 DISCUSSÃO

O C4d tem sido considerado de forma ambígua, controversa, como elemento do sistema Banff, referência mundial de protocolos para rejeição de transplantes renais: inicialmente incluído como marcador de RMA; depois retirado como critério da mesma RMA; e atualmente, voltou a ter protagonismo (HASS M. *et al*, 2018). C4d no contexto da rejeição a transplantes, tem sido detectado, por IHQ ou imunofluorescência, no mesângio, membrana basal glomerular, membrana basal tubular, arteríolas e íntima arterial.

Embora a Imunofluorescência seja mais sensível, requer uma biópsia extra, o que nem sempre é possível, bem como utilização da solução de Michel e refrigeração da amostra. Pelo método de IHQ a marcação para C4d é considerada positiva apenas nos capilares peritubulares e tem uma especificidade de 98% quando comparado com a Imunofluorescência e sensibilidade de 87,5% (ETTA, 2020). Nesse estudo a avaliação do C4d foi feito apenas pelo método de IHQ, sendo avaliadas por dois observadores, cujo grau de concordância foi bom - coeficiente de Kappa $\hat{k} = 0,72$ (LANDIS, KOCH, 1977).

Este estudo mostrou uma prevalência de 59% de positividade para o C4d na primeira biópsia, sendo a maior parte dos casos C4d+ do grupo antigo. Nas biópsias de seguimento, 50% apresentaram C4d+. O resultado encontrado está pouco acima do relatado na literatura, que varia de 30 a 45%, porém alguns estudos demonstraram C4d+ em 61% das biópsias diagnosticadas como rejeição crônica (CARPIO, 2011).

A RMA é considerada a principal causa de perda do enxerto renal a longo prazo. De acordo com MENGEL, *et al* (2012), há muitos desafios no diagnóstico de RMA, e as características morfológicas para o diagnóstico dependem do tempo do curso da doença e há grande variabilidade individual. Os autores ainda apontam que o termo crônico não está

relacionado com o tempo pós-transplante, mas com as alterações morfológicas de remodelação da membrana basal e endotelial, devido à injúria mediada pelos anticorpos.

Neste sentido, o presente estudo buscou separar os pacientes em dois grupos: os que transplantaram antes de 2013/2014, denominado grupo antigo, e os que transplantaram em 2013/2014, denominado grupo recente, sendo avaliadas e comparadas as biópsias realizadas pelos grupos.

No grupo denominado antigo, os pacientes já haviam realizado o transplante antes da biópsia realizada em 2013/2014, em média 4 anos e 1 mês antes, mas com grande variabilidade: mínimo de 1 ano e 1 mês e máximo de 15 anos e 7 meses. No grupo denominado recente, os pacientes fizeram o transplante em 2013/2014 e realizaram a biópsia em média 2 meses após o transplante, variando de 14 dias a 9 meses.

Embora os rins transplantados do grupo antigo já estivessem expostos às alterações hemodinâmicas e aos anticorpos anti-HLA há mais tempo que os do grupo recente, a Tabela 2 que compara as alterações morfológicas da primeira biópsia (T1) não mostrou alterações morfológicas estatisticamente significativas entre os grupos, embora o grupo antigo apresentou maiores escores nos marcadores de cronicidade (ci, ct, cg, i-IF/TA).

Na tabela 3, foram comparadas as biópsias de seguimento (T2) dos grupos antigo e recente. O tempo médio de acompanhamento dos pacientes foi de 5 anos e 7 meses, sendo o intervalo mínimo de 1 ano e o máximo de 19 anos, da data do transplante. Nesta tabela, os pacientes do grupo antigo tiveram piora nos critérios de cronicidade, tanto piora da atrofia tubular (ct), quanto na fibrose intersticial (ci), bem como mais células inflamatórias em áreas de atrofia (i-IF/TA) e glomerulopatia do transplante (cg), quando comparados com os pacientes do grupo recente.

Essa inflamação intersticial reflete uma resposta da agressão aos néfrons e do tecido renal como um todo. Estudos moleculares demonstraram que as doenças crônicas progressivas apresentam aumentos dos ENDATs (HAAS M. *et al*, 2018). Segundo os autores, apesar de i-IF/TA ser uma alteração morfológica inespecífica, estudos recentes apontam ser uma manifestação da Rejeição Mediada por células T.

MENGEL, *et al* também demonstraram que em pacientes pré-sensibilizados, inflamação subclínica na microcirculação persistente, ou seja, capilarite e / ou glomerulite, leva à doença crônica com remodelação microvascular (glomerulopatia de transplante e multilaminação dos capilares peritubulares).

É importante ressaltar também que IF/TA diminui a sobrevida do enxerto, mas em associação com inflamação em qualquer intensidade, o prognóstico é pior do que a fibrose isolada (MANNON *et al*, 2010).

A presença de tubulite nas áreas de atrofia também está relacionado com perda do enxerto ao longo do tempo, mas apenas 1 amostra apresentou esta alteração.

No presente estudo, dos 22 casos analisados, 6 apresentaram glomerulopatia do transplante (28%), sendo 3 dos grupo antigo e 3 do grupo recente, sendo 4 C4d + e 2 C4d-. Embora na literatura a glomerulopatia do transplante frequentemente está associada ao C4d- (MENGEL *et al*, 2012), os achados do presente estudo não foram estatisticamente significantes. A ausência de marcação para o C4d pode indicar a participação da Rejeição mediada por células T na patogênese da Glomerulopatia do transplante (FILIPPONE, 2018). O estudo de STEGALL, 2018, mostrou que a glomerulopatia do transplante foi o achado histológico mais encontrado precedendo a perda do transplante, seguida por rejeição mista mediada por anticorpo e por células T.

Na tabela 4, estão representados os dados da avaliação do *status* de C4d ao longo da evolução do transplante, verificando-se a manutenção ou não desse *status*. A manutenção do

status (negativo persistindo negativo; ou positivo persistindo positivo) da 1ª para a 2ª biópsia foi fortemente relacionada à presença de Proteinúria, achado clinicamente significativo e segundo o levantamento atual na bibliografia sobre o assunto, um dado original. Nesta tabela, os resultados expressos não distinguem entre os grupos Antigo e Recente. Essa distinção foi realizada posteriormente e foi representada na tabela 5.

Nesta tabela, demonstrou-se que em dois dos critérios histológicos de Banff, T2 i e T2 t, manteve-se o status de C4d, apenas no grupo Antigo, um dado significativo para a valorização do status de C4d em relação à rejeição crônica do transplante renal.

Embora o Hospital Universitário Walter Cantídio seja uma das referências para transplante renal no estado do Ceará, a amostra populacional estudada foi pequena o que limitou o estudo do mesmo modo que a falta de alguns dados clínicos como pesquisa de proteinúria/creatinina na segunda biópsia e dosagem de DSA.

Futuros estudos com maior amostra populacional são importantes para avaliarmos melhor os pacientes deste serviço, buscando intercâmbio da Patologia com a Clínica para maior entendimento sobre a possível participação de C4d na patogênese da rejeição no transplante renal, bem como da possível associação de sua positividade ou negatividade com variáveis clínicas ou outros critérios considerados nos protocolos de rejeição a enxertos.

7 CONCLUSÃO

As conclusões levantadas neste estudo mostram piora dos critérios de Banff (atrofia tubular, fibrose intersticial e inflamação nas áreas de IF/TA) ao longo da evolução do transplante, especialmente nos pacientes transplantados há mais tempo. Houve uma forte associação da manutenção do status do C4d com proteinúria, assim como a manutenção do status do C4d está associada a casos leves de inflamação (i1) para os pacientes transplantados a mais tempo. A positividade para o C4d se relacionou com piora na inflamação (i3) para os pacientes transplantados a mais tempo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHATTI, Adnan; USMAN, Muhammad. Chronic Renal Transplant Rejection and Possible Anti-Proliferative Drug Targets. **Cureus**, v. 7, n. 11, p. 376, 2015.

BHOWMIK, Dipankar *et al.* The evolution of the Banff classification schema for diagnosing renal allograft rejection and its implications for clinicians. **Indian J Nephrol**, v. 20, n. 1, p. 2-8, 2010.

BOTERMANS, Johanna *et al.* C4d Staining In Renal Allograft Biopsies with Early Acute Rejection and Subsequent Clinical Outcome. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 6, n. 5, p. 1207-13, 2011.

CARDINAL, Heloise; DIEUDÉ, Mélanie; HEBERT, Marie-Josée. Endothelial Dysfunction in Kidney Transplantation. **Front Immunol**, n. 23, p. 9:1130, 2018.

CARPIO, Virna *et al.* Clinical and pathological correlations of C4d immunostaining and its influence on the outcome of kidney transplant recipients. **Braz. J. Nephrol.**, n. 3, p. 329-337, Sep. 2011.

COHEN, Danielle *et al.* Pros and Cons for C4d as a Biomarker. **Kidney Int**, v. 81, n. 7, p. 628-39, 2012.

COLVIN, Robert; SMITH, Neal. Antibody-mediated organ-allograft rejection. **Nat Rev Immunol**, n. 5, p. 807–817, 2005.

DEVADASS, Clement *et al.* Evaluation of Renal Allograft Biopsies for Graft Dysfunction and Relevance of C4d Staining in Antibody Mediated Rejection. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 3, p. 11-5, 2016.

DJAMALI, Arjang *et al.* Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. **Am J Transplant**, v. 14, n. 2, p. 255-71, 2014.

DOMINY, Katherin *et al.* Molecular Assessment of C4d-Positive Renal Transplant Biopsies Without Evidence of Rejection. **Kidney Int Reports**, v. 4, n. 1, p. 148–158, 2019.

ETTA, Praveen Kumar. C4d staining and antibody-mediated rejection in renal transplantation: Current status. **Indian J Transplant**, n. 14, p. 197-201, 2020.

FILIPPONE, Edward; McCUE, Peter; FARBER, John. Transplant glomerulopathy. **Mod Pathol.**, v. 31, n. 2, p. 235-252, 2018.

GARCES Jorge Carlos *et al.* Antibody-Mediated Rejection: A Review. **Ochsner J**, v.17, n. 1, p. 46–55, 2017.

GARG, Neetika *et al.* Defining the phenotype of antibody-mediated rejection in kidney transplantation: Advances in diagnosis of antibody injury. **Transplant Rev**, v. 31, n. 4, p. 257-267, 2017.

GOUTAUDIER, Valentin *et al.* C5b9 Deposition in Glomerular Capillaries Is Associated With Poor Kidney Allograft Survival in Antibody-Mediated Rejection. **Front Immunol**, v. 8, n. 10, p. 235, 2019.

HAAS, Mark *et al.* Banff 2013 Meeting Report: Inclusion of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection and Antibody-Associated Arterial Lesions. **American Journal of Transplantation**, n. 14, p. 272–283, 2014.

HAAS, Mark *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**, n. 18, p. 293–307, 2018.

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

HABETS, Thomas *et al.* The prevalence of antibodies against the HLADRB3 protein in kidney transplantation and the correlation with HLA expression. **PLoS One**, v. 13, n. 9, 2018.

HASSAN, Rashad; AKL, Ahamed. Current and Future Directions in Antibody-Mediated Rejection Post Kidney Transplantation. **Conference Proceedings**, 2013.

KHAIRWA, Anju. The relevance of complement C4d staining in renal allograft biopsies. **Indian J Transplant**, n. 14, p. 94-8, 2020.

KLEIN, Brennan. C4d staining in renal allografts and treatment of antibody mediated rejection. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/c4d-staining-in-renal-allografts-and-treatment-of-antibody-mediated-rejection>. Acesso em: 04 mai 2019.

LANDIS J Richard; KOCH Gg. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, n 33, p. 159-75, 1977.

LEE, Yoo Jin *et al.* Combination of Glomerular C4d and Morphologic Glomerular Lesions as a Possible Indicator in the Diagnosis of Acute or Chronic Active Antibody-Mediated Rejection. **Transplant Proc**, v. 51, n. 8, p. 2660-2666, 2019.

LOUPY, Alexandre *et al.* The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. **American Journal of Transplantation**, v. 17, n. 1, p. 28-41, 2017.

LOUPY, Alexandre *et al.* The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. **American Journal of Transplantation**, n. 17, p. 28–41, 2017.

LOUPY, Alexandre *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**, n. 20, p. 2318–2331, 2020.

MANNON, Rosilyn *et al.* Inflammation in Areas of Tubular Atrophy in Kidney Allograft Biopsies: A Potent Predictor of Allograft Failure. **American Journal of Transplantation**, n. 10, p. 2066–2073, 2010.

MARX, David *et al.* Proteomics in Kidney Allograft Transplantation–Application of Molecular Pathway Analysis for Kidney Allograft Disease Phenotypic Biomarker Selection. **Proteomics Clin Appl**, v. 13, n. 2, 2019.

MENGEL, Michael *et al.* Banff 2011 Meeting Report: New Concepts in Antibody-Mediated Rejection. **Am J Transplant**, v. 12, n. 3, p. 563–570, 2012.

NIGAM, Lovelesh Kumar *et al.* C4d-negative antibody-mediated rejection: A pathologist's perspective and clinical outcome. **Saudi J Kidney Dis Transpl.**, v. 29, n. 1, p. 39-49, 2018.

PUTTARAJAPPA, Chetan *et al.* Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation: A Review. **Journal of Transplantation**, n. 2012, 2012.

QUAGLIA, Marco *et al.* Recent Advances on Biomarkers of Early and Late Kidney Graft Dysfunction. **Int. J. Mol. Sci**, n. 21, p. 5404, 2020.

RACUSEN, Lorraine *et al.* Antibody-Mediated Rejection Criteria – an Addition to the Banff 097 Classification of Renal Allograft Rejection. **American Journal of Transplantation**, n. 3, p. 708–714, 2003.

RACUSEN, Lorraine *et al.* The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. **Kidney International**, n. 55, p. 713–723, 1999.

RACUSEN, Lorraine; HALLORAN, Philip; SOLEZ, Kim. Banff 2003 Meeting Report: New Diagnostic Insights and Standards. **American Journal of Transplantation**, n. 4, p. 1562–1566, 2004.

ROCHE. Roche no Diagnóstico de tecido. Disponível em: <https://www.roche.com.br/pt/diagnostica/diagnostico-de-tecidos.html>. Acesso em 17.11.2021.

ROUFOSSE, Candice *et al.* A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. **Transplantation**, v. 102, n. 11, p. 1795 – 1814, 2018.

SELLARÉS, Joana *et al.* Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. **American Journal of Transplantation**, v. 13, n 4, p. 971-983, 2013.

SENEV, Aleksandar *et al.* Histological picture of antibody-mediated rejection without donor-specific anti-HLA antibodies: Clinical presentation and implications for outcome. **American Journal of Transplantation**, v. 19, n. 3, p. 763-780, 2019.

SIS, Banu *et al.* Banff '09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups. **American Journal of Transplantation**, n. 10, p. 464–471, 2010.

SIS, Banu *et al.* Endothelial Gene Expression in Kidney Transplants with Alloantibody Indicates Antibody-Mediated Damage Despite Lack of C4d Staining. **American Journal of Transplantation**, n. 9, p. 2312–2323, 2009.

SIS, Banu; HALLORAN, Philip. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. **Curr Opin Organ Transplant**, v. 15, n. 1, p. 42-8, 2010.

SOARES, Maria. Fernandes; FRANCO, Marcello. Aplicações da Biologia Molecular à Patologia Renal: Revisão da Literatura. **J Bras Nefrol**, v. 29, n. 2, 2007.

SOLEZ Kim *et al.* International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banif working classification of kidney transplant pathology. **Kidney International**, n. 44, p. 411—422, 1993.

SOLEZ, Kim *et al.* Banff '05 Meeting Report: Differential Diagnosis of Chronic Allograft Injury and Elimination of Chronic Allograft Nephropathy ('CAN'). **American Journal of Transplantation**, n. 7, p. 518–526, 2007.

SOLEZ, Kim *et al.* Banff 07 Classification of Renal Allograft Pathology: Updates and Future Directions. **American Journal of Transplantation**, n. 8, p. 753–760, 2008.

STEGALL, Mark *et al.* Renal Allograft Histology at 10 Years After Transplantation in the Tacrolimus Era: Evidence of Pervasive Chronic Injury. **American Journal of Transplantation**, n. 18, p. 180–188, 2018.

STEGALL, Mark; CHEDID, Marcio; CORNELL, Lynn. The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. **Nat Rev Nephrol**, v. 8, n. 11, p. 670–8, 2012.

TROXELL, Megan *et al.* Comparison of C4d Immunostaining Methods in Renal Allograft Biopsies. **Clin J Am Soc Nephro**, v. 1, n. 3, p. 583–9, 2006.

WANG, Shuo *et al.* Endothelial Cells in Antibody-Mediated Rejection of Kidney Transplantation: Pathogenesis Mechanisms and Therapeutic Implications. **J Immunol Res.**; n. 2017, 2017.

ZHANG, Rubin. Donor-specific antibodies in kidney transplant recipients. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 1, p. 182–192, 2017.

APÊNDICE A

Dados clínicos

	PRONTUÁRIO	IDADE	SEXO M/F	DOADOR C/V	INCOMPATI BILIDADE	CREATININA SÉRICA	PROTEINÚRI A
Paciente 1							
Paciente 2							
Paciente 3							
Paciente 4							
Paciente 5							
Paciente 6							
Paciente 7							
Paciente 8							
Paciente 9							
Paciente 10							
Paciente 11							
Paciente 12							
Paciente 13							
Paciente 14							
Paciente 15							
Paciente 16							
Paciente 17							
Paciente 18							
Paciente 19							
Paciente 20							
Paciente 21							
Paciente 22							

ANEXO 1

Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará

ANEXO 1. Continuação.

ANEXO 1. Continuação.

ANEXO 1. Continuação.

ANEXO 2

Rejeição Mediada por Anticorpos ao longo das Classificações de Banff.

CLASSIFICAÇÃO BANFF: REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS	
BANF '91	<ul style="list-style-type: none"> • Rejeição hiperaguda, por provável DSA: polimorfonucleares em PTC e glomérulos -Definição de Glomerulopatia do Transplante <ul style="list-style-type: none"> -precoce (cg - mononucleares) -tardia
BANF '97	<ul style="list-style-type: none"> • RMA: DSA+ <ul style="list-style-type: none"> -hiperaguda -tardia -Mantido definição de glomerulite
BANF F '03	<ul style="list-style-type: none"> • RMA: C4d+/DSA+ -Definição de escores para ptc -Sugestão para realização de C4d em todos os casos de tx
BANF F '05	<ul style="list-style-type: none"> • RMA aguda: C4d+/DSA+ <ul style="list-style-type: none"> -NTA símile, inflamação mínima -Marginação capilar (g ou ptc) e/ou trombose -Vasculite v3 • RMA crônica ativa: C4d+/DSA+ <ul style="list-style-type: none"> -duplo contorno (cg) e/ou -multilaminação ptc e/ou -IF/TA e/ou -espessamento fibroso intimal (cv)

Fonte: Elaborado pelo autor e adaptado dos relatórios de Banff de 1997 à 2019.

ANEXO 2. Continuação.

CLASSIFICAÇÃO BANFF: REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS	
<p>➢ C4d para todos os tx</p> <p>-Incorporado escore para ptc</p> <p>-Novo critério para C4d</p> <p>Alteração mediada por AC:</p> <ul style="list-style-type: none"> • C4d+/DAS+, sem evidência de RMA • RMA aguda: C4d+/DSA+ -NTA símile -ptc/g>0 e/ou trombose -Vasculite v3 <p>BANF F '07</p>	<ul style="list-style-type: none"> • RMA crônica ativa: C4d+/DSA+ -duplo contorno (cg) e/ou -multilaminação ptc e/ou -IF/TA e/ou -espessamento fibroso intimal (cv) <ul style="list-style-type: none"> • Suspeito: C4d+/DSA- na presença de alterações morfológicas
<p>Alteração mediada por AC:</p> <ul style="list-style-type: none"> • C4d+/DAS+, sem evidência de RMA, RMT, sem NTA • RMA aguda: C4d+/DSA+ -NTA símile -ptc/g>0 e/ou trombose -Vasculite v3 <p>BANF '09</p>	<ul style="list-style-type: none"> • RMA crônica ativa: C4d+/DSA+ -duplo contorno (cg) e/ou -multilaminação ptc e/ou -IF/TA e/ou -espessamento fibroso intimal (cv) ➢ Suspeito: C4d+/DSA- na presença de alterações morfológicas
<p>Mantido a tabela das categorias</p> <p>BANF '11</p> <p>RMA aguda/ativa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evidência histológica de agressão tecidual: -inflamação na microcirculação (ptc/g>0) -NTA sem outras causas evidentes - MAT aguda sem outras causas evidentes -arterite (v>0) • Evidência de interação recente de AC ao endotélio: C4d>0 (IHQ) ou g+ptc≥2 ou ↑ENDAT • DSA positivo <p>BANF F '13</p>	<p>RMA crônica ativa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evidência histológica de cronicidade tecidual: cg>0, Multilaminação da tubular, fibrose intimal • Evidência de interação recente de AC ao endotélio: C4d>0 (IHQ) ou g+ptc≥2 ou ↑ENDAT DSA positivo <p>C4d+ sem evidência de rejeição:</p> <p>C4d>0 (IHQ), linear g0; ptc0; cg0; v0; sem multilaminação da tubular sem lesão tubular aguda sem rejeição mediada por células T ou suspeito</p> <p>Suspeito: C4d+/DSA- na presença de alterações morfológicas</p>

Fonte: Elaborado pelo autor e adaptado dos relatórios de Banff de 1997 à 2019.

ANEXO 2. Continuação.

CLASSIFICAÇÃO BANFF: REJEIÇÃO MEDIADA POR ANTICORPOS	
BANF '15 Mantido a tabela das categorias	<p>RMA ativa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evidência histológica de agressão tecidual: -inflamação na microcirculação (ptc/g>0) -NTA sem outras causas evidentes - MAT aguda sem outras causas evidentes -arterite (v>0) • Evidência de interação recente de AC ao endotélio: C4d>0 (IHQ) ou g+ptc≥2 ou ↑ENDATs • Evidência de DSA: C4d+ ou ↑ENDATs <p>RMA crônica ativa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evidência histológica de cronicidade tecidual: cg>0, Multilaminação da tubular, fibrose intimal • Evidência de interação recente de AC ao endotélio: C4d>0 (IHQ) ou g+ptc≥2 ou ↑ENDAT • Evidência de DSA: C4d+ ou ↑ENDATs <p>RMA crônica</p> <ul style="list-style-type: none"> • cg>0, sem evidência de interação recente de AC • diagnóstico prévio de RMAativa ou crônica ativa <p>C4d+ sem evidência de rejeição:</p> <ul style="list-style-type: none"> -C4d>0 (IHQ) -g0; ptc0; cg0; v0; -sem multilaminação da tubular -sem lesão tubular aguda -sem rejeição mediada por células T ou suspeito -evidência de ENDATs <p>➤ Suspeito: eliminando</p>
BANF '17	<p>RMA aguda/ativa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evidência histológica de agressão tecidual: -inflamação na microcirculação (ptc/g>0) -NTA sem outras causas evidentes - MAT aguda sem outras causas evidentes -arterite (v>0) • Evidência de interação recente de AC ao endotélio: C4d>0 (IHQ) ou g+ptc≥2 ou ↑ENDAT • DSA positivo ou evidência de DAS (C4d+ ou ↑ENDATs) <p>RMA crônica ativa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evidência histológica de cronicidade tecidual: cg>0, Multilaminação da tubular, fibrose intimal • Evidência de interação recente de AC ao endotélio: C4d>0 (IHQ) ou g+ptc≥2 ou ↑ENDAT • DSA positivo ou evidência de DAS (C4d+ ou ↑ENDATs) <p>RMA crônica</p> <ul style="list-style-type: none"> • cg>0, sem evidência de interação recente de interação recente de • diagnóstico prévio de RMAativa ou crônica ativa <p>C4d+ sem evidência de rejeição:</p> <ul style="list-style-type: none"> -C4d>0 (IHQ) -g0; ptc0; cg0; v0; -sem multilaminação da tubular -sem lesão tubular aguda -sem rejeição mediada por células T ou suspeito -evidência de ENDATs
BANF F '19	<p>RMA aguda/ativa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evidência histológica de agressão tecidual: -inflamação na microcirculação (ptc/g>0) -NTA sem outras causas evidentes - MAT aguda sem outras causas evidentes -arterite (v>0) • Evidência de interação recente de AC ao endotélio: C4d>0 (IHQ) ou g+ptc≥2 ou ↑ENDAT • DSA positivo ou evidência de DAS (C4d+ ou ↑ENDATs) <p>RMA crônica ativa:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evidência histológica de cronicidade tecidual: cg>0, Multilaminação da tubular, fibrose intimal • Evidência de interação recente de AC ao endotélio: C4d>0 (IHQ) ou g+ptc≥2 ou ↑ENDAT • DSA positivo ou evidência de DAS (C4d+ ou ↑ENDATs) <p>RMA crônica</p> <ul style="list-style-type: none"> • cg>0, sem evidência de interação recente de interação recente de • diagnóstico prévio de RMAativa ou crônica ativa <p>C4d+ sem evidência de rejeição:</p> <ul style="list-style-type: none"> -C4d>0 (IHQ) -g0; ptc0; cg0; v0; -sem multilaminação da tubular -sem lesão tubular aguda -sem rejeição mediada por células T ou suspeito -evidência de ENDATs

Fonte: Elaborado pelo autor e adaptado dos relatórios de Banff de 1997 à 2019.

ANEXO 3

Padronização dos Escores de Banff – 2019

AGUDO	
i inflamação em córtex não fibrosado	0 – ausente (<10%) 1 – leve (10 a 25%) 2 – moderado (26 a 50%) 3 – severo (>50%)
t tubulite em região cortical	0 – ausente 1 – leve (1 a 4 mononucleares/túbulo ou a cada 10 células tubulares), em pelo menos 2 focos 2 – moderado (5 a 10 mononucleares/túbulo ou a cada 10 células tubulares) 3 – severo (>10 mononucleares/túbulo ou a cada 10 células tubulares)
v endarterite (arterite intimal)	0 – ausente (menos de 10%) 1 – leve (1 ou mais leucócitos diretamente abaixo do endotélio de 1 ou mais artérias, células endoteliais tipicamente aumentadas e edema subendotelial; <25% de oclusão luminal) 2 – moderado (>25% de oclusão luminal) 3 – severo (necrose fibrinoide ou inflamação transmural)
g glomerulite	0 – ausente (<10%) 1 – leve (1 leucócito e edema endotelial com oclusão de 50% de 1 ou mais luz capilar de pelo menos 1, mas <25% dos glomérulos) 2 – moderado (alterações anteriores envolvendo 25 a 75% dos glomérulos) 3 – severo alterações anteriores envolvendo >75% dos glomérulos)
ptc pericapilarite	0 – mínimo (< 3 leucócitos no PTC cortical mais envolvido ou leucócitos em <10% dos PTC cortical) 1 – leve (≥ 1 leucócito em $\geq 10\%$ dos PTC corticais e 3 a 4 leucócitos no capilar mais envolvido) 2 – moderado (≥ 1 leucócito em $\geq 10\%$ dos PTC corticais e 5 a 10 leucócitos no capilar mais envolvido) 3 – severo (≥ 1 leucócito em $\geq 10\%$ dos PTC corticais e >10 leucócitos no capilar mais envolvido)
C4d marcação linear em PTC ou nos capilares medulares vasa recta	0 – ausente 1 – mínimo (>0 e <10% dos PTC) 2 – focal (10 a 50% dos PTC) 3 – difuso (>50%)

*para IHQ todos os escores >0 são positivos.

Fonte: Elaborado pelo autor e adaptado do relatório de Banff 2019 (Loupy *et al*, 2020)

ANEXO 3. Continuação.

CRÔNICO	
ci fibrose intersticial cortical	0 – mínimo (<5%) 1 – leve (6 a 25%) 2 – moderado (26 a 50%) 3 – severo (>50%)
	*não considerar a região subcapsular
ct atrofia tubular cortical	0 – ausente 1 – leve (1 a 25%) 2 – moderado (26 a 50%) 3 – severo (>50%)
	*não considerar a região subcapsular
cv fibrose arterial intimal	0 – ausente 1 – leve (redução de <25% da área luminal da artéria mais acometida) 2 – moderado (redução de >26 a 50%) 3 – severo (redução de >50%)
cg glomerulopatia crônica ou glomerulopatia do transplante	0 – ausência de duplo contorno à microscopia ótica ou eletrônica 1a – leve inicial (sem duplo contorno à MO; presença de neo-densa subendotelial em >3 alças capilares à ME associado ao aumento endotelial ou espessamento subendotelial 1b – leve (duplo contorno à MO em 1 a 25% dos capilares glomerulares) 2 – moderado (duplo contorno à MO em 26 a 50%) 3 – severo (duplo contorno à MO em >50%)
ptcml	0 – não preencher o critério acima 1 - ≥ 7 camadas de membrana basal no PTC mais afetado e mais 2 PTC com ≥ 5 camadas
	*Requer microscopia eletrônica
AGUDO E CRÔNICO	
ti total da inflamação cortical, incluindo áreas de fibrose e sem fibrose	0 – ausente/mínimo (<10%) 1 – leve (10 a 25%) 2 – moderado (26 a 50%) 3 – severo (>50%)
i-IFTA inflamação nas áreas de atrofia	0 – ausente/mínimo (<10% do córtex não fibrosado ou de IFTA <10%) 1 – leve (10 a 25%) 2 – moderado (26 a 50%) 3 – severo (>50%)
	*não considerar a região subcapsular
t-IFTA tubulite em área de atrofia tubular	0 – ausente 1 – leve (1 a 4 mononucleares/túbulo ou a cada 10 células tubulares), em pelo menos 2 focos 2 - moderado (5 a 10 mononucleares/túbulo ou a cada 10 células tubulares) 3 – severo (>10 mononucleares/túbulo ou a cada 10 células tubulares)
*não considerar túbulos severamente atróficos	

Fonte: Elaborado pelo autor e adaptado do relatório de Banff 2019 (Loupy *et al*, 2020)

