

Pacientes transplantados renais com anticorpos anti-HLA pré-formados: achados precoces de biópsia e desfechos clínicos^a

Renal transplant patients with preformed anti-HLA antibodies: early biopsy findings and clinical outcomes^a

Autores

Marcos Vinicius de Sousa¹ 

Ricardo de Lima Zollner² 

Marilda Mazzali¹ 

¹ Universidade de Campinas, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Laboratório de Investigação em Transplante, Campinas, SP, Brasil.

² Universidade de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Clínica Médica, Laboratório de Imunologia Translacional, Campinas, SP, Brasil.

Data de submissão: 17/12/2018.

Data de aprovação: 12/07/2019.

^aO presente estudo foi baseado na tese acadêmica: Anticorpos anti-antígenos leucocitários humanos e transplante renal: alterações histológicas precoces e desfechos clínicos; Universidade de Campinas, 2018.

Correspondência para:

Marcos Vinicius de Sousa.

E-mail: marcosnefro@gmail.com

DOI: <https://doi.org/2175-8239-JBN-2018-0244>

RESUMO

Introdução: A fibrose renal é o desfecho de um processo iniciado no transplante, com reperfusão, isquemia e inflamação precoce, que progride ao longo do tempo com fenômenos imunológicos e não imunológicos. A identificação de marcadores morfológicos e a intervenção precoce poderiam melhorar a função e a sobrevida do enxerto. **Objetivo:** Avaliar a correlação entre intensidade e especificidade de anticorpos anti-HLA pré-transplante alterações histológicas do enxerto renal, de forma a identificar fatores de risco ou marcadores de disfunção precoces do aloenxerto. **Métodos:** O presente estudo incluiu uma coorte retrospectiva de receptores de transplante renal sensibilizados com anticorpos anti-HLA no pré-transplante submetidos a biópsia de enxerto nos primeiros dois anos após o transplante. Os grupos foram divididos em função da especificidade dos anticorpos anti-HLA: sem anticorpos doador-específicos (não-DSA, n = 29) e com anticorpos doador-específicos (DSA+, n = 16). Alterações histológicas do enxerto renal, função renal e proteinúria foram analisados. **Resultados:** Os dois grupos tinham características gerais semelhantes, exceto pela dose mais elevada de timoglobulina administrada nos indivíduos do grupo DSA+ ($p < 0,05$). O grupo não-DSA teve escores mais elevados de glomerulosclerose, inflamação intersticial (i) e fibrose intersticial (ci) ($p < 0,05$), além de maior incidência de rejeição celular aguda (RCA). Não foi observada diferença estatística na incidência de rejeição mediada por anticorpos, função renal ou proteinúria durante o seguimento. **Discussão e Conclusões:** A diferença nos escores de inflamação e fibrose intersticial pode estar associada à maior incidência de RCA e nefropatia por poliomavírus no grupo não-DSA. Devemos considerar ainda o efeito protetor das doses mais elevadas de timoglobulina na redução da lesão por isquemia-reperfusão no grupo DSA+. O curto período de seguimento pode ter sido insuficiente para detectar alterações de longo prazo no tecido do aloenxerto, função renal e proteinúria.

Palavras-chave: Antígenos HLA; Rejeição de Enxerto; Fibrose; Proteinúria; Traumatismo por Reperfusão; Biópsia.

ABSTRACT

Introduction: Renal fibrosis is the end point of a process that begins at transplant, with ischemia reperfusion and early inflammation, and progresses over time with immunological and non-immunological phenomena. Early identification of morphological markers and intervention could improve graft function and survival. **Objective:** to evaluate the correlation between intensity and specificity of pre-transplant anti-HLA antibodies and kidney allograft pathology in order to identify early risk factors or markers of allograft dysfunction. **Methods:** A retrospective cohort of kidney transplant recipients with pre-transplant anti-HLA antibodies who underwent graft biopsy within the first two years post-transplant was divided into two groups according to the specificity of anti-HLA antibodies: nonspecific (non-DSA, n = 29) and specific (DSA+, n = 16). Kidney graft pathology, renal function, and proteinuria were analyzed. **Results:** general characteristics were similar in both groups, except for the higher dose of thymoglobulin in DSA+ group ($p < 0.05$). The non-DSA group had higher scores for glomerulosclerosis, interstitial inflammation (i) and interstitial fibrosis (ci) ($p < 0.05$) and higher incidence of cell-mediated acute rejection. No statistical difference in incidence of antibody-mediated rejection, renal function, and proteinuria was observed during follow up. **Discussion and conclusions:** the difference in inflammation scores and interstitial fibrosis may be associated to the higher incidence of acute cell-mediated rejection and polyomavirus nephropathy in the Non-DSA group. We also should take into account the protective effect of higher doses of thymoglobulin, reducing ischemia reperfusion injury in the DSA+ group. The short follow-up might have been insufficient to detect long-term changes in allograft tissue, renal function, and proteinuria.

Keywords: HLA Antigens; Graft Rejection; Fibrosis; Proteinuria; Reperfusion Injury; Biopsy.



INTRODUÇÃO

A fibrose renal é o desfecho comum de inúmeros processos patológicos associados ao transplante renal, cuja ocorrência leva a progressão da doença renal e perda do enxerto^{1,2}. As possíveis causas de fibrose incluem nefrotoxicidade medicamentosa, lesão isquêmica e lesões imunomediadas. O processo fibrótico é deflagrado durante o primeiro ano pós-transplante, especialmente nos primeiros três meses, por inflamação autolimitada secundária a lesão por reperfusão, e sustenta-se por meio de resposta imunológica inflamatória contínua, favorecendo a progressão da doença renal^{2,3}. Vários são os fatores imbricados na intensidade e extensão da fibrose, como a idade e tipo de doador (vivo ou falecido) e os tempos de isquemia fria e quente. Doador de idade avançada é um importante preditor de pior desfecho do enxerto².

Após a reperfusão, sob a influência de citocinas pró-inflamatórias, vários tipos celulares, incluindo macrófagos, linfócitos T e células epiteliais tubulares, produzem mediadores profibróticos como o TGF- β , resultando em atrofia tubular (TA) irreversível, fibrose intersticial (IF) excessiva, rarefação microvascular e glomerulosclerose². Na classificação de Banff de biópsias de aloenxerto renal, as lesões crônicas incluem fibrose intersticial (ci), atrofia tubular (ct), espessamento intimal arterial (cv), hialinose arteriolar (ah), aumento da matriz mesangial (mm) e glomerulopatia do transplante (cg)². Escores mais elevados de IF/TA na biópsia do enxerto foram associados a pior função renal, com impacto negativo na sobrevida do enxerto.

A sensibilização imunológica, definida pela presença de anticorpos anti-antígeno leucocitário humano (HLA) no sangue do receptor, é desencadeada pela exposição prévia a antígenos HLA, geralmente em decorrência de histórico de transplante de órgãos, gravidez ou hemotransfusão⁴. Receptores sensibilizados têm risco aumentado para rejeição mediada por anticorpos (RMA) após transplante renal¹. Rejeição aguda comprovada por biópsia é considerada fator de risco para IF/TA². RMA subclínica, sugerida pela presença de anticorpos doador-específicos (DSA) e achados histológicos de glomerulite, capilarite peritubular e/ou deposição de C4d e ausência de disfunção do enxerto, representa um poderoso estímulo profibrótico preditor de perda do enxerto². Embora os linfócitos T sejam geralmente as células infiltrantes mais abundantes, várias outras células mononucleares, como as linfócitos B, células natural killer, células

dendríticas e monócitos/macrófagos contribuem para o processo patológico. A presença de células natural killer (fortemente associadas a RMA), células dendríticas e macrófagos (elevados em rejeição aguda mais grave e associados a disfunção tubular e dano histológico crônico) indica pior prognóstico². As seguintes estratégias terapêuticas são utilizadas para minimizar a progressão da fibrose no enxerto renal: terapias imunossupressoras sem uso de inibidores de calcineurina ou com seu uso em menor dose, bloqueadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona e tratamento das rejeições subclínicas². As terapias imunossupressoras mais recentes reduziram a incidência de rejeição clínica no primeiro ano pós-transplante³, enquanto o diagnóstico de rejeições subclínicas e a identificação de marcadores de fibrose precoce tornaram-se importantes preditores de função renal e sobrevida do enxerto.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a correlação entre intensidade e especificidade de anticorpos anti-HLA pré-formados (classes I e II) e patologia renal em biópsias de enxertos realizadas nos dois primeiros anos após transplante renal, de modo a identificar fatores de risco potencialmente associados a início da fibrose do enxerto e desfechos clínicos precoces.

MATERIAIS E MÉTODOS

PACIENTES E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

A coorte retrospectiva descrita no presente estudo incluiu receptores de transplante renal com anticorpos anti-HLA pré-formados de um único centro.

Crítérios de inclusão: receptores de transplantes renais de doadores vivos ou falecidos, maiores de 18 anos no momento do transplante; presença de anticorpos anti-HLA pré-transplante (classes I e II) e biópsia de enxerto realizada nos primeiros dois anos após o transplante. Critérios de exclusão: pacientes pediátricos, ausência de anticorpos anti-HLA antes do transplante (RCP=zero) ou não-realização de biópsia do enxerto nos dois primeiros anos após o transplante.

Todos os receptores de transplante renal selecionados tiveram prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) negativa no pré-transplante. Não foi realizada prova cruzada por citometria de fluxo. O estudo incluiu transplantes renais com doadores padrão e com critério expandido segundo os preceitos da United Network for Organ Sharing (UNOS) de 2003⁵.

Os desfechos foram achados histológicos em biópsia do enxerto, função renal e presença de proteinúria nos primeiros dois anos pós-transplante. A população do estudo foi dividida em dois grupos em função da presença de anticorpos anti-HLA antes do transplante: DSA+, com anticorpos anti-HLA doador-específicos; e não DSA, sem anticorpos anti-HLA doador-específicos. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Campinas (CAAE: 51485415.6.0000.5404).

TIPAGEM HLA E DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA

A tipagem HLA de receptores e doadores foi realizada por amplificação de ácido desoxirribonucleico (DNA) por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de amostras de sangue periférico com sequências de primers moleculares (LABType® SSO e Micro SSP, One Lambda Inc, Califórnia - EUA) segundo as instruções do fabricante. O arquivo gerado foi importado para o software HLA Fusion (One Lambda Inc, Califórnia - EUA) para análise. HLA-A, -B e -DRB1 foram rotineiramente identificados. Nos casos em que os receptores apresentassem anticorpos anti-HLA-DQ, os antígenos HLA-DQ dos doadores foram identificados.

Para detecção de anticorpos anti-HLA, amostras de sangue periférico dos receptores foram colhidas antes e após o transplante e incubadas com microsferas marcadas com antígenos HLA classe I e II (LABScreen™ Single Antigen HLA Class I LS1A04 e LABScreen™ Single Antigen HLA Class II LS2A01). A reatividade contra painel (RCP) foi calculado com base na prevalência de alelos HLA nos doadores de órgãos de São Paulo, dado geralmente atualizado a cada seis meses baseado em 2.750 registros à época do estudo.

Prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) para linfócitos T com adição de antiglobulina humana e prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento para células B com células NIH foram realizadas em todos os receptores de transplante renal no momento do transplante a partir do soro colhido mais recentemente e de células dos doadores colhidas em linfonodos ou no baço. Receptores recentemente vacinados ou que tenham recebido a transfusão foram submetidos a prova cruzada por CDC adicional com outra amostra de soro colhida no momento da convocação para o transplante. Apenas pacientes com prova cruzada por CDC negativa para linfócitos T e células B receberam

transplantes renais. Todos os pares doador-receptor eram ABO compatíveis.

Em cumprimento às diretrizes do serviço e à legislação regional e nacional, todos os receptores de transplante renal foram tipificados e triados para anticorpos anti-HLA no momento da entrada na lista de espera para transplante. O RCP foi calculado a cada seis meses e o soro dos candidatos a transplante foi colhido a cada três meses para a realização de possíveis provas cruzadas. As informações obtidas pelo Luminex™ foram usadas para guiar as estratégias imunossupressoras pós-transplante e definir a necessidade de monitoramento desses anticorpos durante o seguimento.

TERAPIA IMUNOSSUPRESSORA E DIAGNÓSTICO DE REJEIÇÃO

A terapia imunossupressora de indução prescrita para os receptores de rins de doadores padrão e com baixo risco imunológico consistiu de anticorpos monoclonais anti-receptores de IL-2 Basiliximab 20 mg endovenoso no dia do transplante e no quarto dia pós-transplante. A terapia de indução administrada para receptores de rins de doadores de critérios expandidos, doadores vivos de HLA não idênticos ou doadores considerados de alto risco imunológico (RCP > 50% ou presença de DSA) foi de 3 a 7 mg/kg de globulina antitimocítica endovenosa ajustada pela contagem total de linfócitos. Todos os receptores receberam 500 mg de metilprednisolona endovenosa no momento do transplante e permaneceram em corticoterapia durante o seguimento. A imunossupressão de manutenção incluiu uma combinação de inibidor de calcineurina (0,1 mg/kg de tacrolimus 12/12h com dose ajustada pelos níveis séricos) e 720 mg de micofenolato sódico em duas tomadas diárias ajustado de acordo com superfície corporal, tolerância gastrointestinal e contagem de leucócitos e eritrócitos no sangue periférico. Nenhum dos pacientes incluídos recebeu protocolo de dessensibilização antes do transplante.

Os casos de suspeita de rejeição ocorreram por elevação da creatinina sérica (> 20% do nível inicial) ou surgimento de proteinúria, todos confirmados por biópsia de aloenxerto e avaliados segundo a classificação de Banff 2013⁶. As biópsias renais foram testadas para depósitos de C4d nos capilares peritubulares pelo protocolo de coloração com peroxidase⁷. O diagnóstico de casos de rejeição aguda mediada por

anticorpos (RMA) baseou-se em critérios histológicos e na presença de anticorpos doador-específicos. Os laudos de biópsia foram obtidos dos prontuários dos pacientes e não foram revisados para o estudo. Biópsias de enxerto são avaliadas rotineiramente por dois patologistas renais experientes.

COLETA DE DADOS CLÍNICOS E DESFECHOS

Os dados clínicos e laboratoriais foram reunidos retrospectivamente a partir dos prontuários e bancos de dados do Programa de Transplante Renal no momento do transplante e nos meses 1, 3, 6, 12, 18 e 24 após o transplante. Os dados foram registrados e organizados em planilha do programa Microsoft® Excel. Os desfechos primários foram características da biópsia do enxerto segundo a classificação de Banff 2013 revisada em 2015⁸, função do aloenxerto estimada pela equação do CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration)⁹ e proteinúria expressa pela relação proteína e creatinina na urina.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis numéricas foram apresentadas como média \pm desvio padrão, mediana e intervalo e/ou percentagens. As variáveis contínuas entre grupos foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, enquanto as variáveis categóricas foram comparadas pelo teste X^2 de Pearson. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 7.0c para Mac (La Jolla CA, EUA).

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS GERAIS DE ACORDO COM ANTICORPOS ANTI-HLA ANTES DO TRANSPLANTE

Dos 89 pacientes com anticorpos anti-HLA pré-formados, 45 (50%) preencheram os critérios de inclusão. Quarenta e quatro pacientes sem biópsia de enxerto no período de dois anos a contar do transplante não foram incluídos. Em comparação ao grupo de estudo, os pacientes não incluídos tiveram maior prevalência de transplante de doadores vivos, menor prevalência de transplantes de doadores com critérios expandidos e menor incidência de função tardia do enxerto. Também foi observada menor porcentagem de pacientes tratados com micofenolato. Os demais parâmetros analisados foram comparáveis entre os grupos (Tabela 1).

Considerando a especificidade dos anticorpos anti-HLA pré-transplante, 27 pacientes apresentaram

anticorpos doador-específicos e 62 apresentaram anticorpos inespecíficos. Onze pacientes (40%) com DSA e 33 (53%) sem DSA foram excluídos por não terem realizado biópsia do enxerto ($p = 0,28$). Quarenta e cinco receptores de transplante renal satisfizeram os critérios de inclusão e foram assim distribuídos: grupo DSA+ ($n = 16$); grupo Não-DSA ($n = 29$).

A maioria dos pacientes era do sexo masculino e os grupos eram comparáveis em termos de idade, etiologia da doença renal crônica, tempo em diálise, número de eventos de sensibilização prévios (transfusão, transplante ou gravidez). O número de incompatibilidades HLA-A, B e DR foi semelhante entre os grupos, assim como RCP classe I. Contudo, RCP classe II foi estatisticamente maior no grupo DSA+ ($p < 0,05$). Como já era esperado, de acordo com nosso protocolo a maioria dos pacientes em ambos os grupos recebeu timoglobulina na terapia de indução, com doses mais altas no grupo DSA+ ($p < 0,05$). O tempo de isquemia fria e as características dos doadores foram comparáveis entre os grupos, assim como a incidência de função tardia do enxerto (FTE) (Tabela 1).

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DAS BIÓPSIAS DE ENXERTOS PÓS-TRANSPLANTE POR GRUPO

Sete receptores do grupo não-DSA (24,1%) e oito (50,0%) do grupo DSA+ foram submetidos a mais de uma biópsia de enxerto durante o seguimento. Todas as biópsias foram consideradas na análise, o que resultou na inclusão de 38 biópsias do enxerto no grupo não-DSA e 29 no grupo DSA+. As biópsias de enxerto foram indicadas por detecção de DSA *de novo* ou aumento da intensidade de fluorescência (MFI) dos anticorpos pré-formados ($n = 3$), função tardia do enxerto ($n = 29$), disfunção do enxerto ($n = 26$), proteinúria ($n = 3$) e/ou controle após tratamento de rejeição aguda ($n = 3$), sem diferença estatística entre os grupos. Embora a realização de biópsia protocolar não seja prática de rotina em nosso centro, três biópsias no grupo DSA+ foram realizadas como procedimento de vigilância antes da alta hospitalar. O tempo médio total de biópsia foi semelhante em ambos os grupos.

Na análise geral das biópsias de enxerto, o grupo DSA+ apresentou menos inflamação intersticial em relação ao grupo não-DSA ($p = 0,02$). A incidência de esclerose glomerular e fibrose intersticial (ci) foi maior no grupo não-DSA ($p < 0,05$). Os demais marcadores de lesão aguda (g, ptc, v) ou crônica (ct, ah, cv) foram semelhantes entre os grupos (Tabela 2). A análise das biópsias

TABELA 1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GRUPOS DE ACORDO COM A PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-HLA ANTES DO TRANSPLANTE

	Total não incluídos (n = 44)	Total incluídos (n = 45)	p	Incluídos Não-DSA (n = 29)	Incluídos DSA+ (n = 16)	p
<i>Receptores de transplante</i>						
Idade (anos)	45,7 ± 10,4	45,1 ± 11,6	0,79	47,0 ± 12,6	41,6 ± 9,0	0,14
Homens, n (%)	13 (29,5)	22 (48,9)	0,06	13 (44,8)	9 (56,2)	0,97
Etiologia da DRC (%)			0,91			0,99
Desconhecida	16 (36,4)	13 (28,9)		9 (31,0)	5 (31,2)	
Hipertensão arterial sistêmica	7 (15,9)	7 (15,6)		5 (17,2)	2 (12,5)	
Glomerulonefrite crônica	8 (18,2)	5 (11,1)		2 (6,9)	3 (18,7)	
Diabetes mellitus	4 (9,1)	2 (4,4)		2 (6,9)	0 (0)	
Outras	9 (20,4)	18 (40,0)		11 (37,9)	6 (37,5)	
Tempo em diálise (meses),	47,2 ± 42,4	50,4 ± 40,2	0,71	53,8 ± 44,6	43,9 ± 30,1	0,66
Transfusões pré-transplante, n (%)	21 (47,7)	25 (55,5)	0,54	14 (48,3)	11 (68,7)	0,78
Transplante prévio, n (%)	3 (6,8)	8 (17,8)	0,11	3 (10,3)	5 (31,2)	0,54
Mulheres com gravidez pré-transplante, n (%)	19 (79,2)	18 (78,2)	0,18	13 (81,2)	5 (71,4)	0,99
Incompatibilidades HLA ABDR	3,2 ± 1,5	3,3 ± 0,8	0,69	3,2 ± 0,9	3,4 ± 0,7	0,65
PRA classe I pré-transplante (%)	42,6 ± 32,0	32,7 ± 28,9	0,13	31,4 ± 26,7	35,1 ± 33,2	0,94
PRA classe II pré-transplante (%)	24,0 ± 32,3	28,3 ± 35,3	0,55	19,1 ± 29,4	45,1 ± 39,8	0,02
<i>Doadores</i>						
Doadores falecidos, n (%)	32 (72,7)	41 (91,1)	0,02	28 (96,5)	13 (81,2)	0,56
Idade (anos)	39,1 ± 14,4	46,6 ± 12,6	0,01	46,6 ± 13,3	46,7 ± 11,8	0,97
Homens, n (%)	25 (56,8)	24 (53,3)	0,74	17 (58,6)	7 (43,7)	0,92
Doadores com critério expandido (%)	8 (18,1)	23 (51,1)	< 0,01	17 (58,6)	6 (37,5)	0,76
Creatinina sérica (mg/dL)	1,1 ± 0,7	1,4 ± 1,0	0,10	1,4 ± 1,1	1,3 ± 0,9	0,53
Índice KDPI (%)	56,9 ± 28,3	58,0 ± 28,5	0,85	59,4 ± 26,3	57,4 ± 29,8	0,83
<i>Transplante</i>						
Terapia imunossupressora inicial						
Timoglobulina (%)	31 (70,4)	36 (80,0)	0,29	22 (75,8)	14 (87,5)	0,93
Dose de timoglobulina (mg/kg)	4,9 ± 2,2	4,5 ± 2,5	0,42	5,2 ± 1,1	6,2 ± 1,1	0,01
Basiliximab (%)	5 (11,4)	9 (20,0)	0,26	7 (24,1)	2 (12,5)	0,03
Tacrolimus (%)	36 (81,8)	40 (88,9)	0,34	26 (89,6)	14 (87,5)	0,99
Micofenolato (%)	33 (75,0)	44 (97,8)	< 0,01	29 (100,0)	15 (93,7)	0,76
Isquemia fria (horas)	19,5 ± 4,1	22,4 ± 6,2	0,01	22,5 ± 6,8	22,1 ± 4,9	0,86
FTE, n (%)	10 (22,7)	31 (68,9)	< 0,01	20 (68,9)	11 (68,7)	0,99

n, número; DRC, doença renal crônica; HLA, antígeno leucocitário humano; PRA, painel de reatividade de anticorpos; KDPI, kidney donor profile index; FTE, função tardia do enxerto.

realizadas nos primeiros três meses após o transplante não revelou diferença estatística entre os grupos em todos os demais parâmetros analisados. Contudo, observamos nas biópsias realizadas após o terceiro mês uma tendência de aumento da frequência de esclerose glomerular e inflamação intersticial no grupo não-DSA ($p = 0,06$), sem diferença no escore de tubulite (t). Outros marcadores de lesão aguda (g, ptc, v) ou crônica (ci, ct, ah, cv) eram comparáveis entre os grupos três meses após o transplante.

A incidência de RMA foi semelhante entre os grupos, com um caso antes do terceiro mês após o transplante em cada grupo e um caso após três meses do transplante em cada grupo. Contudo, observamos uma maior incidência de rejeição celular aguda (RCA) no grupo não-DSA, principalmente após três meses do transplante (Tabela 3).

TABELA 2 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DAS BIÓPSIAS DE ENXERTO DE ACORDO COM GRUPOS E TEMPO APÓS O TRANSPLANTE

	Total			0-3 meses			> 3 meses		
	Não-DSA	DSA+	p	Não-DSA	DSA+	p	Não-DSA	DSA+	p
Número de biópsias de enxerto	38	29		20	19		18	10	
% esclerose glomerular, mediana (mín-máx)	9,2 (0-58,3)	0 (0-17,6)	0,02	8,2 (0-54,5)	3,9 (0-15,4)	0,20	9,7 (0-58,3)	0 (0-17,6)	0,06
Escores de Banff (%)									
g 0	24 (63,1)	20 (68,9)	0,99	15 (75,0)	13 (68,4)	0,99	9 (50,0)	7 (70,0)	0,90
g 1-3	14 (36,9)	9 (31,1)		5 (25,0)	6 (31,6)		9 (50,0)	3 (30,0)	
i 0	21 (55,3)	27 (93,1)	0,02	14 (70,0)	18 (94,7)	0,39	7 (38,9)	9 (90,0)	0,02
i 1-3	17 (44,7)	2 (6,9)		6 (30,0)	1 (5,3)		11 (61,1)	1 (10,0)	
t 0	27 (71,0)	27 (93,1)	0,27	19 (95,0)	19 (100,0)	0,91	8 (44,4)	8 (80,0)	0,50
t 1-3	11 (29,0)	2 (6,9)		1 (5,0)	0 (0,0)		10 (55,6)	2 (20,0)	
v 0	31 (81,6)	0 (0,0)	0,20	17 (85,0)	19 (100,0)	0,54	14 (77,8)	10 (100,0)	0,62
v 1-3	7 (18,4)	29 (100,0)		3 (15,0)	0 (0,0)		4 (22,2)	0 (0,0)	
ptc 0	27 (71,0)	24 (82,7)	0,87	15 (75,0)	16 (84,2)	0,97	12 (66,7)	8 (80,0)	0,96
ptc 1-3	11 (28,9)	5 (17,3)		5 (25,0)	3 (15,8)		6 (33,3)	2 (20,0)	
ct 0	13 (34,2)	12 (41,4)	0,98	8 (40,0)	8 (42,1)	0,99	5 (27,8)	4 (40,0)	0,98
ct 1-3	25 (65,8)	17 (58,6)		12 (60,0)	11 (57,9)		13 (72,2)	6 (60,0)	
ci 0	23 (60,5)	17 (58,6)	0,87	15 (75,0)	12 (63,1)	0,95	8 (44,4)	5 (50,0)	0,99
ci 1-3	15 (39,5)	12 (41,4)		5 (25,0)	7 (36,9)		10 (55,6)	5 (50,0)	
ah 0	33 (86,8)	18 (62,0)	0,23	19 (95,0)	12 (63,1)	0,19	14 (77,8)	6 (60,0)	0,91
ah 1-3	5 (13,2)	11 (38,0)		1 (5,0)	7 (36,9)		4 (22,2)	4 (40,0)	
C4d 0	31 (81,6)	17 (58,6)	0,37	16 (80,0)	12 (63,1)	0,85	15 (83,3)	5 (50,0)	0,47
C4d 1-3	7 (18,4)	12 (41,4)		4 (20,0)	7 (36,9)		3 (16,7)	5 (50,0)	
IF/TA 0	14 (36,8)	7 (24,1)	0,87	10 (50,0)	6 (31,6)	0,70	4 (22,2)	1 (10,0)	0,95
IF/TA 1-3	24 (63,2)	22 (75,9)		10 (50,0)	13 (68,4)		14 (77,8)	9 (90,0)	

mín, mínimo; máx, máximo; g, glomerulite; i, inflamação; t, tubulite; v, arterite intimal; ptc, capilarite peritubular; ct, atrofia tubular; ci, fibrose intersticial; ah, hialinose arteriolar; IF/TA, fibrose intersticial e atrofia tubular; RMA, rejeição mediada por anticorpos; RCA, rejeição celular aguda.

TABELA 3 REJEIÇÃO COMPROVADA POR BIÓPSIA, NEFROPATIA ASSOCIADA AO BKV E NEFROTOXICIDADE POR INIBIDORES DA CALCINEURINA DE ACORDO COM GRUPOS E TEMPO APÓS O TRANSPLANTE

	Total			0-3 meses			> 3 meses		
	Não-DSA	DSA+	p	Não-DSA	DSA+	p	Não-DSA	DSA+	p
Número de biópsias de enxerto	38	29		20	19		18	10	
RMA (%)	2 (5,2)	2 (6,9)	0,99	1 (5,0)	1 (5,2)	0,99	1 (5,55)	1 (10,0)	0,99
RCA (%)	12 (31,5)	2 (6,9)	0,02	3 (15,0)	1 (5,2)	0,60	9 (50,0)	1 (10,0)	0,04
Borderline	3	0		0	0		3	0	
1A	2	1		0	0		2	1	
1B	1	0		0	0		1	0	
2A	3	0		2	0		1	0	
2B	1	1		1	1		0	0	
3	2	0		0	0		2	0	
NBKV (%)	3 (7,9)	0 (0,0)	0,66	0 (0,0)	0 (0,0)		3 (16,6)	0 (0,0)	0,76
Nefrotoxicidade IC (%)	1 (2,6)	1 (3,4)	0,25	0 (0,0)	0 (0,0)		1 (5,5)	1 (10,0)	0,99

RMA, rejeição mediada por anticorpos; RCA, rejeição celular aguda; NBKV, nefropatia associada ao BKV; IC, inibidores da calcineurina.

NÍVEIS DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DE DSA E MORFOLOGIA RENAL

Em nosso estudo, três biópsias foram indicadas por detecção de DSA (*de novo* ou aumento na intensidade dos anticorpos preexistentes). No grupo não-DSA, um paciente apresentou detecção de DSA-DQ *de novo* (> 10.000 MFI), sem evidência histológica de RCA ou RMA. No grupo DSA+, um paciente apresentou aumento na intensidade de fluorescência de DSA-DQ (de 5.400 para 6.200 MFI), sem sinais de rejeição na biópsia do enxerto. Outro paciente apresentou aumento no DSA-DQ pré-formado (de 1.300 para 16.530 MFI), associado a DSA-A e DSA-DR *de novo* (soma de 27.000 MFI) com evidência histológica de RMA 2 e RCA 2B na biópsia de enxerto.

DESFECHOS CLÍNICOS DE ACORDO COM ANTICORPOS ANTI-HLA PRÉ-TRANSPLANTE

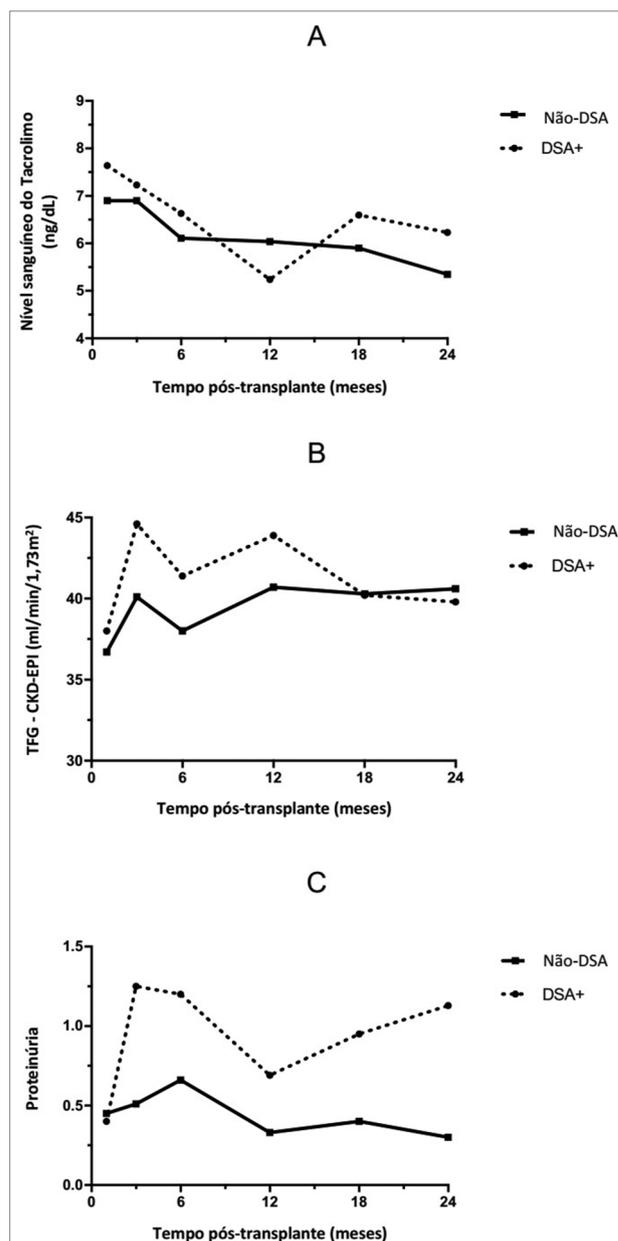
O nível sérico de tacrolimus foi comparável entre os grupos durante o seguimento. (Figura 1A). Não houve diferença estatística na função renal entre os grupos em nenhum dos momentos analisados (Figura 1B). A TFG média (CKD-EPI) no primeiro mês pós-transplante foi de $36,7 \pm 21,9$ mL/min/1,73m² no grupo não-DSA e $38,0 \pm 20,8$ mL/min/1,73m² no grupo DSA+ ($p = 0,60$). Após 24 meses de seguimento, a TFG encontrava-se em $40,6 \pm 13,8$ mL/min/1,73m² no grupo não-DSA e em $39,8 \pm 3,4$ mL/min/1,73m² no grupo DSA+ ($p = 0,46$).

Embora o grupo DSA+ tenha apresentado níveis mais elevados de proteinúria que o grupo não-DSA ao longo do período analisado, não houve diferença significativa entre os mesmos (Figura 1C).

DISCUSSÃO

No presente estudo, a incidência de RMA comprovada por biópsia em pacientes com anticorpos anti-HLA pré-formados específicos (DSA+) e não específicos (não-DSA) foi comparável. A análise do escore de Banff dos grupos revelou taxas estatisticamente mais elevadas de inflamação intersticial (i) e fibrose (ci) no grupo não-DSA em relação ao grupo DSA+. A literatura cita vários fatores contribuintes que levam a fibrose intersticial no enxerto renal, incluindo características dos doadores, parâmetros de transplante, toxicidade dos inibidores da calcineurina, hipertensão e rejeição¹⁰. Em nossa coorte, as características dos doadores foram semelhantes entre os grupos, assim como tempo de isquemia fria, incidência de função

Figura 1. Nível sérico de tacrolimus (A), taxa de filtração glomerular (TFG) (B) e proteinúria (C) de acordo com os grupos e tempo após o transplante.



tardia do enxerto e rejeição nos primeiros meses após o transplante. O nível sérico de inibidores da calcineurina pós-transplante também foi semelhante entre os grupos, assim como a ocorrência de toxicidade pelo fármaco em questão comprovada por biópsia. As doses de prednisona e micofenolato também permaneceram estáveis durante o seguimento. Observamos incidência significativamente mais elevada de rejeição celular aguda no grupo não-DSA três meses após o transplante, possivelmente associada a achados histológicos relativos ao período. No grupo não-DSA, três casos de nefropatia associada ao BKV foram

diagnosticados. Inflamação intersticial ocorreu em mais de 70% das biópsias dos casos com nefropatia associada ao BKV no momento do diagnóstico e foi correlacionada com histopatologia viral e aumento de lesões precoces com fibrose acelerada e atrofia tubular¹¹. A maior incidência de infecção por poliovírus também pode explicar o escore de inflamação mais elevado observado no grupo não-DSA em nosso estudo.

Outro possível fator contribuinte para o aumento da inflamação intersticial no grupo não-DSA pode estar relacionado à lesão por isquemia-reperfusão (LIR). A LIR abrange um conjunto de alterações histológicas decorrentes de hipóxia tecidual e aumento da expressão de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão desencadeadas pela reperfusão, resultando em apoptose das células tubulares no tecido reperfundido¹². A LIR está associada a elevação da taxa de rejeição aguda, FTE, disfunção primária e tardia do enxerto, e subsequente perda do enxerto. Os leucócitos participam do desenvolvimento dos processos patológicos relacionados à LIR, exacerbando a hipóxia tecidual ao obstruir os capilares e mediando a citotoxicidade direta pela produção de radicais de oxigênio¹². Células dendríticas e macrófagos são iniciadores, potencializadores e efetores da imunidade inata na LIR renal, induzindo lesão por sinais inflamatórios ou diretamente por meio da liberação de mediadores solúveis¹³. Macrófagos aparecem nos rins após 1-5 dias da LIR. A ativação precoce de macrófagos e células dendríticas leva à infiltração por neutrófilos e geração de citocinas pró-inflamatórias¹³.

A dose de timoglobulina - mais elevada no grupo DSA+ - foi a única diferença observada entre os grupos. Embora não haja consenso sobre a dosagem ótima de timoglobulina na terapia de indução, estudos anteriores relatam que doses cumulativas de timoglobulina variando de 4,2 a 7,4 mg/kg parecem ser eficazes na prevenção da rejeição aguda durante o primeiro ano pós-transplante¹⁴. Nafar et al.¹⁴ compararam três grupos de receptores de transplante em função das seguintes doses de timoglobulina: 4,5 mg/kg em três dias; dose única de 4,5 mg/kg em bolus; e 6 mg/kg em três dias. Os autores não identificaram diferença significativa na rejeição entre os grupos, mas a incidência de glomerulite e capilarite peritubular foi mais elevada no grupo tratado com a menor dose dividida. Doses mais elevadas de timoglobulina podem bloquear diferentes tipos celulares, incluindo linfócitos B e

células dendríticas, provendo efeito protetor contra lesão inflamatória por LIR, o que pode estar relacionado aos achados do presente estudo. Assim, o uso de timoglobulina poderia afetar a redução da incidência das lesões secundárias à LIR, o que também poderia contribuir para as diferenças iniciais entre os grupos de nosso estudo em termos de inflamação e fibrose intersticial. Estudos com modelos animais e em humanos mostraram que a timoglobulina elevou a taxa de apoptose leucocitária, protegeu o tecido reperfundido contra LIR e foi benéfica na redução da incidência de FTE e do tempo de internação^{12,15}. Além disso, a timoglobulina causa distúrbios energéticos e funcionais nos linfócitos não depletados e evita a migração de linfócitos T de memória.

Os casos de inflamação mais grave observados durante os primeiros meses após o transplante tenderam a diminuir no decorrer do primeiro ano. A maioria dos estudos indica que a morfologia renal retorna a níveis quase normais após um insulto isquêmico. Contudo, observa-se algum grau de hipertrofia glomerular e cicatrização intersticial a longo prazo, evoluindo com glomeruloesclerose e IF/TA¹⁶. A glomeruloesclerose de maior intensidade observada no grupo não-DSA pode refletir o aumento da resposta inflamatória à LIR, com desequilíbrio entre fibrose e reparo na resposta tecidual. A despeito das semelhanças nas características dos doadores dos dois grupos, não podemos descartar a possível influência das alterações histológicas dos doadores sobre a ocorrência de glomeruloesclerose no enxerto, uma vez que as biópsias pré-transplante não foram analisadas. Biópsias pré-transplante no material doador são realizadas rotineiramente em nosso centro, e rins são aceitos somente se a glomeruloesclerose for < 20% e não houver lesões arteriolares. Contudo, diferença significativa em esclerose glomerular foi observada apenas após três meses do transplante. Não houve diferença significativa entre os grupos nos primeiros três meses, o que enfraquece o argumento da presença de lesões no tecido do doador.

Outro fator risco para desfechos desfavoráveis é o desenvolvimento de DSA *de novo*. Contudo, seu monitoramento após transplante renal não está firmemente estabelecido¹⁷. O surgimento de novos anticorpos anti-HLA e o aumento da intensidade de fluorescência dos anticorpos existentes podem estar relacionados ao desenvolvimento de rejeição subclínica mediada por anticorpos e levar a mudanças

histológicas sutis na ausência de disfunção do enxerto ou proteinúria. Uma vez que biópsias protocolares não são realizadas rotineiramente em nosso centro, a ocorrência de rejeição subclínica pode ter sido subdimensionada.

Considerando os achados das biópsias segundo a classificação de Banff, os dois grupos apresentaram níveis baixos de IF/TA (grau 0 ou 1) durante os dois primeiros anos após o transplante. Gosset et al.¹⁰ estudaram 1.539 receptores de transplante renal e mostraram que pacientes com IF/TA grave (graus 2 ou 3) um ano após o transplante eram mais propensos a ter DSAs anti-HLA circulantes no momento do transplante. Os autores também relataram uma associação entre aumento do nível de intensidade de fluorescência (MFI) dos DSAs e incidência aumentada de IF/TA, com IF/TA grave na presença de MFI > 5.000. Em nosso estudo, apenas três biópsias foram indicadas por DSA *de novo* ou aumento na intensidade de fluorescência de DSA, mas não foi possível identificar uma associação entre MFI e IF/TA. Além do baixo número de casos, a ausência dessa associação pode estar relacionada à capacidade de ligação do anticorpo ao complemento, uma vez que capacidade de ligação entre DSA e C1q está intimamente associada a RMA aguda⁴. No entanto, a não avaliação do status de C1q em nossa casuística prejudica a correta avaliação dessa hipótese.

A evolução clínica nos dois primeiros anos após o transplante foi comparável entre os grupos. Apesar do aumento na incidência de rejeição celular aguda no grupo não-DSA, as lesões foram leves, sem impacto negativo sobre o seguimento de curto prazo. Segundo a maioria dos estudos², apenas fibrose de moderada a grave é preditora de desfechos, o que poderia explicar a evolução da função renal e da proteinúria em nosso estudo, uma vez que os achados das biópsias não revelaram fibrose significativa segundo o escore de IF/TA⁸.

A menor incidência de enxertos advindos de doadores falecidos e a incidência significativamente menor de doadores com critérios expandidos e função tardia do enxerto no grupo de pacientes não incluídos no estudo podem estar associadas a melhor função do enxerto e menor proteinúria. Temos aqui um viés de indicação, uma vez que todas as biópsias foram realizadas por indicação clínica, incluindo fatores como comprometimento da função do enxerto ou proteinúria, o que pode ter diminuído a detecção de rejeições

subclínicas e limitado as conclusões do presente estudo. Por fim, o período de seguimento de dois anos pode ter sido insuficiente para detectar alterações de longo prazo no enxerto, na função renal e na proteinúria. Apesar das limitações, o presente estudo identificou fibrose intersticial e atrofia tubular mínimas nas biópsias precoces dos enxertos de receptores com anticorpos anti-HLA pré-formados, achado possivelmente associado à terapia imunossupressora. Estudos prospectivos com biópsias protocolares e monitoração para DSA pós-transplante em pacientes sensibilizados ao sistema HLA poderiam elucidar o efeito da intensidade e especificidade dos anticorpos anti-HLA sobre o dano tecidual e o desenvolvimento de fibrose nos enxertos dessa população.

CONCLUSÕES

A diferença nos escores de inflamação e fibrose intersticial entre os grupos pode ter decorrido do efeito anti-inflamatório das doses mais altas de timoglobulina administradas no grupo DSA+ em relação ao aumento de inflamação relacionada a rejeição celular aguda e nefropatia associada ao BKV no grupo não-DSA.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Marcos Vinicius de Sousa realizou a pesquisa/estudo, coletou e analisou os dados e escreveu o artigo.

Ricardo Lima Zollner e Marilda Mazzali discutiram os dados e revisaram o manuscrito. Ambos supervisionaram o projeto.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não têm conflito de interesses a declarar.

REFERÊNCIAS

1. Wekerle T, Segev D, Lechler R, Oberbauer R. Strategies for long-term preservation of kidney graft function. *Lancet* 2017;389:2152-62.
2. Vanhove T, Goldschmeding R, Kuypers D. Kidney Fibrosis: Origins and Interventions. *Transplantation* 2017;101:713-26.
3. Huang Y, Farkash E. Protocol Biopsies: Utility and Limitations. *Adv Chronic Kidney Dis* 2016;23:326-31.
4. Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018;13:182-92.
5. Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *Am J Transplant* 2003;3:114-25.
6. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al.; Banff meeting report writing committee. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014;14:272-83.
7. Sampaio WLV, Mazzali M. C4d deposits in borderline rejection: an early marker for chronic renal dysfunction? *Transplant Proc* 2014;46:1710-2.

8. Loupy A, Haas M, Solez K, Racusen L, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am J Transplant* 2017;17:28-41.
9. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, et al.; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12.
10. Gosset C, Viglietti D, Rabant M, Vérine J, Aubert O, Glotz D, et al. Circulating donor-specific anti-HLA antibodies are a major factor in premature and accelerated allograft fibrosis. *Kidney Int* 2017;92:729-42.
11. Nankivell BJ, Renthawa J, Sharma RN, Kable K, O'Connell PJ, Chapman JR. BK Virus Nephropathy: Histological Evolution by Sequential Pathology. *Am J Transplant* 2017;17:2065-77.
12. Mehrabi A, Mood ZhA, Sadeghi M, Schmied BM, Müller SA, Welsch T, et al. Thymoglobulin and ischemia reperfusion injury in kidney and liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:viii54-viii60.
13. Li L, Okusa MD. Macrophages, dendritic cells, and kidney ischemia-reperfusion injury. *Semin Nephrol* 2010;30:268-77.
14. Nafar M, Dalili N, Poor-Reza-Gholi F, Ahmadpoor P, Samadian F, Samavat S. The appropriate dose of thymoglobulin induction therapy in kidney transplantation. *Clin Transplant* 2017;31. DOI: 10.1111/ctr.12977. Epub 2017 Apr 18.
15. Beiras-Fernandez A, Thein E, Chappel D, Gallego R, Fernandez-Roel D, Kemming G, et al. Polyclonal anti-thymocyte globulins influence apoptosis in reperfused tissues after ischaemia in a non-human primate model. *Transpl Int* 2004;17:453-7.
16. Torres IB, Moreso F, Sarró E, Meseguer A, Serón D. The interplay between inflammation and fibrosis in kidney transplantation. *Biomed Res Int* 2014;2014:750602.
17. Béland MA, Lapointe I, Noël R, Côté I, Wagner E, Riopel J, et al. Higher calcineurin inhibitor levels predict better kidney graft survival in patients with de novo donor-specific anti-HLA antibodies: a cohort study. *Transpl Int* 2017;30:502-9.