

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

**Pesquisa da fração do sistema complemento C4d,
capilarite e infiltração por macrófagos em biópsias de
transplante renal: papel na rejeição aguda mediada
por anticorpos e na sobrevida do enxerto**

DANIELA CRISTINA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

**BOTUCATU-SP
2011**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

**Pesquisa da fração do sistema complemento C4d,
capilarite e infiltração por macrófagos em biópsias de
transplante renal: papel na rejeição aguda mediada
por anticorpos e na sobrevida do enxerto**

MESTRANDA: DANIELA CRISTINA DOS SANTOS

ORIENTADORA: ROSA MARLENE VIERO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

**BOTUCATU-SP
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Santos, Daniela Cristina dos.

Pesquisa da fração do sistema complemento C4d, capilarite e infiltração por macrófagos em biópsias de transplante renal : papel na rejeição aguda mediada por anticorpos e na sobrevida do enxerto / Daniela Cristina dos Santos. – Botucatu : [s. n.], 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rosa Marlene Viero

Co-Orientador: Maria Fernanda Cordeiro de Carvalho

Capes: 40105008

1. Rins – Biópsia. 2. Macrófagos – Rejeição de enxertos.

Palavras-chave: Aloenxertos renais, Capilarite, C4d, Infiltração por macrófagos, Rejeição aguda mediada por anticorpos.

Dedicatória

*Dedico com todo amor e carinho a minha **filhinha Estela**, ao meu marido **Daniel**, aos meus pais **Cida** e **Olmindo**, aos meus irmãos **Renata** e **Arnaldo** e ao meu cachorrinho **Toicinho**.*

*Dedico também aos meus avós que já partiram **Maria** (in memoriam) e **Plínio** (in memoriam) e a minha cachorrinha **Pantera** (in memoriam).*

O que é a vida senão o Amor que temos e que recebemos. Amor esse que é eterno, incondicional, repleto de compaixão, de perdão e que não discrimina os que devem ou não serem amados. Somente esse amor é capaz de mudar a essência de toda criatura, plantar a verdadeira felicidade, fazer germinar a esperança, produzir flores de liberdade e frutos de renovação.

(Anônimo)

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, por tudo.

A minha filha **Estela**, por ser e trazer a felicidade e a luz em todos os meus dias.

Ao meu marido **Daniel**, pelo amor, carinho e paciência.

A minha mãe **Maria Aparecida** e aos irmãos **Renata** e **Arnaldo**, que embora distantes, deram-me a certeza de que estavam sempre orgulhosos de mim em todos os momentos.

Ao meu pai **Olmindo**, onde quer que esteja, por ter sido, indiretamente, o responsável pela minha coragem.

A todos os **amigos** que estão ou que passaram pela minha vida, pelas palavras de incentivo e momentos de alegria.

A Professora **Dra. Rosa Marlene Viero**, minha gratidão pela atenção e incentivo na realização deste trabalho.

A Professora **Dra. Fernanda** e ao **Dr. Gustavo** pelo acolhimento aos nossos pedidos de ajuda.

A Professora **Dra. Márcia Guimarães da Silva**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação, pela oportunidade de aprendizado.

A colaboração do laboratório do **Dr. Francisco Alves Moraes Neto** do Hospital Amaral Carvalho de Jaú.

Ao Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP), especialmente aos estatísticos **José Eduardo Corrente** e **Eloísa Elena Paschoalinote**, pelos prestativos serviços e disposição para elucidar nossas dúvidas.

A **todos** do Departamento de Patologia que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Resumo

Resumo

Trata-se de estudo retrospectivo, que visou estudar o papel do C4d, da capilarite e dos macrófagos na rejeição aguda renal. Foram estudados 76 casos de rejeição aguda entre 1991 e 2009. Primariamente, foi realizada análise histológica e reclassificação de todos os casos nos tipos de rejeição aguda (RA) I, II e III, segundo os critérios de Banff 97 para rejeição aguda do tipo celular (mediada por células T). A capilarite foi classificada pelos escores de Banff e por um segundo método de contagem proposto pelo estudo (ptc média), analisado através da contagem de todas as células inflamatórias intracapilares em 10 campos de aumento 400X. Foi realizado estudo imunoistoquímico para pesquisa de C4d e macrófagos em 69 e 47 casos, respectivamente. Identificamos 46 biópsias como RA tipo I, 21 como tipo II e, 9, tipo III. De 69 biópsias, 20 foram C4d positivas (14 padrão focal e 6, difuso). C4d se associou com glomerulite, capilarite (ptc média) e macrófagos. A capilarite estudada através do escore de Banff apresentou associação apenas com os tipos de rejeição ($P=0,04$). Entretanto, a capilarite (ptc média) além da associação com o C4d, teve correlação com macrófagos ($P=0,01$) e com a creatinina no momento da biópsia (CrI-creatinina inicial- $P<0,05$). Houve significância estatística entre macrófagos e tipos de rejeição, com maior número de macrófagos no grupo de RA tipo II+III ($P=0,03$) e no escore v3 ($P=0,04$). A perda do enxerto se associou com C4d positivo, glomerulite e RA tipo III. Em conclusão, o estudo demonstrou associação entre C4d positivo e lesões inflamatórias identificadas nos capilares, tanto peritubulares como glomerulares, com associação também para a infiltração por macrófagos. O conjunto de resultados sugere a possibilidade de componente humoral nos casos estudados.

Palavras-chave: *Aloenxertos renais, Capilarite, C4d, Infiltração por macrófagos, Rejeição aguda mediada por anticorpos.*

Abstract

We investigate the role of C4d deposition in peritubular capillaries, peritubular capillaritis and macrophage infiltration in acute renal rejection and, we evaluate their associations with morphological and clinical data. The study included 76 patients between 1991 and 2009. Histologic analysis of acute rejection I, II and III types was done by Banff 97 classification. Capillaritis was classified by the ptc Banff scores and by counting cells within peritubular capillaries in 10 high power fields 400X (ptc mean cells). C4d and macrophages were analyzed by immunohistochemistry, in 69 and 47 cases, respectively. Forty-six biopsies as type I, 21 type II and 9 type III were found. Twenty cases were positive C4d (14 focally and 6 diffuse). There were positive association between C4d staining and glomerulitis, peritubular capillaritis (ptc mean) and macrophage infiltration. Capillaritis using ptc Banff scores showed only statistical significant difference to type of rejection ($P=0.04$). Capillaritis analyzed by counting cells (ptc mean), beyond association with C4d, correlated to macrophage infiltration ($P=0.01$) and initial serum creatinine ($P<0.05$). Macrophage infiltration was significantly different between type I and II+III rejection ($P=0.03$) and showed increased arteritis score (v3) ($P=0.04$). Macrophage had also correlation with initial serum creatinine ($P=0.004$). There was significant graft loss in type III rejection, positive C4d and positive glomerulitis cases. The study demonstrated association between positive C4d cases and inflammatory lesions of glomerular and peritubular capillaries; there were more frequency of glomerulitis, peritubular capillaritis (ptc mean) and macrophage infiltrate in the positive C4d cases. These results can suggest a possible humoral component in the studied cases.

Keywords: *Acute antibody-mediated rejection, Capillaritis, C4d, Macrophage infiltration, Renal allografts.*

Sumário

Sumário

Capítulo I: Revisão de literatura

Sumário.....	01
1. Introdução.....	05
2. Rejeição aguda.....	08
3. Rejeição aguda mediada por células T.....	09
4. Rejeição aguda mediada por anticorpos.....	10
5. Diagnóstico da rejeição aguda mediada por anticorpos.....	13
5.1. Pesquisa de anticorpos circulantes anti-doador.....	13
5.2. Pesquisa de C4d em biópsias de enxerto renal.....	15
6. Importância da capilarite no diagnóstico da rejeição aguda.....	18
7. Importância dos macrófagos no diagnóstico da rejeição aguda.....	19
8. Sobrevida do enxerto renal.....	21
9. Referências bibliográficas.....	25
Objetivos.....	37

Capítulo II: Artigo científico

Title and authors.....	39
1. Abstract.....	40
2. Introduction.....	42
3. Patients and methods.....	44
3.1. Patients.....	44
3.2. Histopathological analysis.....	46
3.3. Immunohistochemistry.....	47
3.4. Quantitative analysis of macrophage.....	48
3.5. Statistical analysis.....	48
4. Results.....	50
4.1. Morphological and clinical characteristics and AR type.....	50
4.2. Morphological and clinical characteristics and C4d immunoexpression.....	53
4.3. Peritubular capillaritis and quantitative analysis of macrophages : additonal associations and correlations.....	56
4.4. Graft survival.....	58
5. Discussion.....	60
6. Acknowledgments.....	63
7. References.....	64
Conclusão final.....	70
Anexos.....	72

Revisão de literatura

I. Revisão de literatura

1. Introdução

Transplante renal representa alternativa terapêutica para pacientes com doença renal crônica terminal, pois recupera a homeostase metabólica e volêmica do paciente, e isso se reflete em maior sobrevida e qualidade de vida (Kaplan B, Meier-Kriesche HU, 2004).

A maior limitação ao transplante está na resposta imunológica do hospedeiro ao enxerto. O enxerto transplantado funciona como um corpo estranho no organismo do receptor, o que desencadeia inicialmente a resposta imune inata. Esta resposta determina quimiotaxia de células inflamatórias e síntese de mediadores capazes de estimular a imunidade antígeno-específica ou resposta imune adaptativa. A deterioração funcional do enxerto causada por essa resposta imune, na ausência de identidade genética entre doador e receptor, é definida como rejeição (Colvin RB, Mauiyyedi S, 2008).

As principais moléculas que participam da resposta imune aos transplantes de órgãos e tecidos são os antígenos do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC-*Major Histocompatibility Complex*) ou Antígeno Leucocitário Humano (HLA-*Human Leukocyte Antigen*). Os genes que codificam os antígenos HLA estão localizados no braço curto do cromossomo 6 e são divididos em duas classes: os de classe I (A, B e C) e os de classe II (DP, DQ e DR). Os primeiros são formados por uma cadeia polimórfica de 44 Kd ligada a uma microglobulina e são

encontrados em todas as células nucleadas e plaquetas. Os de classe II (DR, DP e DQ), são constituídos por uma cadeia α de 34 Kd e uma cadeia β de 29 Kd e se expressam no endotélio, linfócitos B, monócitos, macrófagos e células dendríticas (Suthanthiran M, Strom TB, 1994).

A rejeição pode envolver os componentes celular e humoral do sistema imune e encontra no linfócito T, o elemento central desse processo (Cornell *et al.*, 2008).

Células T alorreativas podem reconhecer moléculas MHC do doador, principalmente, através das vias de alorreconhecimento direta ou indireta. No alorreconhecimento direto, as células T do receptor reconhecem aloantígenos ligados a células apresentadoras de antígenos (APC- *Antigen Presenting Cell*) do doador. Este tipo de reconhecimento pode estar envolvido nos episódios precoces de rejeição. Na via indireta, os aloantígenos do doador são processados e apresentados como peptídeos pela APC do receptor. Após o reconhecimento, as células T entram em expansão clonal e migram para o enxerto determinando a resposta inflamatória (Benichou G, 1999; Tantravahi *et al.*, 2007).

O reconhecimento antigênico se inicia pela interação do receptor da célula T (TCR-T Cell Receptor) com os antígenos do complexo HLA. Os antígenos de classe II determinam a proliferação das células auxiliares CD4+ e indução de reação de hipersensibilidade tardia celular; os de classe I, promovem a diferenciação das células T CD8+ com reação celular de citotoxicidade (Colvin RB, 1990).

Os linfócitos T CD4+ exercem um papel fundamental na cascata imune e são subdivididos em linfócitos T auxiliares 1 (Th1) e 2 (Th2). Os Th1

sintetizam interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), fator de necrose tumoral β (TNF β) e interferon α , β e γ (IFN- α , IFN- β e IFN- γ), todos responsáveis pelo componente celular da resposta imune. Os linfócitos Th2 produzem interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10), responsáveis pelo componente humoral. (Mosmann TR, Coffman RL, 1989).

A IL-2 é um potente fator de crescimento dos linfócitos T, estimula a divisão celular das células T auxiliares e citotóxicas e ativa os macrófagos. O IFN- γ aumenta a expressão dos antígenos HLA de classe I e II e das moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1), o que intensifica a imunogenicidade dos enxertos e a sua vulnerabilidade aos linfócitos T citotóxicos (Bishop *et al.*, 1986).

A ativação e diferenciação celular com a síntese de citocinas amplificam a proliferação celular, a reação inflamatória e, conseqüentemente, a lesão ao enxerto. A migração das células linfomononucleares para o enxerto depende diretamente da ação das citocinas e fatores quimiotáticos e ocorre através do processo de transmigração, facilitado pela expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e leucócitos. As principais moléculas de adesão envolvidas nesse processo são: antígeno de função linfocitária tipo 1 (LFA-1), L-selectina 1 (LAM-1), moléculas de adesão intercelular 1 e 2 (ICAM-1 e ICAM-2) e a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) (Bishop *et al.*, 1989).

Todos os elementos dessa resposta imune determinam o aparecimento do processo inflamatório no enxerto, que pode comprometer os compartimentos glomerular, túbulo-intersticial e ou vascular, seja por lise

celular através de citotoxicidade, reação de hipersensibilidade tardia ou resposta humoral. As citocinas secretadas pelas células T auxiliares, também são responsáveis pela ativação dos linfócitos B, o que resulta na síntese de imunoglobulinas, ativação do sistema complemento e lesão do endotélio. (Colvin RB, Smith N, 2005).

De acordo com o tempo estimado de surgimento, a rejeição pode ser genericamente classificada como hiperaguda, aguda ou crônica (Colvin RB, Smith N, 2005).

As rejeições hiperagudas se desenvolvem dentro de minutos a horas pós-transplante, são raras, representam aproximadamente 0,5% dos casos, e podem ser prevenidas através do exame de prova cruzada e tipagem ABO no pré-transplante (Michaels *et al.*, 2003). A rejeição crônica aparece após meses a anos, tem uma incidência de aproximadamente 25% e participa em 50% a 80% dos casos de perda do enxerto renal (Mauiyyedi *et al.*, 2001).

2. Rejeição aguda

A rejeição aguda (RA) caracteriza-se por deterioração aguda da função do enxerto e pode ser imunologicamente mediada por células T, anticorpos ou ambos (Collins *et al.*, 1999).

Esta se desenvolve, geralmente, nos primeiros 3 meses pós-transplante, apresentando maior incidência entre o 3º e 10º dias. Quando é tardia, está associada, normalmente, à necrose tubular aguda, toxicidade causada por imunossupressores da classe dos inibidores de calcineurina-

fosfatase ou rejeição crônica (Colvin RB, Mauiyyedi S, 2008). Caracteriza-se clinicamente por diminuição da diurese, aumento da pressão arterial, ganho de peso e aumento da creatinina sérica (Pestana *et al.*, 1992).

O principal fator de risco para rejeição aguda é o grau de histocompatibilidade entre receptor e doador. A sensibilização prévia que pode ser desencadeada por retransplantes, gravidez e transfusões, está relacionada à maior probabilidade de surgimento dos anticorpos anti-doador (Cecka JM, 2003).

O exame anatomopatológico das biópsias de enxerto renal é considerado “padrão ouro” e foi padronizado pela classificação de Banff, com o objetivo de orientar o tratamento (Racusen *et al.*, 1999).

3. Rejeição aguda mediada por células T

A rejeição aguda mediada por células T (RAMCT) ou rejeição aguda celular, se desenvolve poucos dias a semanas após o transplante (Colvin RB, Mauiyyedi S, 2008). A frequência dos episódios desse tipo de rejeição diminui após os primeiros 6 meses do pós-transplante, porém, surtos podem ser observados em fases mais tardias (Reinke *et al.*, 1994). A reação das células T aos antígenos de histocompatibilidade do doador pode acometer isoladamente ou não, os compartimentos intersticial, tubular, vascular e glomerular. A intensidade da RAMCT depende dos graus de infiltrado inflamatório intersticial, tubular e vascular. O principal marcador morfológico dessa rejeição é a tubulite. Esta ocorre quando o

infiltrado mononuclear invade o túbulo e se insere entre a célula epitelial tubular e a sua membrana basal. No interstício, pode ser observado desde discreto edema e infiltrado mononuclear perivascular, até comprometimento difuso do parênquima renal. Polimorfonucleares também podem ser encontrados em casos severos. (Colvin RB, Nickleleit V, 2007). Eosinófilos podem estar presentes entre 2 a 3% do total de células no infiltrado, e são indicativos de prognóstico desfavorável (Kormendi *et al.*, 1988).

O acometimento vascular caracteriza os casos mais severos de RAMCT; este comprometimento assume desde formas de intinite, com edema e proliferação endotelial até inflamação e necrose transmural do vaso. Os glomérulos também podem ser acometidos com infiltrado mononuclear, edema e proliferação mesângio-endotelial (Racusen *et al.*, 1999).

As frequências de comprometimento são de 45 a 70%, 30 a 55% e 2 a 4%, nos compartimentos túbulo-intersticial, vascular e glomerular, respectivamente (Colvin RB, Nickleleit V, 2007).

4. Rejeição aguda mediada por anticorpos

Estudos demonstram que algumas formas mais severas de rejeição aguda, resistentes à terapia convencional, podem apresentar o componente humoral (Nickleleit V, Andreoni K, 2007).

A rejeição aguda mediada por anticorpos (RAMA) ou rejeição aguda humoral, ocorre devido à presença de anticorpos pré-formados da classe

IgG em baixos níveis séricos ou por anticorpos formados no pós-transplante (“De novo”) (Böhmig *et al.*, 2002; Mengel *et al.*, 2005).

A lesão causada pelos anticorpos ocorre principalmente, contra as células endoteliais através da ativação do sistema complemento pela via clássica. A ativação do complemento determina a lise do endotélio, ativação do sistema de coagulação, com formação de trombos, e quimiotaxia, com marginação de neutrófilos e monócitos (Böhmig *et al.*, 2002; Cornell *et al.*, 2008).

A prevalência de RAMA isolada é de aproximadamente 5,6 a 8,2%, e há uma frequência estimada de componente humoral entre 25 a 50% nos casos diagnosticados como rejeição aguda (Rotman *et al.*, 2005; Demirci *et al.*, 2008; Haas *et al.*, 2006). O aumento da frequência está diretamente relacionado à maior utilização de enxertos de doador falecido, pré-sensibilização por retransplantes, gravidez e transfusões sanguíneas, e à descoberta de técnicas mais sensíveis de detecção de aloanticorpos (Crespo *et al.*, 2001; Racusen *et al.*, 2003).

Geralmente a RAMA surge entre a 1ª e 3ª semanas, podendo ocorrer meses ou anos após o transplante, quando está associada à redução da terapia imunossupressora. As manifestações clínicas são inespecíficas, semelhantes à rejeição aguda severa, e incluem oligúria, rápida deterioração da função renal, podendo ou não cursar com leve proteinúria (Colvin RB, Nickleleit V, 2007).

Morfologicamente, a RAMA pode mostrar endoteliose, agrupamentos de neutrófilos e monócitos nos glomérulos e capilares peritubulares (PTC-*peritubular capillaries*), geralmente dilatados, caracterizando a glomerulite

aguda e a capilarite peritubular. Podemos ainda observar necrose fibrinóide vascular, endarterite, tubulite neutrofílica e mononuclear, trombose e necrose glomerular, áreas de infarto e hemorragia no parênquima (Magil AB, Tinckam KJ, 2003; Mauiyyedi *et al.*, 2002; Trpkov *et al.*, 1996). A RAMA pode apresentar apenas necrose tubular aguda (Habicht *et al.*, 2002) em aproximadamente 10% dos casos (Racusen *et al.*, 2003).

O diagnóstico diferencial entre rejeição mediada por células T e anticorpos nem sempre é possível baseado apenas em critérios morfológicos. Alguns estudos demonstraram 35 a 55% de glomerulite, 46 a 65% de capilarite, 25% de necrose fibrinóide de vasos, 20 a 46% de trombozes e 5 a 38% de infartos na rejeição mediada por anticorpos, contra 4 a 10% de glomerulite, 5 a 9% de capilarite, 0 a 5% de necrose fibrinóide vascular, 0 a 15% de trombozes e 0 a 2% de infartos na rejeição celular isolada (Mauiyyedi *et al.*, 2002; Nickeleit *et al.*, 2002; Trpkov *et al.*, 1996).

Raramente, a imunofluorescência usual consegue demonstrar depósitos de imunoglobulinas e complemento nas biópsias com suspeita de rejeição humoral. A rápida lise dos depósitos de imunoglobulinas e de complemento dificulta a detecção por esse método (Trpkov *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 1999; Michaels *et al.*, 2003).

A RAMA é uma das principais condições que levam à perda do enxerto nas fases iniciais do pós-transplante; estudos sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na rejeição humoral tem enfatizado a

importância de sua detecção e tratamento precoces (Herzenberg *et al.*, 2002; Lederer *et al.*, 2001).

São critérios para diagnóstico de RAMA: 1-deposição da fração C4d do complemento nos capilares peritubulares; 2-presença de pelo menos um dos seguintes componentes morfológicos: neutrófilos em PTC, necrose fibrinóide vascular ou necrose tubular aguda; 3-presença de anticorpos anti-doador circulantes (Racusen *et al.*, 2003).

Métodos para a detecção de anticorpos no soro e da fração C4d do sistema complemento nas biópsias do enxerto, tem-se mostrado efetivos no diagnóstico da RAMA (Moll *et al.*, 2005).

5. Diagnóstico da rejeição aguda mediada por anticorpos

5.1. Pesquisa de anticorpos circulantes anti-doador

Os anticorpos anti-doador específicos (*DSA-donor-specific antibodies*) são formados a partir do transporte e reconhecimento dos antígenos do doador nos órgãos linfóides periféricos. Esse reconhecimento é desempenhado pelas células B que passam por processo de proliferação, maturação e diferenciação em plasmócitos, que serão a fonte de DSA. Os anticorpos contra HLA e provavelmente, outros antígenos específicos do doador são, geralmente, de imunoglobulina (Ig) tipo G; também há produção de anticorpos do tipo IgM, contra antígenos do grupo sanguíneo ABO e alguns HLA específicos, que podem se desenvolver espontaneamente em resposta a reação cruzada com antígenos de

carboidratos exógenos (Colvin RB, Nickleit V, 2007; Colvin RG, Smith RN, 2005).

Jeannet *et al* (1970) relatam um dos primeiros estudos que descrevem a rejeição vascular severa decorrente da formação de anticorpos anti-HLA “De novo”. Em 1990, Halloran *et al.*, observaram casos de RA severa com rápida deterioração da função do enxerto associada à anticorpos contra antígenos HLA classe I do doador.

Terasaki PI, Ozawa M (2004) em estudo prospectivo internacional de 4763 pacientes, de 36 centros, demonstraram presença de anticorpos anti-HLA em 20,9% dos casos, com enxerto funcionante.

Outros estudos demonstraram painel de anticorpos (PRA-*panel reactive antibody*) superior a 50% no pós-transplante de pacientes com rejeição humoral (Böhmig *et al.*, 2001; Feucht *et al.*, 1991; Regele *et al.*, 2001).

A pesquisa de DSA no pós-transplante pode ser realizada por métodos de citotoxicidade dependente de complemento, utilizando células T e ou B, e ou citometria de fluxo (Crespo *et al.*, 2001; Fuller *et al.*, 1982). A pesquisa de DSA pré-transplante pode ser através de teste de citotoxicidade anti-globulina humana (Mauiyyedi *et al.*, 2002). Estudos recentes concluem que os testes de prova-cruzada por citometria de fluxo e o método de detecção de anticorpos anti-HLA por micropartículas fluorescentes, são sensíveis para detecção de DSA pré-transplante (Böhmig *et al.*, 2001; Karpinsky *et al.*, 2001).

Mauiyyedi *et al* (2002), encontraram em sua casuística, um perfil de 60% de aloanticorpos anti-doador classe I, 30%, classe II, e aloanticorpos combinados classes I e II, em 10% dos casos. Esses dados foram

consistentes com Halloran *et al*, (1990) que confirmaram a predominância de anticorpos circulantes contra os antígenos HLA classe I do doador.

Em 1996, Trpkov *et al* descreveram várias características morfológicas, em aloenxertos com rejeição, que se correlacionaram com a presença de anticorpos anti-HLA classe I no receptor. As características descritas foram vasculite severa com necrose fibrinóide, glomerulite, trombos de fibrina, infartos no parênquima e neutrófilos em PTC. Halloran *et al* (1990), encontraram associação semelhante com presença de neutrófilos em PTC.

5.2. Pesquisa de C4d em biópsias de enxerto renal

Em 1989, Zwirner *et al*, elaboraram reação de imunoperoxidase indireta com anticorpos monoclonais dos componentes do sistema complemento e detectaram a presença de C4d nos glomérulos. A partir desta observação, levantaram hipóteses sobre a relação do C4d com a ativação da via clássica do complemento.

Feucht *et al.*, (1991) pesquisaram a expressão da fração do sistema complemento C4d em biópsias de enxerto renal e demonstraram depósitos lineares nos capilares peritubulares. Estudo posterior do mesmo autor, em 1993, constatou que a deposição de C4d em PTC estava relacionada a uma forma mais severa de rejeição e que esta refletia alorreatividade humoral.

Em 2002, Mauiyyedi *et al* e Böhmig *et al* encontraram associação entre a positividade do C4d e a presença dos anticorpos doador-específicos (DSA), nos casos de rejeição aguda.

Analisando-se a identificação de anticorpos circulantes específicos anti-doador, associados a deposição de C4d nos PTC, nota-se que a incidência de RHA isolada é de 3 a 10%. Em aproximadamente 20 a 30% de todos os episódios de rejeição, o componente humoral também pode ser identificado (Watschinger *et al.*, 2002).

A via clássica do complemento é o mecanismo mais descrito na literatura sobre a provável gênese do C4d. A interação do imunocomplexo antígeno-anticorpo com a fração C1q promove uma modificação estrutural no complexo C1qrs ativando o C1s. O C1s, por sua vez, cliva proteoliticamente o C4 e origina as frações C4a e C4b. O C4b é clivado em C4c e C4d, pelo fator I plasmático e cofator protéico de membrana (MCP-*membrane cofactor protein*) que conservam o radical reativo do grupo tioéster na fração C4d, responsável pela ligação covalente com proteínas da membrana basal dos tecidos. (MCP-*membrane cofactor protein*) (Janeway Jr *et al.*, 2001; Platt JI, 2002). Essa capacidade de se ligar de forma permanente ao tecido, faz do C4d um marcador para a RHA (Feucht *et al.*, 1991; Feucht *et al.*, 1993).

A molécula de C4d é identificada como um peptídeo inativo, com 42Kd, que isoladamente não tem nenhuma atividade funcional, porém permanece aderida a membrana basal capilar vários dias após o desaparecimento das imunoglobulinas e da ativação do sistema complemento (Moll *et al.*, 2005). Análises de seguimento protocolar pós-

biópsia, demonstram que a persistência do C4d se correlaciona com a presença de anticorpos circulantes específicos anti-doador, e que o C4d, pode ser documentado na biópsia, entre o 8º e 18º dia após o início da injúria humoral (Mauiyyedi *et al.*, 2002; Nickeleit *et al.*, 2002).

Em 2004, foi proposta uma sequência de 4 estágios de desenvolvimento da rejeição aguda mediada por anticorpos: síntese “De novo” de anticorpos específicos anti-doador e ligação aos aloantígenos, ativação do sistema complemento com deposição do componente C4d nos capilares peritubulares, desenvolvimento de resposta inflamatória com surgimento dos critérios morfológicos e, finalmente, as manifestações clínicas (Takemoto *et al.*, 2004).

A pesquisa da fração C4d em biópsias de rim transplantado pode ser feita pelas técnicas de imunofluorescência e imunoistoquímica. Pela técnica de imunofluorescência, em fragmentos congelados, apresenta sensibilidade de 95% e especificidade de 96% (Mauiyyedi *et al.*, 2002). Regele *et al.*, (2001) encontraram em biópsias de enxertos de doador falecido, sensibilidade de 31% e especificidade de 93%, utilizando-se a técnica de imunoistoquímica em material emblocado em parafina.

De acordo com a observação de Nadasdy *et al.*, (2005) a positividade do C4d nos capilares peritubulares deve ser considerada segundo o método utilizado para a sua pesquisa. Por apresentar menor sensibilidade, a graduação da imunoistoquímica para o C4d é inferior a da imunofluorescência correspondente (Solez *et al.*, 2008).

Na literatura, a frequência de positividade para o C4d, independentemente da técnica utilizada, é de de 14 a 45% (Böhmig *et al.*,

2002; Demirci *et al.*, 2008; Magil *et al.*, 2003; Mauiyyedi *et al.*, 2002; Nickeleit *et al.*, 2002; Regele *et al.*, 2001). Observa-se correlação entre a deposição de C4d e a presença de neutrófilos em glomérulos, capilares peritubulares e parede tubular; correlação com necrose fibrinóide glomerular e vascular e, necrose tubular (Mauiyyedi *et al.*, 2002). Regele *et al* (2001) não encontraram correlação entre a positividade de C4d e padrões morfológicos da RA.

6. Importância da capilarite no diagnóstico da rejeição aguda

Os estudos tem enfatizado a importância da capilarite peritubular (ptc-*peritubular capillaritis*) como critério morfológico sugestivo de rejeição humoral aguda. A marginação de polimorfonucleares e ou mononucleares nos PTC e capilares glomerulares, tem associação com a positividade do C4d em vários estudos (Regele *et al.*, 2002; Tinckam *et al.*, 2005; Mengel *et al.*, 2007).

Trpkov *et al.*, (1996) e Mauiyyedi *et al.*, (2002) já salientavam a importância da capilarite e da glomerulite por polimorfonucleares como marcadores da rejeição humoral aguda.

Em 2003, a classificação de Banff iniciou a proposta de um método de escores para quantificar a marginação dessas células nos capilares peritubulares.

Esse método foi revisado em 2005 e classificado nos capilares peritubulares corticais, como: ptc0, sem evidências de células inflamatórias luminais; ptc1, de 3 a 4 células inflamatórias luminais; ptc2,

de 5 a 10 células e, ptc 3, acima de 10 células. Essa contagem se baseia nos capilares peritubulares mais severamente atingidos, de forma análoga ao critério de classificação do infiltrado túbulo-intersticial e tubulite. Biópsias com menos de 10% de infiltrado inflamatório em PTC corticais são consideradas ptc 0, desconsiderando-se o número de células nos capilares mais comprometidos. Nesta classificação é importante assinalar quando há predominância de células mononucleares, se existe dilatação dos capilares peritubulares e se a capilarite é difusa ou focal (Racusen *et al.*, 1999; Solez *et al.*, 2007; Solez *et al.*, 2008).

Magil e Tinckam (2003) encontraram associação entre C4d positivo e a capilarite e glomerulite polimorfonucleares. Estudo realizado por Fahim *et al* (2007) demonstrou que de todos os casos C4d positivos, 78% tinham capilarite peritubular, e que apenas 24% dos C4d negativos mostrava capilarite. Neste estudo, o escore mais encontrado foi o ptc2. Em 2007, Lerut *et al.*, encontraram associação entre C4d e capilarite peritubular em 50% dos casos.

Em 2010, Cosio *et al.*, demonstraram associação entre a intensidade da capilarite peritubular e a presença de anticorpos doador-específicos anti-HLA.

7. Importância dos macrófagos no diagnóstico da rejeição aguda

O infiltrado inflamatório constituído por macrófagos no interstício e nos glomérulos, em biópsias de enxerto renal, tem sido extensamente

discutido na literatura (Harry *et al.*, 1984; Om *et al.*, 1987; Burkhard *et al.*, 1994; Grimm *et al.*, 1999).

Os estudos de Häyry e von Willebrand (1981), forneceram as primeiras informações sobre a associação entre o predomínio de macrófagos, no infiltrado intersticial, e a severidade da rejeição. A imunoistoquímica tem demonstrado maior porcentagem de macrófagos na rejeição aguda mais severa (Hancock *et al.*, 1983). Kooijmans-Coutinho *et al.*, (1996), demonstraram que o número de macrófagos peritubulares foi significativamente maior em casos de rejeição aguda de padrão vascular. Grimm *et al.*, (1999), atribuíram aos macrófagos ativados, a função de distinguir a rejeição clínica da subclínica.

A observação desses autores foi utilizada como direcionamento para futuros estudos na rejeição aguda mediada por anticorpos (Fahim *et al.*, 2007; Magil *et al.*, 2003). Os macrófagos, considerados marcadores de rejeição severa, também foram incorporados na patogênese da rejeição humoral aguda (Michaels *et al.*, 2003).

A infiltração dos macrófagos está associada com a expressão do peptídeo quimiotático de monócitos (MCP-1 *monocyte chemotactic peptide-1*) (Grandaliano *et al.*, 1997), com o fator estimulante das colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF-*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Kajiwara *et al.*, 1996) e com o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF-*macrophage migration inhibitory factor*) (Lan *et al.*, 1998).

O estudo de Magil e Tinckam (2003) demonstrou associação entre a positividade para C4d e a presença de maior número de macrófagos no

infiltrado intersticial; o grupo de biópsias positivas para C4d teve aumento significativo de macrófagos no infiltrado intersticial e no glomérulo comparado ao grupo C4d negativo. Contudo, o trabalho descrito acima não esclareceu se os macrófagos intersticiais estavam ou não dentro dos capilares peritubulares (Magil *et al.*, 2009).

No estudo de Fahim *et al.* (2007), através de dupla marcação imunoistoquímica para o endotélio dos capilares, para macrófagos e linfócitos T, foi possível determinar que a razão macrófagos/linfócitos T dentro dos capilares peritubulares foi significativamente maior nas biópsias positivas para C4d comparadas às negativas.

Dados recentes também encontraram associação entre a positividade de C4d em capilares peritubulares e a infiltração de macrófagos e monócitos nos glomérulos; há predominância de infiltração mononuclear em glomérulos com C4d positivo, focal ou difuso nos capilares peritubulares (Sund *et al.*, 2004; Magil *et al.*, 2005; Magil *et al.*, 2006).

8. Sobrevida do enxerto renal

A quantidade de episódios de rejeição aguda no transplante renal é considerada fator de risco isolado para a sobrevida do enxerto pós-transplante (Meier-Kriesche *et al.*, 2000, Hariharan S, 2001). Estudos clínicos demonstram que, nos primeiros 6 meses pós-transplante, 12 a 18% dos enxertos de doador vivo e 14 a 30%, de doador falecido, podem evoluir para rejeição aguda. Rejeição aguda é responsável por 11 a 16%

dos casos de perda do enxerto no primeiro ano, e por 7 a 11% dos casos com mais de um ano de transplante (Cecka, 2004).

Em 1995, Lobo *et al.*, identificaram que havia menor sobrevida do enxerto nos casos com RAMA. Posteriormente, observou-se perda do enxerto, em até um ano, em 29 a 75% dos casos, após episódio de RAMA e, 3 a 7% de perda, após RAMCT sem componente humoral. (Racusen *et al.*, 2003; Böhmig *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 1999). Cerca de 75% das perdas de enxerto que ocorrem no período de um ano são de casos de rejeição aguda humoral com C4d positivo (Mauiyyedi *et al.*, 2002).

Lederer *et al.*, (2001), correlacionaram a positividade do C4d ao prognóstico da rejeição e concluíram que este marcador foi o principal critério para a perda do enxerto. O mesmo estudo demonstrou que a presença de C4d, nos capilares peritubulares, tem maior impacto na sobrevida do enxerto, principalmente, nas biópsias realizadas nos primeiros 6 meses pós-transplante.

A presença de C4d interfere na sobrevida do enxerto independentemente do tipo histológico da rejeição (Herzenberg *et al.*, 2002). Neste estudo, 33% dos casos de rejeição aguda túbulo-intersticial e, 44%, dos casos de rejeição vascular, perderam o enxerto no período de aproximadamente 24 meses. O pior prognóstico do enxerto está fortemente relacionado à positividade difusa do C4d (Kayler *et al.*, 2008; Poduval *et al.* 2005).

Poduval *et al.* (2005) identificaram perda do enxerto em 67% dos casos com C4d difuso no primeiro ano pós-transplante. No entanto, a positividade focal do C4d apresenta também pior prognóstico quando comparada ao C4d negativo (Kayler *et al.*, 2008).

Em 2010, Cosio *et al.* investigaram a participação isolada e conjunta de variáveis relacionadas à rejeição aguda. Neste estudo, a presença independente de DSA não foi um fator relevante na evolução do enxerto, no entanto, esses anticorpos associados ao C4d positivo interferem significativamente na sobrevida. Outros autores observaram 6,6 % de perda do enxerto, em um ano, nos pacientes com positividade para anticorpos anti-HLA e 3,3% de perda, nos pacientes negativos. Concluíram, neste estudo, que a presença de anticorpos pode levar a perda tardia do enxerto (Terasaki PI, Osawa M, 2004).

Em relação à presença de capilarite ou glomerulite, houve pior sobrevida nas rejeições agudas positivas para C4d e essa observação se estendeu também para casos com suspeita de rejeição aguda (“borderline”). A presença de DSA, principalmente HLA tipo I, está associada a maior probabilidade de RA com C4d positivo e, consequentemente, capilarite e ou glomerulite. Esse conjunto de fatores está intimamente relacionado com pior sobrevida do enxerto (Cosio *et al.*, 2010).

Tem sido discutido por alguns autores (Colvin *et al.*, 1997) se a infiltração de macrófagos no interstício e ou glomérulos é um fator independente de pior sobrevida do enxerto ou se esse infiltrado interfere indiretamente no prognóstico quando está presente na rejeição aguda severa.

A rejeição aguda com deposição de C4d associada à infiltração de macrófagos, particularmente, no glomérulo, conduz à pior sobrevida do enxerto (Magil *et al.*, 2006; Worthington *et al.*, 2007). Tinkam *et al.*, (2005) demonstraram que a infiltração de macrófagos no glomérulo, está associada a pior prognóstico, independente da positividade do C4d.

Diante do exposto, observamos a necessidade de estudos adicionais para a compreensão da RAMA, sua relação com a imunoexpressão do C4d e interação com componentes morfológicos como a capilarite e glomerulite de padrão polimorfonuclear ou mononuclear.

9. Referências bibliográficas

1. Benichou G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci.* 1999 May 15; 4:D476-80.
2. Bishop GA, Hall BM, Duggin GG, Horvath Js, Sheil AG, Tiller DJ. Immunopathology of renal allograft rejection analyzed with monoclonal antibodies to mononuclear cell markers. *Kidney Int.* 1986 Mar; 29(3):708-17.
3. Bishop GA, Waugh JA, Landers DV, Krensky AM, Hall BM. Microvascular destruction in renal transplant rejection. *Transplantation.* 1989 Sep; 48(3):408-14.
4. Böhmig GA, Exner M, Habicht A, Schillinger M, Lan U, Kletzmayer J, Säemann MD, Hörl WH, Watschinger B, Regele H. Capillary C4d deposition in kidney allografts: specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 1091-99.
5. Böhmig GA, Regele H, Exner M, Derhartunian V, Kletzmayer J, Säemann MD, Hörl WH, Druml W, Watschinger B. C4d-positive acute humoral renal allograft rejection: effective treatment by immunoadsorption. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Nov; 12 (11): 2482-89.
6. Burkhard K, Hofmann GO, Bösnecker A, Hillebrand G, Illner WD, Petersen P, Land W. Early infiltration of renal allografts with 27E10-positive macrophages and graft outcome. *Transpl Int.* 1994; 7 Suppl 1: S577-9.
7. Cecka JM. The OPTN/UNOS renal transplant registry 2003. *Clin Transpl.* 2003; 1-12.

8. Cecka JM. The OPTN/UNOS renal transplant registry. Clin Transpl. 2004; 1-16.
9. Collins AB, Shneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Williams WW, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB, Colvin RB. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. Am Soc Nephrol. 1999; 10: 2208-14.
10. Colvin RB, Mauiyyedi S. Pathology of Kidney Transplantation. In: Morris PJ, Knechtle SJ, editors. Kidney transplantation: principles and practice. 6th ed. Philadelphia : Saunders Elsevier; 2008. p. 383-415.
11. Colvin RB, Nickleleit V. Renal Transplant Pathology. In: Jennete JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG, editors. Heptinstall's Pathology of the kidney. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p.1347-1490.
12. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. Nat Rev Immunol. 2005; 5(10):807-17.
13. Colvin RB, Cohen AH, Saiontz C, Bonsib S, Buick M, Carter S, Cavallo T, Haas M, Lindblad A, Manivel JC, Nast CC, Salomon D, Weaver C, Weiss M. Evaluation of pathologic criteria for acute renal allograft rejection: reproducibility, sensitivity, and clinical correlation. J Am Soc Nephrol. 1997 Dec; 8(12):1930-41.
14. Colvin RB. Cellular and molecular mechanisms of allograft rejection. Annu Rev Med. 1990; 41: 36-75.
15. Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. Annu Rev Pathol. 2008; 3: 189-220.

16. Cosio FG, Lager DJ, Lorenz EC, Amer H, Gloor JM, Stegall MD. Significance and implications of capillaritis during acute rejection of kidney allografts. *Transplantation*. 2010 Jul; 12(7):1022-24.
17. Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Mauiyyedi S, Collins AB, Fitzpatrick D, Farrell M, Williams WW, Delmonico FL, Cosimi AB, Colvin RB, Saidman SL. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation*. 2001; 71: 652-58.
18. Demirci C, Sen S, Sezak M, Sarsik C, Hoscoskun C, Töz H. Incidence and importance of C4d deposition in renal allograft dysfunction. *Transplant Proc*. 2008. 40: 174-77.
19. Fahim T, Böhmig GA, Exner M, Huttary N, Kerschner H, Kandutsch S, Kerjaschki D, Bramböck A, Nagy-Bojarszky K, Regele H. The cellular lesion of humoral rejection: predominant recruitment of monocytes to peritubular and glomerular capillaries. *Am J Transplant*. 2007 Feb; 7(2): 385-93.
20. Feucht HE, Felber E, Gokel HJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, Held E, Riethmuller G, Land W, Albert E. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell mediated rejection. *Clin Exp Immunol*. 1991; 86: 464-70.
21. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmuller G, Land W, Albert E. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int*. 1993; 43: 1333-38.

22. Fuller TC, Phelan D, Gebel HM, Rodey GE. Antigenic specificity of antibody reactive in the antiglobulin-augmented lymphocytotoxicity test. *Transplantation*. 1982 Jul; 34(1): 24-29.
23. Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieiri E, Monno R, Stallone G, Schena FP. Monocyte chemotactic peptide-1 expression and monocyte infiltration in acute renal transplant rejection. *Transplantation*. 1997 Feb15; 63(3):414-20.
24. Grimm PC, McKenna R, Nickerson P, Russell ME, Gough J, Gospodarek E, Liu B, Jeffery J, Rush DN. Clinical rejection is distinguished from subclinical rejection by increased infiltration by a population of activated macrophages. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Jul; 10(7): 1582-9.
25. Haas M, Rahman MHR, Racusen LC, Kraus ES, Bagnasco SM, Segev DL, Simpkins CE, Warren DS, King KE, Zachary AA, Montgomery RA: C4d and C3d staining in biopsies of ABO-and HLA-incompatible renal allografts: correlation with histologic finding. *Am J Transplant*. 2006; 6: 1829-40.
26. Habicht A, Regele H, Exner M, Soleiman A, Hörl WH, Watschinger B, Derfler K, Böhmig GA. A case of severe C4d-positive kidney allograft dysfunction in the absence of histomorphologic features of rejection. *Wien Klin Wochenschr*. 2002 Nov 30; 114(21-22):945-8.
27. Halloran PF, Wadgymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of anti-class I antibody response. Clinical and pathologic features of anti-class I mediated rejection. *Transplantation*. 1990; 49: 85-91.

28. Hancock WW, Thomson NM, Atkins RC. Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts. *Transplantation*. 1983 May; 35(5): 458-63.
29. Hariharan S. Long-term kidney transplant survival. *Am J Kidney Dis*. 2001; 38 [Suppl 6]: S44-S50.
30. Harry TR, Coles GA, Davies M, Bryant D, Williams GT, Griffin PJ. The significance of monocytes in glomeruli of human renal transplants. *Transplantation*. 1984 Jan; 37:70-3.
31. Häyry P, von Willebaand E. Monitoring of human renal allograft rejection with fine-needle aspiration cytology. *Scand J Immunol*. 1981; 13(1):87-97.
32. Herzenberg AM, Gill JS, Djurdjev O, Magil AB. C4d deposition in acute rejection: an independent long term prognostic factor. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Jan; 13(1): 234-41.
33. Imai N, Nishi S, Alchi B, Ueno M, Fukase S, Arakawa M, Saito K, Takahashi K, Gejyo F. Immunohistochemical evidence of activated lectin pathway in kidney allografts with peritubular capillary C4d deposition. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21: 2589-95.
34. Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology* 5: The immune system in health and disease. 5 th ed. New York: Garland Science; 2001.
35. Jeannet M, Pinn VW, Flax MH, Winn HJ, Russell PS. Humoral antibodies in renal allotransplantation in man. *N Engl J Med*. 1970; 282: 111-17.

36. Kajiwarra I, Kawamura K, Takebayashi S. An analysis of moocyte/macrophage subsets and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in renal allograft biopsies. *Nephron*. 1996; 73(4):536-43.
37. Kaplan B, Meier-Kriesche HU. Renal transplantation: a half century of success and the long road ahead. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Dec; 15(12): 3270-71.
38. Karpinski M, Rush O, Jeffery J, Exner M, Regele H, Dancea S, Ponchico O, Birk P, Nickerson P. Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Dec; 12(12): 2807-14.
39. Kayler LK, Mohanka R, Basu A, Shapiro R, Randhawa PS. Correlation of histologic findings on preimplant biopsy with kidney graft survival. *Transpl Int*. 2008 Sep; 21(9):892-8.
40. Kooijmans-Coutinho MF, Hermans J, Schrama E, Ringers J, Daha MR, Bruijn JA, van der Woude FJ. Interstitial rejection, vascular rejection and diffuse thrombosis of renal allografts: predisposing factors, histology, immunohistochemistry and relation to outcome 1. *Transplantation*. 1996 May 15; 61(9):1338-44.
41. Kormendi F, Amend WJ Jr. The importance of eosinophil cells in kidney allograft rejection. *Transplantation*. 1988 Mar; 45(3): 537-39.
42. Lan HY, Yang N, Brown FG, Isbel NM, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Metz CN, Bacher M, Atkins RC, Bucala R. Macrophage migration

inhibitory factor expression in human renal allograft rejection.

Transplantation. 1998 Dec 5; 66(11):1465-71.

43. Lederer SR, Kluth-Pepper B, Schneeberger H, Albert E, Land W, Feucht HE. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long term survival of renal allografts. *Kidney Int.* 2001 Jan; 59(1): 334-41.

44. Lerut E, Naesens M, Kuypers DR, Vanrenterghem Y, Van Damme B. Subclinical peritubular capillaritis at 3 months is associated with chronic rejection at 1 year. *Transplantation.* 2007 Jun 15; 83(11): 1416-22.

45. Lobo PI, Spencer CE, Stevenson WC, Pruett TL. Evidence demonstrating poor kidney graft survival when acute rejections are associated with IgG donor-specific lymphocytotoxin. *Transplantation.* 1995 Feb 15; 59(3): 357-60.

46. Magil AB. Infiltrating cell types in transplant glomerulitis: relationship to peritubular capillary C4d deposition. *Am J Kidney Dis.* 2005 Jun; 45(6):1084-9.

47. Magil AB. Monocytes/macrophages in renal allograft rejection. *Transplant Rev.* 2009 Oct; 23(4):199-208.

48. Magil AB, Tinckam KJ. Focal peritubular capillary C4d deposition in acute rejection. *Nephrol Dial Transplant.* 2006 May; 21(5):1382-8.

49. Magil AB, Tinckam KJ. Monocytes and peritubular capillary C4d deposition in acute renal allograft rejection. *Kidney Int.* 2003 May; 63(5); 1888-93.

50. Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Tolkoff-Rubin NE, Williams WW, Delmonico FL, Cosimi AB, Colvin RB.

Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology and pathologic classification. J Am Soc Nephrol. 2002; 13: 779-87.

51. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolkoﬀ-Rubin NE, Williams WW, Cosimi AB: Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. J Am Soc Nephrol. 2001; 12: 574-82.

52. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Hanson JA, Cibrik D, Punch JD, Leichtman AB, Kaplan B. Increased impact of acute rejection on chronic allograft failure in recent era. Transplantation. 2000; 70: 1098-1100.

53. Mengel M, Gwinner W, Schwarz A, Bajeski R, Franz I, Brocker V, Becker T, Neipp M, Klempnauer J, Haller H, Kreipe H. Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts. Am J Transplant. 2007; 7: 356-65.

54. Michaels PJ, Fishbein MC, Colvin RB. Humoral rejection of human organ transplants. Springer Semin Immunopathol. 2003; 25:119-140.

55. Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts.Minireview. Am J Transplant. 2005; 5: 2611-2618.

56. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: differen patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol. 1989; 7:145-73.

57. Nadasdy GM, Bott C, Cowden D, Pelletier R, Ferguson R, Nadasdy T. Comparative study for the detection of peritubular capillary C4d deposition in human renal allografts using different methodologies. Human Pathology. 2005. 36: 1178-85.

58. Nickleit V, Andreoni K. The classification and treatment of antibody-mediated renal allograft injury: Where do we stand? *Kidney International*. 2007. 71(1):7-11.
59. Nickleit V, Zeiler M, Gudat F, Thiel G, Mihatsch MJ. Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts : diagnostic and therapeutic implications. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 242-51.
60. Om A, Baquero A, Raja R, Kim P, Bannett AD. The prognostic significance of the presence of monocytes in glomeruli of renal trnasplant allografts. *Transplant Proc*. 1987 Feb; 19 (1 Pt 2): 1618-22.
61. Pestana JOM, Ramos OL, Ajzen H. Guia clínico para o transplante renal. *J Bras Nefrol*. 1992 Jun; 14(2): 66-86.
62. Platt JL. C4d and the fate of organ allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Sep; 13(9): 2371-80.
63. Poduval RD, Kadambi PV, Josephson MA, Cohn RA, Harland RC, Javaid B, Huo D, Manaligod JR, Thistlethwaite JR, Meehan SM. Implications of immunohistochemical detection of C4d along peritubular capillaries in late acute renal allograft rejection. *Transplantation*. 2005 Jan; 79(2):228-35.
64. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, Cecka MJ, Cosyns J, Demetris AJ, Fishbein MC, Fogo A, Furness P, Gibson IW, Glotz D, Hayry P, Hunsickern L, Kashgarian M, Kerman R, Magil AJ, Montgomery R, Morozumi K, Nicklei V, Parmjeet R, Regele H, Seron D, Seshan S, Sund S, Trpkov K: Antibody-mediated rejection criteria- an addition to the Banff '97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant*. 2003; 3: 708-14.

65. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Caballo T, Crocker BP, Demetris AJ., Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gimbson IW, Glotz D, Goldeberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman, EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Marcussen N, Mihastch MJ, Nadasdy T, Nickerson P, Olsen TS, Papadimitriou JC, Randhawa PS, Rayner DC, Roberts I, Rose S, Rush D, Salinas-Madriga L, Salomon DR, Sund S, Taskinen E, Trpkov K, Yamaguchi Y: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999; 55: 713-23.
66. Regele H, Exner M, Watschinger B, Wenter C, Wahrmann M, Österreicher C, Saemann MD., Mersich N, Horl WH, Zlabinger GJ, Böhmig GA: Endothelial C4d deposition is associated with inferior kidney allograft outcome independently of cellular rejection. *Nephrol Dial Transplant.* 2001; 16: 2058-66.
67. Reinke P, Fietze E, Docke WD, et al. Late acute rejection in long-term renal allograft recipients. Diagnostic and predictive value of circulating activated T-cell. *Transplantation.* 1994 Jul 15; 58 (1): 35-41.
68. Rotman S, Collins AB, Colvin RB: C4d deposition in allografts: current concepts and interpretation. *Transplant Rev.* 2005; 19: 65-77.
69. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DSR, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihastch M, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN,

Valente M: Banff' 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* 2008; 8: 753-60.

70. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF., Birk PE, Campbell PM, Cascalho M, Collins AB, Demetris AJ, Drachenberg CB., Gibson IW, Grimm PC, Haas M, Lerut E, Liapis H, Mannon RB, Marcus PB, Mengel M, Mihatsch MJ, Nankivell BJ, Nickeleit V, Papadimitriou JC, Platt JL, Randhawa P, Roberts I, Salinas-Madriga L, Salomon DR, Seron D, Sheaff M, Weening JJ,: Banff ' 05 meeting report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of Chronic Allograft Nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant.* 2007; 7: 518-26.

71. Sund S, Reisaeter AV, Scott H, Mollnes TE, Hovig T. Glomerular monocyte/macrophage influx correlates strongly with complement activation in 1-week protocol kidney allograft biopsies. *Clin Nephrol.* 2004 Aug; 62(2):121-30.

72. Suthantiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med.* 1994 Aug 11; 331(6):365-76.

73. Takemoto SK, Zeevi A, Feng S, Colvin RB, Jordan S, Kobashigawa J, Kupiec-Weglinski J, Matas A, Montgomery RA, Nickerson P, Platt JL, Rabb H, Thistlethwaite R, Tyan D, Delmonico FL. National Conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2004 Jul; 4(7):1033-41.

74. Tantravahi J, Womer KL, Kaplan B. Why hasn't eliminating acute rejection improved graft survival? *Annu Rev Med.* 2007; 58:369-85.

75. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant.* 2004 Mar; 4(3):438-43.

76. Tinckam KJ, Djurdjev O, Magil AB. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute allograft rejection independent of C4d status. *Kidney Int.* 2005 Oct; 68(4): 1866-74.
77. Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody. Analysis using the Banff grading schema. *Transplantation.* 1996 Jun 15; 61 (11):1586-92.
78. Watschinger B, Pascual M. Capillary C4d deposition as a marker of humoral immunity in renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Sep; 13(9):2420-3.
79. Worthington JE, McEwen A, McWilliam LJ, Picton ML, Martin S. Association between Cd staining in renal transplant biopsies, production of donor-specific HLA antibodies, and graft outcome. *Transplantation.* 2007 Feb 27; 83(4):398-403.
80. Zwirner J, Felber E, Herzog V, Riethmüller G, Feucht HE. Classical pathway of complement activation in normal and diseased human glomeruli. *Kidney Int.* 1989; 36(6):1069-77.

Objetivos

O transplante renal ocupa posição importante no tratamento de pacientes com insuficiência renal crônica terminal oferecendo melhor sobrevida. O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP realiza transplantes desde Junho de 1987. A partir desta data a dezembro de 2010; 525 transplantes já foram feitos no serviço, destes, 309 de doadores vivos e 216 de doadores falecidos.

Neste sentido, este estudo tem como objetivo uma análise retrospectiva, clínica e morfológica, dos casos de rejeição aguda diagnosticados por biópsia:

1. Avaliação clínica, através dos parâmetros: sexo e idade do receptor, doença de base, tipo de doador, incompatibilidades, número de transplantes, tempo de isquemia fria, sensibilização prévia, creatinina sérica no momento da biópsia e final do seguimento, retardo inicial da função do enxerto, esquema imunossupressor, tempo de seguimento e evolução do enxerto.
2. Avaliação morfológica com revisão das biópsias e classificação da rejeição de acordo com os critérios de Banff'97
3. Avaliação da capilarite (ptc) pelos critérios da classificação de Banff'05 e análise quantitativa das células.
4. Pesquisa do marcador C4d pela técnica de imunoistoquímica.
5. Pesquisa de macrófagos pela técnica de imunoistoquímica utilizando-se o anticorpo monoclonal CD68.

Artigo científico

The role of C4d peritubular, capillaritis and macrophage infiltration in acute rejection of renal allografts

Daniela Cristina dos Santos¹, Luis Gustavo Modelli de Andrade², Maria Fernanda Cordeiro de Carvalho², Francisco Alves Moraes Neto³, Rosa Marlene Viero¹

¹Department of Pathology, Medical School, UNESP- São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil

²Department of Internal Medicine, Medical School, UNESP- São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil

³ Department of Pathology, Amaral Carvalho Hospital, Jaú, São Paulo, Brazil

Corresponding author: Daniela Cristina dos Santos, MD

Address: Department of Pathology, Medical School, UNESP- São Paulo State University, Botucatu, 18618-970, São Paulo, Brazil

Phone: 55-0-15-14-3811-6238

Fax: 55-0-15-14-3815-2348

E-mail: dancrissantos@yahoo.com.br

1. Abstract

We investigate the role of C4d deposition in peritubular capillaries, peritubular capillaritis and macrophage infiltration in acute renal rejection and, we evaluate their associations with morphological and clinical data. The study included 76 patients between 1991 and 2009. Histologic analysis of acute rejection I, II and III types was done by Banff 97 classification. Capillaritis was classified by the ptc Banff scores and by counting cells within peritubular capillaries in 10 high power fields 400X (ptc mean cells). C4d and macrophages were analyzed by immunohistochemistry, in 69 and 47 cases, respectively. Forty-six biopsies as type I, 21 type II and 9 type III were found. Twenty cases were positive C4d (14 focally and 6 diffuse). There were positive association between C4d staining and glomerulitis, peritubular capillaritis (ptc mean) and macrophage infiltration. Capillaritis using ptc Banff scores showed only statistical significant difference to type of rejection ($P=0.04$). Capillaritis analyzed by counting cells (ptc mean), beyond association with C4d, correlated to macrophage infiltration ($P=0.01$) and initial serum creatinine ($P<0.05$). Macrophage infiltration was significantly different between type I and II+III rejection ($P=0.03$) and showed increased arteritis score (v3) ($P=0.04$). Macrophage had also correlation with initial serum creatinine ($P=0.004$). There was significant graft loss in type III rejection, positive C4d and positive glomerulitis cases. The study demonstrated association between positive C4d cases and inflammatory lesions of glomerular and peritubular capillaries; there were more frequency of glomerulitis, peritubular capillaritis (ptc mean) and macrophage infiltrate in

the positive C4d cases. These results can suggest a possible humoral component in the studied cases.

Keywords: *Acute antibody-mediated rejection, Capillaritis, C4d, Macrophage infiltration, Renal allografts.*

2. Introduction

Diagnosis of acute antibody-mediated rejection (ABMR) has been of fundamental relevance for the prognosis of renal transplanted patients. Its incidence is about 8% in large centers (Mauiyyedi et al., 2002; Böhmig et al., 2001; Crespo et al., 2001), and is usually recognized as severe acute rejection (AR) and non-responsive to conventional treatment regimens (Colvin RB, Nickleleit V, 2007; Nickleleit V, Andreoni K, 2007). Studies also have considered it an important cause of graft failure (Feucht et al., 1993; Lobo et al., 1995; Lederer et al., 2001).

Studies have demonstrated that humoral rejection is associated with the circulating donor-specific antibodies (DSA) and, these antibodies promote complement activation along the endothelial cells in the renal allografts (Halloran et al., 1990; Böhmig et al., 2001; Feucht et al., 1991; Regele et al., 2001; Feucht HE, 2003).

C4d is a stable complement split product of C4d during the classic complement activation pathway. Because of an internal thioester bond, it can bind covalently to the endothelium, therefore, it has been shown to be an in situ marker of ABMR (Collins et al., 1999; Crespo et al., 2001; Watschinger et al., 2002; Böhmig et al., 2002).

Feucht et al (1993) were the first to identify C4d staining on the peritubular capillaries in patients with acute allograft dysfunction, and reported 57% one-year graft survival in patients with diffuse C4d staining contrasting with 90% in the grafts negative C4d. The results indicated that C4d positivity is an

important predictor of graft survival. Collins et al (1999) showed correlation between C4d staining and *De Novo* anti-HLA antibodies.

Some morphological features also can correlate with DSA, as glomerulitis, severe vasculitis, fibrinoid necrosis, fibrin thrombi, neutrophils in peritubular capillaries and infarction. However, none of this morphological criteria are specific for ABMR (Trpkov et al., 1996; Mauiyyedi et al., 2002; Nickeleit et al., 2002).

From all these morphological features, margination of neutrophils in capillaries and fibrinoid necrosis were the most described in acute ABMR (Collins et al., 1999; Racusen et al., 2003).

Inflammatory cells within glomerular and peritubular capillaries are a common morphologic finding in allograft rejection. Glomerulitis and peritubular capillaritis (ptc) with high numbers of neutrophils have been suggested as a marker of humoral rejection (Trpkov et al., 1996; Mauyyiedi et al., 2002; Solez et al., 2008) and are associated with positive C4d staining in many studies (Regele et al., 2002; Magil et al., 2003; Mengel et al., 2007).

The composition of the intracapillary cell population is specially important to diagnosis of acute ABMR. There is some evidence suggesting that macrophages infiltrate in glomeruli and peritubular capillaries is associated with acute ABMR and C4d (Sund et al., 2004; Magil et al., 2003; Fahim et al., 2007, Magil et al., 2005; Solez et al., 2008).

These studies suggested the possibility of interaction among immunoexpression of C4d, glomerulitis, peritubular capillaritis and macrophage infiltration.

To investigate these issues, in this study, we assessed their possible associations, analyzing C4d staining, glomerulitis, macrophage infiltration and capillaritis by two different methods. We also studied whether the presence of these criteria affects graft survival in AR.

3. Patients and methods

3.1. Patients

Between June 1987 and December 2010, 525 patients received renal allograft at our Institution. We retrospectively analyzed according to Banff 97, one hundred and ninety-eight (198) biopsies diagnosed clinically as acute rejection, in the period from January 1991 to March 2009. Seventy six cases (76) with available renal tissue for immunohistochemical analysis and complete clinical information were selected.

Human leukocyte antigen (HLA) matching was defined as the number of HLA-matched antigens at loci A, B and DR. All recipients were transplanted in the presence of a negative pretransplant cytotoxic crossmatch, tested against peripheral blood lymphocytes from living donors or lymphocytes from lymph nodes or spleen from deceased donor. Pretransplant panel reactive antibodies (PRA) was determined by Luminex Assay prior to transplantation. Delayed graft function was defined as need for dialysis within the first week post-transplantation. Graft loss was defined as resumption of dialysis. Survival was censored for patients dying with functional graft.

Initial immunosuppression was achieved using triple therapy regimen of azathioprine, prednisone and calcineurin inhibitors, cyclosporine or tacrolimus (n=30) or prednisone, calcineurin inhibitor and mycophenolate mofetil (n=40); 5 patients received azathioprine and prednisone and 1 patient received mycophenolate mofetil and prednisone. Additional to standard triple immunosuppression, 31 patients received basiliximab and 6 patients received thymoglobuline.

Detailed clinical data were obtained by retrospective chart review (Table 1).

The study was approved by Ethic Research Committee of Botucatu Medical School (Nº Of. 511/08).

Table1: Clinical variables

Variables	Values
n	76
Recipient age (yr, mean, SD)	37.7±15.2
Recipient sex (%)	
Male	55.3
Primary disease (%)	
Hypertension	26.3
Glomerulonephritis	25
Diabetes mellitus	7,9
Others	25
Indeterminate	15.8
Donor (%)	
Living	53.9
HLA mismatch pretransplant (mean, SD)	2.3±1.3
Cold ischemic time (%)	
<24h	77.6
Delayed graft function (%)	34.2
SCr at the time of biopsy (mg/dl, mean, SD)	4.51±3.47
SCr at last visit (mg/dl, mean. SD)	2.89±2.38
Follow-up (mo, mean, SD)	47.8±51.4
Follow-up post-biopsy (mo, mean, SD)	42.9±51.3
Graft loss (%)	34.2

AR: acute rejection. Scr: serum creatinine

3.2. Histopathological Analysis

Only the first post-transplant renal biopsy performed due to acute functional impairment were included in the study. Twenty-one biopsies were obtained during the first week, 22 during the first month, 13 between the first and third month and 20 after 3 months post-transplantation.

Histopathological evaluation was done on Duboscq-Brazil-fixed paraffin embedded 3 µm tissue sections stained with hematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff, methenamine-silver and Masson trichrome. Frozen kidney tissue was analyzed for immunofluorescence technique using mono-specific mouse antisera against human IgG, IgM, IgA, C1q, C3 and fibrinogen (Dako, Ca/USA).

Allograft biopsies were classified according to Banff 97 classification criteria. Scoring of interstitial inflammation (i), tubulitis (t), arteritis (v) were graded; vascular thrombosis, areas of hemorrhage and necrosis were also noted (Racusen *et al.*, 1999).

A peritubular capillaritis score (ptc) were assessed by two methods: 1. Scores of ptc from Banff Classification (Solez *et al.*, 2007). 2. Counting of inflammatory cells within peritubular capillaries in 10 consecutive high power fields (400x), in the Masson trichrome stain. The mean values were used as result. Areas of uncertain localization of cells were excluded. The counting was performed on a Olympus Microscope model BX50 F4.

The biopsies also were classified according the presence or absence of glomerulitis, in this study, it was considered presence of glomerulitis according Banff 97 quantitative criteria glomerulitis score (g2 and g3).

Presence of polymorphonuclear cells (PMN) and focal or diffuse distribution also were observed and described.

3.3. Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was done in 69 biopsies for anti-human IgG C4d rabbit polyclonal antibody (BI-RC4d-Biomedica, Vienna/Austria) and in 47 biopsies for anti-human CD68 KP1 mouse monoclonal (Dako Inc., Ca/USA).

For immunohistochemical studies, 3µm tissue sections were mounted on silanized slides, dried for 15 hours at 58°C and deparaffinized with xylene for three times, 5-min each, hydrated in absolute alcohol and washed in distilled water. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide. Antigen retrieval was done by pressure-cooking for 3 minutes in citrate-buffer, 10mM, pH 6.0 for C4d and with EDTA, pH 8.1 for CD68. After washing in distilled water and phosphate-buffered saline (PBS), sections were incubated with primary antibody: anti-human C4d was diluted at 1:50, for 30-min, at room temperature and anti-CD68 was diluted at 1:800. After the final washings in PBS, the slides were incubated with the polymer reagent (EnVision-Dako, Inc. Ca/USA) for 30-min at room temperature and washed in PBS. The reaction was visualized with diaminobenzidine (DAB) (Dako, Inc. Ca/USA). The counterstaining was performed with 50% Harris hematoxylin and after washing in water, sections were mounted with entellan (Merck).

Thirty (30) renal allograft biopsies taken at the time of transplantation (zero-time baseline biopsies of the studied patients) were used as controls.

The intensity of C4d peritubular capillaries (PTC) staining was evaluated as percentage of capillaries stained in 10 high power field (objective 400X), with at least 20 capillaries counted. Areas of necrosis and fibrosis were excluded.

C4d staining was considered negative with 0%, indeterminate with 1 to 10% and focal positive with 10 to 50 or diffuse positive, when 50% or more of ptc were stained.

3.4. Quantitative Analysis of Macrophage

The infiltrate of cortical macrophage (Mo) was determined by counting the number of cells (staining for CD68) in the interstitium and in the lumen of peritubular capillaries, in 10 high power fields (hpf). The total number of cortical cells was divided by 10 hpf and expressed as a mean of cells in each biopsy.

3.5. Statistical Analysis

Descriptive statistics were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) and median with ranges.

The association of categorical variables (sex, donor, delayed graft function, follow up, glomerulitis, inflammatory infiltrate, tubulites, vasculites, Banff peritubular capillaritis, type of rejection and C4d scores) were analyzed by chi-square test (X^2) and Fisher's exact test, when necessary. For

associations between continuous and categorical variables, logistic regression was applied. Pearson correlation coefficient was used among continuous variables. Poisson and Gamma tests were used to normal distribution variables.

GenMod procedure was used to compare groups with continuous variables and proportion difference test to categorical variables.

All statistical calculations were performed with assistance to program SAS for Windows, 9.2 version (SAS Inc., Cary, NC/USA).

Graft survival was calculated by the Kaplan-Meier method and the log-rank test, 5.02 version (GraphPad Prism Software, In., San Diego, CA/USA).

P values <0.05 were considered significant.

4. Results

4.1. Morphological and clinical characteristics and AR type

Seventy-six AR biopsies were diagnosed using Banff 97 histological criteria for AR (Racusen *et al.*, 1999). AR was classified as type I in 46 cases (60.5%). Thirty cases presented arteritis associated with tubulointerstitial inflammation; 18 (23.7%) were type IIA, 3 (3.9%) IIB and 9 (11.8%) type III.

Glomerular thrombosis, interstitial hemorrhage and infarction were detected in 7.9%, 5.3% and 7.9%, respectively. Most of the cases with infarction (n=6) showed vascular lesion in the biopsy (intimal arteritis n=1 and transmural necrosis n=4).

In the AR, 36 biopsies (47,4%) showed only mononuclear cells, and 40 cases had also polymorphonuclear cells; of these, focal distribution in 67,5% and diffuse in 32,5%. Neutrophils and macrophages were more frequent in the rejection group with vascular component ($P= 0.001$, $P=0.03$, respectively) (Table 2). Glomerulitis was observed in 31 cases of AR (44.9%); there was significant difference between glomerulitis and types of rejection ($P=0.001$). Negative glomerulitis was observed more frequently in the cases with type I rejection (73.9%) (Table 2).

Peritubular capillaritis by Banff scores (ptc Banff) demonstrated: ptc0 in 4 (5,2%), ptc1 in 19 (25%), ptc2 in 36 (47,4%) and ptc3 in 17 (22,4%). There was statistically significant difference between ptc Banff and the type of rejection ($P=0.04$) (Table 2).

The inflammatory cells counted into peritubular capillaries (ptc mean) was not statistically significant to the types of rejection.

There was no statistically significant differences for interstitial inflammation (i), tubulitis (t), arteritis (v), vascular thrombosis, areas of hemorrhage or necrosis and types of AR.

Clinical characteristics as initial serum creatinine (SCr at the time of biopsy) and final serum creatinine (SCr at last visit) were statistically significant to types of rejection. (Table 3).

Table2. Morphological associations in types of AR

	Type I	Type II+III	P value
Morphological characteristics	(n=46)	(n=30)	
Glomerulitis n (%)	12(26.1)	19(63.4)	*0.001
Interstitial inflammation n(%)			0.07
i1	4(8.7)	0(0)	
i2	26(56.5)	13(43.3)	
i3	16(34.8)	17(56.7)	
Tubulitis n(%)			0.19
t1	3(6.5)	1(3.3)	
t2	22(47.8)	9(30)	
t3	21(45.7)	20(66.7)	
ptc banff n(%)			*0.04
ptc 1+2	18(39.1)	5(16.7)	
ptc 3+4	28(60.9)	25(83.3)	
Ptc mean: (median -max-min)	3.2(6.7-1.5)	3.6(6.8-2.0)	0.16
Neutrophils n(%)	18(39.1)	23(76.7)	*0.001
Macrophages (median-max-min)	37.1(172.8-3.3)	65.6(120.2-14.4)	*0.03

AR: acute rejection. *P < 0.05 is considered statistically significant

Table 3. Clinical associations in types of AR

Clinical characteristics	Type I (n=46)	Type II+III (n=30)	P value
Recipient female sex (%)	37	56.7	0.09
Recipient age (yr mean, SD)	37.7±15.7	37.7±14.6	0.99
Living donor (%)	58.7	46.7	0.3
HLA mismatch (mean, SD)	2.41±1.39	2.21±1.21	
Delayed graft function (%)	30.4	40	0.33
Initial Scr (mg/dl mean,SD)	3.98±3.57	5.34±3.19	*0.04
Final Scr (mg/dl mean, SD)	2.47±1.82	3.56±2.97	*0.02
Follow-up (days mean, SD)	1574.20±1682.51	1217.20±1292.16	0.36

AR: acute rejection. Initial Scr: serum creatinine at the time of biopsy. Final Scr: serum creatinine at last visit.

* $P < 0.05$ is considered statistically significant

4.2. Morphological and clinical characteristics and C4d immunoexpression

In 69 biopsies, the distribution of C4d staining along PTC in AR was diffuse positive (C4d3) in 6 cases (8.7%), focal positive (C4d2) in 14 (20.3%), indeterminate (C4d1) in 21 (30.4%) and negative (C4d0) in 28 cases (40.6%).

From 6 biopsies with C4d3, 4 (66.7%), were observed during the first week, and 2 (33.3%), on the first month. In the cases C4d2, 7 biopsies (50%), were on the first week post-transplantation.

There was significant difference between C4d and types of rejection ($P=0.02$), with negative C4d deposition more frequent in type I rejection (75%) (Figure 1). The analysis of the negative, indeterminate and positive C4d groups was not statistically significant for interstitial inflammation (i), tubulitis (t), arteritis (v), vascular trombosis, areas of hemorrhage or necrosis.

Association analysis between glomerulitis and C4d demonstrated statistically significant difference ($P<0.05$) with absence of glomerulitis more frequent in the negative C4d group (75%). For capillaritis (ptc mean), there was significant difference between the groups C4d0 and C4d1 ($P=0.01$) and C4d0 and C4d2+3 ($P=0.02$). The increased value ptc mean were observed in the positive C4d group (Table 4 and Figure 2).

There were no significant differences among ptc Banff's score and groups C4d0, C4d1 and C4d2+3.

There was significant difference between number of macrophages (Mo) to C4d0 and C4d1 groups ($P= 0.02$) and C4d0 and C4d2+3 ($P= 0.004$). (Table 4 and Figure 2).

The absence of PMN was observed more frequently in negative C4d group than in indeterminate (64.3% vs. 28.6%, $P=0.005$) and positive C4d groups (64.3% vs. 40%, $P=0.02$). The difference was not significant for presence of PMN or focal and difuse PMN distribution.

There was no statistical difference between indeterminate and positive C4d groups to morphological or clinical criteria.

For clinical characteristics, positive C4d was more frequent in the female sex (95%, $P= 0.0001$) and in increased level of serum creatinine at the time of biopsy ($5.8\pm3.1\text{mg/dl}$, $P<0.05$).

There were no other association between C4d and clinical characteristics.

Table4. Associations between C4d scores and morphological criteria

Morphological criteria	C4d		
	C40 (n)	C4d1(n)	C4d2+3 (n)
	28	21	20
Glomerulitis (n)			
Yes	7 ^a	7 ^a	14 ^a
No	21 ^b	14	6 ^b
ptc mean (median: max-min)	3.0(5.6-1.5) ^{cd}	3.7(6.7-1.7) ^c	3.9(6.8-1.7) ^d
Macrophages (median)	37.1 ^{ef}	41 ^e	70 ^f
(max-min)	(84.2-3.3)	(172.8-14.7)	(120.2-25)

a NS; b C4d 0 vs C4d 2+3 $P< 0,05$

c C4d 0 vs C4d 1 $P 0,01$; d C4d 0 vs C4d 2+3 $P 0,02$

e C4d 0 vs C4d 1 $P 0,02$; f C4d 0 vs C4d 2+3 $P 0,004$

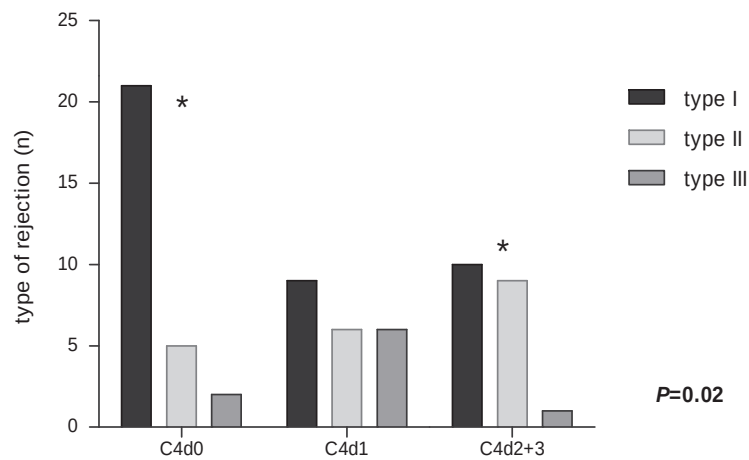


Figure 1: Association between score C4d and type of rejection. Type of rejection is expressed as n (number of cases). *Significant difference C4d0 vs C4d2+3 group. P considered significantly different < 0.05 .

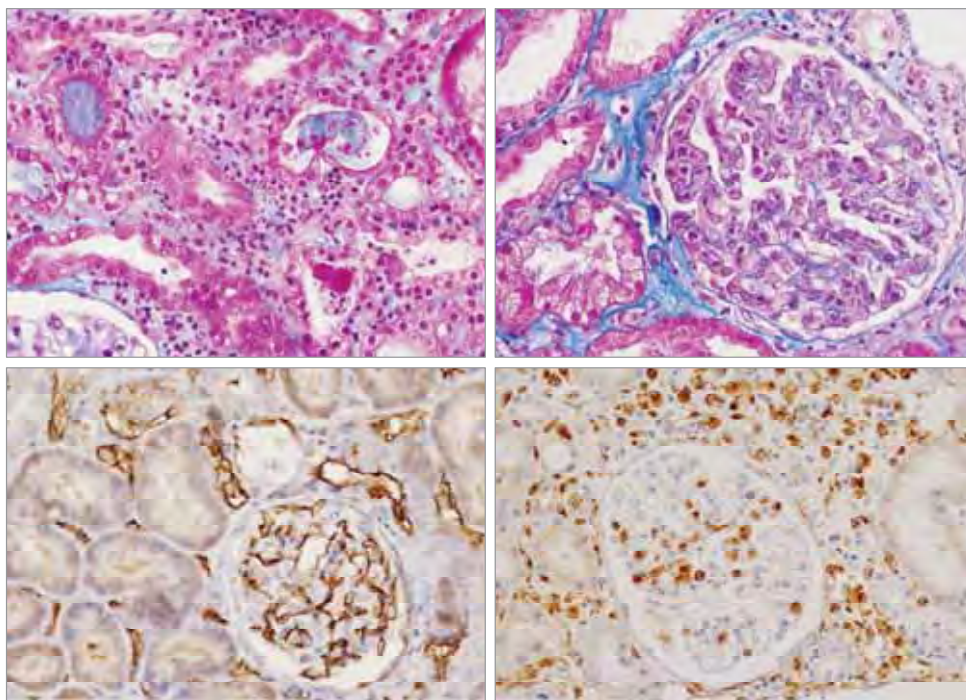


Figure 2: **a:**Intense peritubular capillaritis and interstitial edema. Masson trichrome (400X); **b:** Glomerulitis with endocapillary inflammatory cells and endothelial edema. Masson trichrome (400X); **c:** Immunohistochemical C4d staining, diffuse standard, in peritubular and glomerular capillaries (400X); **d:** Immunohistochemical CD68 monoclonal staining for macrophages (400X).

4.3. Peritubular capillaritis and quantitative analysis macrophages: additional associations and correlations

Macrophages infiltrate was significantly increased in arteritis (v) ($P= 0.04$), but there was no statistically significant differences for interstitial inflammation (i), tubulitis (t), vascular trombosis, areas of hemorrhage or necrosis.

There was significant correlation between macrophage infiltrate and ptc mean ($P= 0.01$) and serum creatinine at the time of biopsy ($P= 0.004$). There was also correlation between ptc mean and initial serum creatinine ($P<0.05$) (Figure 3).

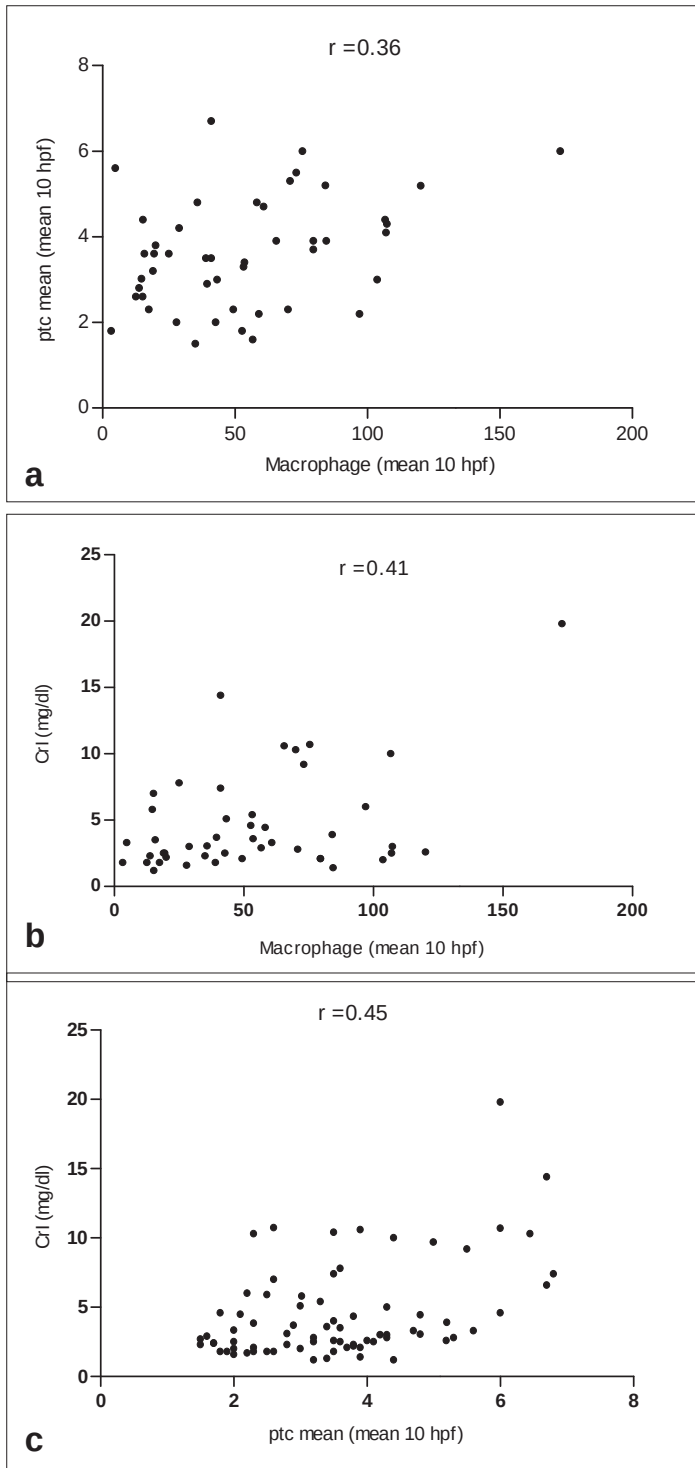


Figure 3: Pearson correlation.**a**-correlation between ptc (mean cells/10hpf) and macrophages; **b**-initial serum creatinine (mg/dl) and macrophages; **c**-initial serum creatinine and ptc (mean cells/10hpf).

4.4. Graft survival

During a follow-up period established in this study (47.8 ± 51.4 months), 26 patients lost their allograft (34.2%).

The group of biopsies with positive expression of C4d (C4d2 and C4d3- median survival 47.2 months) demonstrated significant reduction graft survival compared to the biopsies negative C4d (median survival 123.9 months) ($P=0.02$) (Figure 3-a). At first year of follow-up, there was graft survival of about 88% to negative C4d compared to about 65% to positive cases.

The analysis of graft survival for type of AR demonstrated graft loss about 23.9% for type I ($n=46$), 33.4%, for type II ($n=21$) and 88.9%, for rejection type III ($n=9$). The median survival for type III group (2 months) was also significantly worse than type I and II groups ($P<0.0001$) (Figure 3-b).

For morphological characteristics, glomerulitis interfered in graft survival. There was graft loss in 51.6% of the cases with glomerulitis ($n=31$) and in 22.3% of the cases without glomerulitis ($n=45$). The median survival for the cases without glomerulitis was significantly better than the cases with glomerulitis ($P=0.02$) (Figure 3-c).

There were no other morphological or clinical characteristics that related significantly to graft survival.

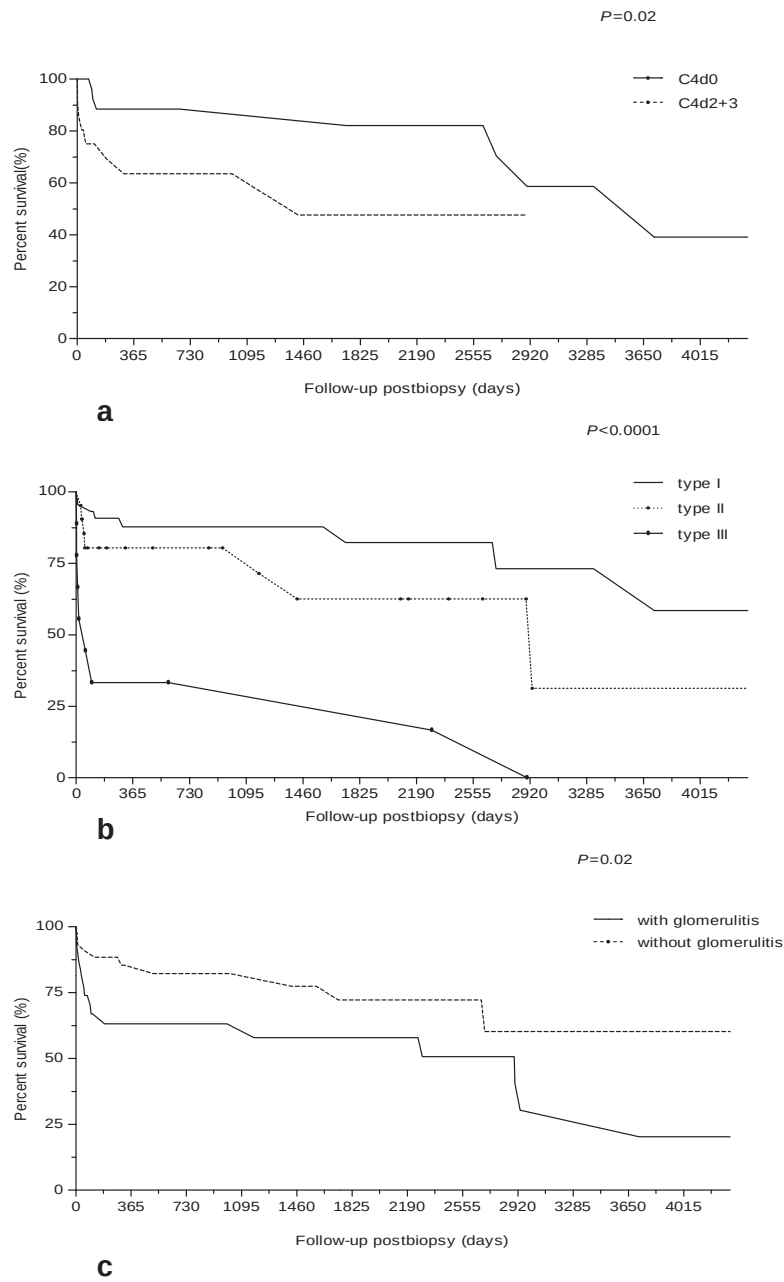


Figure 4: Graft survival : a- Related to C4d0 and C4d2+3; b-Types I, II and III rejection; c-Presence or absence of glomerulitis.Kaplan-Meier method; log-rank test.

5. Discussion

We studied the deposition of C4d in peritubular capillaries and associations with morphological and clinical characteristics in the AR cases and we had the proposal to investigate possible humoral mechanism in these cases. The incidence of positive C4d cases was about 29%, result similar to some reports in the literature (Mauiyyedi et al, 2002; Magil et al, 2003; Yuen et al, 2008).

There is a positive association between C4d peritubular capillaries staining and circulating anti-donor antibodies to the diagnosis of acute ABMR (Collins et al, 1999; Crespo et al, 2001; Mauiyyedi et al, 2002).

However, Nicleleit et al (2002), found, in a retrospective study, C4d positive cases without histological diagnosis of rejection, with similar survival to negative C4d control group. Regele et al (2001) showed results suggesting high specificity but low sensitivity for C4d in biopsies using paraffin sections and immunoperoxidase technique. These results argue against the C4d staining alone as a definitive marker of humoral rejection.

Along C4d staining, was established as important criteria for a conclusive diagnosis of ABMR including morphological features (Racusen et al, 2003).

The main target of antibodies are endothelial cells. The anti-donor antibodies mediate injury fixing complement with lysis and activation of endothelial cells with recruitment of inflammatory cells, such as polymorphonuclear cells and macrophages (Colvin RB, Smith RN, 2005). There is a linkage between circulating anti-donor antibodies, complement activation and vascular injury (Collins et al, 1999; Herzenberg et al, 2002).

Glomerulitis, glomerular and vascular fibrinoid necrosis, presence of neutrophils in peritubular capillaries, thrombosis and infarction were considered histological features related to antibody-mediated lesions (Trpkov et al, 1996; Mauiyyedi et al, 2002; Collins et al, 1999).

In our study, 30 cases had tubulointerstitial inflammatory infiltrate associated to vasculitis, nine with transmural fibrinoid necrosis. We did not find positive associations between C4d staining and vascular fibrinoid necrosis.

Although, some studies related antibody injury to fibrinoid necrosis (Mauiyyedi et al, 2002; Racusen et al, 1999; Trpkov et al, 1996), a significant number of cases are negative C4d (Nickeleit et al, 2002).

Glomerulitis was significantly associated with C4d scores ($P<0.05$); and negative glomerulitis cases were more frequent in type I rejection and in negative C4d cases.

From all morphological features, glomerulitis and margination of neutrophils in peritubular capillaries were considered more specific for antibody-mediated rejection (Trpkov et al, 1996; Collins et al, 1999; Halloran et al, 1990 and 1992; Mauiyyedi et al, 2002). Halloran et al (1990, 1992) were the first to report the importance of anti-HLA antibodies in the renal allograft rejection highlighting the presence of neutrophilic capillaritis in the biopsies.

There are a few studies using peritubular capillaritis scoring system for allograft biopsies (Cosio et al, 2010; Aita K et al, 2005; Lerut et al, 2007). According to Banff's proposal the ptc scores should be analysed in areas with more severe inflammatory infiltrate. These areas showed frequently tubules and vessels totally destroyed and interstitial capillary identification even with special stain is very difficult. The dilated capillaries with

inflammatory cells inside are easily seen in more preserved areas. Cosio et al (2010) adopted to study the capillaries in areas without interstitial infiltrate. In our study, the Banff'ptc scores were used in addition to a quantitative analysis of all cells within cortical peritubular capillaries. The proposal of a quantitative analysis was to investigate and better understanding the role of capillaritis in AR.

Most of our cases were ptc 2 (47.4%) according to literature, but, we did not find significant association between Banff's ptc score and C4d.

However, we had interesting associations for the method of counting intraluminal cell (ptc mean). Higher values of this counting are closely related to C4d expression and macrophage infiltration.

Macrophage infiltrate had a significant association with cases type II and III rejection, vascular score (v) and positive C4d cases.

Results from ptc scores analysis have shown that positive C4d cases are related to the presence of peritubular capillaritis, mainly ptc2, suggesting a relationship with humoral immunity (Solez et al, 2008; Lerut et al, 2007). Aita et al (2005) found higher ptc scores in a group with humoral rejection, but their criteria of antibody-mediated rejection was based only on histological features. In this study, the serum anti-donor antibodies was not determined. Studying anti-HLA antibodies and C4d staining, Cosio et al (2010) agree that capillaritis is a sensitive marker to ABMR and is associated to reduced graft survival.

Some evidences in the literature have demonstrated that macrophage infiltrate in glomeruli and peritubular capillaries is related to ABMR (Magil AB and Tinckam K, 2003; Fahim et al., 2007). However, the association between

humoral rejection and capillaritis should be interpreted with caution; there are few studies on this subject, mainly that assess anti-donor antibodies (Cosio et al.,2010).

In conclusion, many studies have investigated methods to analyze peritubular capillaritis, to understand its relationship with a humoral mechanism and role in the allograft prognosis. The significance of capillaritis as a criteria for the diagnosis of rejection was not established yet.

Recently, we had a interesting C4d positive case that only demonstrated a severe glomerulitis. In this case, recurrent or *De Novo* glomerulonephritis were excluded by clinical history, immunofluorescence and electron microscopy (Accepted to publication).

In this way, we agree that AR have many morphological patterns and that capillaritis could be a presentation form. Its evaluation in the routine biopsies is difficult and more studies are necessary to better understanding what its significance in the management of allografts.

6. Acknowledgments

The authors thank M.D. Daísa Silva Ribeiro David for teaching assistance.

7. References

1. Aita K, Yamaguchi Y, Horita S, Ohno M, Tanabe K, uchinoue S, Teraoka S, Toma H. peritubular capillaritis in early renal allograft is associated with the development of chronic rejection and chronic allograft nephropathy. Clin. Transplant 19 (Suppl 14): 20-26, 2005.
2. Böhmig GA, Exner M, Habicht A, Schillinger M, Lan U, Kletzmayer J, Säemann MD, Hörl WH, Watschinger B, Regele H. Capillary C4d deposition in kidney allografts: specific marker of alloantibody-dependent graft injury. J Am Soc Nephrol. 2002; 13: 1091-99.
3. Böhmig GA, Regele H, Exner M, Derhartunian V, Kletzmayer J, Säemann MD, Hörl WH, Druml W, Watschinger B. C4d-positive acute humoral renal allograft rejection: effective treatment by immunoabsorption. J Am Soc Nephrol. 2001 Nov; 12 (11): 2482-89.
4. Collins AB, Shneberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Williams WW, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB, Colvin RB. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. Am Soc Nephrol. 1999; 10: 2208-14.
5. Colvin RB, Nickleleit V. Renal Transplant Pathology. In: Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG, editors. Heptinstall's Pathology of the kidney. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p.1347-1490.
6. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. Nat Rev Immunol. 2005; 5(10):807-17.

7. Cosio FG, Lager DJ, Lorenz EC, Amer H, Gloor JM, Stegall MD. Significance and implications of capillaritis during acute rejection of kidney allografts. *Transplantation*. 2010 Jul; 12(7):1022-24.
8. Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Mauiyyedi S, Collins AB, Fitzpatrick D, Farrell M, Williams WW, Delmonico FL, Cosimi AB, Colvin RB, Saidman SL. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation*. 2001; 71: 652-58.
9. Fahim T, Böhmig GA, Exner M, Huttary N, Kerschner H, Kandutsch S, Kerjaschki D, Bramböck A, Nagy-Bojarszky K, Regele H. The cellular lesion of humoral rejection: predominant recruitment of monocytes to peritubular and glomerular capillaries. *Am J Transplant*. 2007 Feb; 7(2): 385-93.
10. Feucht HE. Complement C4d in graft capillaries- the missing link in the recognition of humoral alloreactivity. *Am J Transplant*. 2003; 3:646-52.
11. Feucht HE, Felber E, Gokel HJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, Held E, Riethmuller G, Land W, Albert E. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell mediated rejection. *Clin Exp Immunol*. 1991; 86: 464-70.
12. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmuller G, Land W, Albert E. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int*. 1993; 43: 1333-38.
13. Halloran PF, Wadgymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of anti-class I antibody response. *Clinical and*

pathologic features of anti-class I mediated rejection. Transplantation. 1990; 49: 85-91.

14. Halloran PF, Achlout J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class antibody response: II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. Transplantation. 1992; 53:550.

15. Herzenberg AM, Gill JS, Djurdjev O, Magil AB. C4d deposition in acute rejection: an independent long term prognostic factor. J Am Soc Nephrol. 2002 Jan; 13(1): 234-41.

16. Lederer SR, Kluth-Pepper B, Schneeberger H, Albert E, Land W, Feucht HE. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long term survival of renal allografts. Kidney Int. 2001 Jan; 59(1): 334-41.

17. Lerut E, Naesens M, Kuypers DR, Vanrenterghem Y, Van Damme B. Subclinical peritubular capillaritis at 3 months is associated with chronic rejection at 1 year. Transplantation. 2007 Jun 15; 83(11): 1416-22.

18. Lobo PI, Spencer CE, Stevenson WC, Pruett TL. Evidence demonstrating poor kidney graft survival when acute rejections are associated with IgG donor-specific lymphocytotoxin. Transplantation. 1995 Feb 15; 59(3): 357-60.

19. Magil AB. Infiltrating cell types in transplant glomerulitis: relationship to peritubular capillary C4d deposition. Am J Kidney Dis. 2005 Jun; 45(6):1084-9.

20. Magil AB, Tinckam KJ. Monocytes and peritubular capillary C4d deposition in acute renal allograft rejection. Kidney Int. 2003 May; 63(5): 1888-93.

21. Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Tolkoff-Rubin NE, Williams WW, Delmonico FL, Cosimi AB, Colvin RB. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 779-87.
22. Mengel M, Gwinner W, Schwarz A, Bajeski R, Franz I, Brocker V, Becker T, Neipp M, Klempnauer J, Haller H, Kreipe H. Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts. *Am J Transplant*. 2007; 7: 356-65.
23. Nickleit V, Andreoni K. The classification and treatment of antibody-mediated renal allograft injury: Where do we stand? *Kidney International*. 2007. 71(1):7-11.
24. Nickleit V, Zeiler M, Gudat F, Thiel G, Mihatsch MJ. Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts : diagnostic and therapeutic implications. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 242-51.
25. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, Cecka MJ, Cosyns J, Demetris AJ, Fishbein MC, Fogo A, Furness P, Gibson IW, Glotz D, Hayry P, Hunsickern L, Kashgarian M, Kerman R, Magil AJ, Montgomery R, Morozumi K, Nicklei V, Parmjeet R, Regele H, Seron D, Seshan S, Sund S, Trpkov K: Antibody-mediated rejection criteria- an addition to the Banff '97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant*. 2003; 3: 708-14.
26. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Caballo T, Crocker BP, Demetris AJ., Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldeberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman, EO, Hunsicker LG,

Lindblad AS, Marcussen N, Mihastch MJ, Nadasdy T, Nickerson P, Olsen TS, Papadimitriou JC, Randhawa PS, Rayner DC, Roberts I, Rose S, Rush D, Salinas-Madriga L, Salomon DR, Sund S, Taskinen E, Trpkov K, Yamaguchi Y: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999; 55: 713-23.

27. Regele H, Exner M, Watschinger B, Wenter C, Wahrmann M, Österreicher C, Saemann MD., Mersich N, Horl WH, Zlabinger GJ, Böhmig GA: Endothelial C4d deposition is associated with inferior kidney allograft outcome independently of cellular rejection. *Nephrol Dial Transplant.* 2001; 16: 2058-66.

28. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DSR, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihastch M, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M: Banff '07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* 2008; 8: 753-60.

29. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF., Birk PE, Campbell PM, Cascalho M, Collins AB, Demetris AJ, Drachenberg CB., Gibson IW, Grimm PC, Haas M, Lerut E, Liapis H, Mannon RB, Marcus PB, Mengel M, Mihastch MJ, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Platt JL, Randhawa P, Roberts I, Salinas-Madriga L, Salomon DR, Seron D, Sheaff M, Weening JJ,: Banff '05 meeting report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of Chronic Allograft Nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant.* 2007; 7: 518-26.

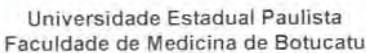
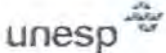
30. Sund S, Reisaeter AV, Scott H, Mollnes TE, Hovig T. Glomerular monocyte/macrophage influx correlates strongly with complement activation in 1-week protocol kidney allograft biopsies. Clin Nephrol. 2004 Aug; 62(2):121-30.
31. Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody. Analysis using the Banff grading schema. Transplantation. 1996 Jun 15; 61 (11):1586-92.
32. Watschinger B, Pascual M. Capillary C4d deposition as a marker of humoral immunity in renal allograft rejection. J Am Soc Nephrol. 2002 Sep; 13(9):2420-3.

Conclusão final

Conclusão final

O estudo concluiu que o marcador C4d está associado à glomerulite, à capilarite (ptc média) e a infiltração de macrófagos. A pesquisa negativa para C4d favorece ausência de glomerulite, rejeição aguda de padrão túbulo-intersticial (rejeição aguda tipo I) e maior sobrevida do enxerto. As piores sobrevidas do enxerto foram observadas nos casos com C4d positivo, com glomerulite e nas rejeição com componente vascular (tipo II e III). Observamos também a importância da análise da capilarite em futuros estudos para melhor estabelecimento de critérios na análise de biópsias de aloenxertos renais.

Anexos



Distrito Rubião Junior, s/nº—Botucatu—S.P.
CEP 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail: secretaria_capellup@fmb.unesp.br
e-mail: coordenação_tsardeni@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de dezembro de 2008

Of. 511/08-CEP

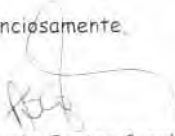
Ilustríssima Senhora
Prof.^a Dr.^a Rosa Marlene Viero
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Prof.^a Rosa Marlene,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Pesquisa da fração do sistema complemento C4d em biópsias de transplante renal: Importância no diagnóstico da Região Aguda Humoral e correlação com a sobrevida do enxerto", a ser conduzido pela Dr.^a Daniela Cristina dos Santos, orientada por Vossa Senhoria, Co-orientada pela Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda Cordeiro de Carvalho, recebeu do relator parecer favorável (cópia em anexo), aprovado em reunião de 01/12/2008.

Situação do Projeto: APROVADO. Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto.

Atenciosamente,



Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Botucatu	
JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA		
Declaramos que o Projeto de Pesquisa: <i>"Pesquisa da fração do sistema complemento C4d em biópsias de transplante renal: importância no diagnóstico da Rejeição Aguda Humoral e correlação com a sobrevida do enxerto"</i>		
<i>aprovado pelo CEP em 01/12/2008, teve seu título alterado para: "Pesquisa da fração do sistema complemento C4d, capilarite e infiltração por macrófagos em biópsias de transplante renal: papel na rejeição aguda mediada por anticorpos e na sobrevida do enxerto",</i>		
<i>sem nenhuma alteração na seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP</i>		
<i>A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Dissertação de Mestrado.</i>		
Botucatu, 15/07/2011		
Nome/Assinatura do(a) aluno(a) 		
Nome/Assinatura do(a) orientador (a) 		
Programa de Pós Graduação em Patologia		
Assinatura do Coordenador em FMB (a ser preenchido pelo orientador)		

11441-15/07/2011 11:02:00
FMB - Botucatu