DANIELA CRISTINA DOS SANTOS

*Estudo das células Natural Killer (NK) em biópsias de
transplante renal com diagnóstico de rejeição aguda C4d
positiva ou negativa.*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Dra. Denise Maria Avancini Costa Malheiros
Co-orientador: Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

São Paulo
2016

DANIELA CRISTINA DOS SANTOS

Estudo das células *Natural Killer* (NK) em biópsias de transplante renal com diagnóstico de rejeição aguda C4d positiva ou negativa.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Dra. Denise Maria Avancini Costa Malheiros

Co-orientador: Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Daniela Cristina dos

Estudo das células Natural Killer (NK) em biópsias de transplante renal com diagnóstico de rejeição aguda C4d positiva ou negativa / Daniela Cristina dos Santos. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Denise Maria Avancini Costa Malheiros.
Coorientador: Niels Olsen Saraiva Câmara

Descritores: 1.Células matadoras naturais 2.Rejeição de enxerto 3.Aloenxertos
4.C4d 5.Transplante renal 6.Citotoxicidade celular anticorpo-dependente 7.CD56

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese a minha filha Estela por ser o anjo da minha vida e a minha maior motivação;

A minha mãe e ao meu irmão Arnaldo pelo amor e força nas dificuldades;

Ao meu ex-marido Daniel pela parceria durante os anos que se foram e pela amizade no presente;

Ao meu pai por ter me ajudado a me tornar uma pessoa melhor;

Aos meus avós Plínio (in memoriam) e Maria (in memoriam) pelo exemplo de humildade e caridade.

Ao meu cachorrinho Toicinho e à minha cachorrinha Pantera (in memoriam) pelos momentos de felicidade.

A todos os familiares e amigos que estão ou que passaram pela minha vida.

A minha irmã Renata (in memoriam) pelo exemplo de alegria e de simplicidade; saudades...

AGRADECIMENTOS

A Deus meu maior agradecimento

À professora e orientadora Dra. Denise Maria Avancini Costa Malheiros pela atenção e incentivo na realização deste trabalho.

Ao professor e co-orientador Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara e à pesquisadora Dra. Erika Fernandes Campos pelo acolhimento aos nossos pedidos de ajuda.

Aos médicos e funcionários da divisão de Anatomia Patológica e Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas pela contribuição na elaboração deste trabalho.

Ao coordenador do programa de pós-graduação em patologia, Dr. Raymundo Soares de Azevedo Neto pela oportunidade de aprendizado.

À Dra. Rosa Marlene Viero - do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP- por sempre me ajudar nos momentos de dúvidas e por ter me fornecido as bases iniciais da patologia renal e patologia do transplante renal.

AGRADECIMENTO À INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL
PELO APOIO FINANCEIRO

*Esse trabalho recebeu recursos financeiros provenientes da
Fundação de Amparo À Pesquisa Do Estado de São Paulo
(FAPESP). Auxílio Pesquisa nº2012/21604-9*

EPÍGRAFE

Penso noventa e nove vezes e nada descubro; deixo de pensar, mergulho em profundo silêncio - e eis que a verdade se me revela.

Albert Einstein

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento de sua publicação.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro de cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Cestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ªEd. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in *Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Células Natural Killer (NK).....	17
1.2 Receptores Fc: Receptor de anticorpos (CD16) nas células NK.....	22
1.3 Papel das células NK em transplante de órgãos sólidos	25
1.4 Células NK e transplante renal.....	26
1.5 Transplante Renal: o papel da biópsia renal	30
1.6 A patogênese da rejeição.....	32
1.7 Rejeição Aguda mediada por células T.....	35
1.8 Rejeição Aguda mediada por anticorpos.....	38
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	45
3. OBJETIVOS	47
4. MÉTODOS	49
4.1. Casuística	49
4.2. Desenho do Estudo.....	50
4.3. Análise Histológica	54
4.4 Imunofluorescência: Pesquisa de C4d em biópsias a fresco congeladas	54
4.5 Estudo imuno-histoquímico	55
4.6 Análise Histomorfométrica	57
4.7. Análise Estatística	60
5. RESULTADOS	61
6. DISCUSSÃO.....	81
7. CONCLUSÕES	89

8. ANEXOS	91
9. DESFECHOS.....	93
10. REFERÊNCIAS	95

LISTA DE ABREVIATURAS

- aABMR: *Acute Antibody-Mediated Rejection*
- aTCMR: *Acute T-Cell Mediated Rejection*
- ABMR: *Antibody-Mediated Rejection*
- ADCC: *Antibody Dependent Cell-Cytotoxicity*
- APC: *Antigen Presenting Cell*
- ATN: *Acute Tubular Necrosis*
- CCR5: *C-C chemokine receptor type 5*
- CD: *Cluster of Differentiation*
- CTL: *Cytotoxic T Lymphocyte*
- DSA: *Donor Specific anti-HLA Antibody*
- g: *Glomerulitis score*
- G-CSF: *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*
- GM-CSF: *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*
- HLA: *Human Leukocyte Antigen*
- i: *Interstitial inflammation score*
- ICAM-1: *Intercellular Adhesion Molecule 1*
- IFN: *Interferon*
- Ig: *Immunoglobulin*
- IL: *Interleukin*
- ITAM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*
- ITIM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*
- KIR: *Killer Ig-like Receptor*
- MHC: *Major Histocompatibility Complex*

- MICA: *Major histocompatibility complex class I chain-related molecule A*
- NCAM: *Neural Cell Adhesion Molecule*
- NCR: *Natural Cytotoxicity Receptors*
- NK: *Natural Killer*
- RNA: *Ribonucleic acid*
- PAS: *Periodic Acid-Schiff stain*
- PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*
- PCAM: *Platelet endothelial Cell Adhesion Molecule*
- ptc: *Peritubular capillaritis score*
- PTC: *Peritubular Cappillary(ies)*
- t: *Tubulitis score*
- TCMR: *T-Cell Mediated Rejection*
- TCR: *T-Cell Receptor of antigen-specific*
- Th: *T-helper*
- TNF: *Tumor Necrosis Factor*
- v: *Vasculitis score*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Ilustração sobre os receptores de superfície das células <i>Natural Killer</i> e seus respectivos ligantes.....	18
Figura 2-	Ilustração sobre o reconhecimento de células-alvo pelas células NK.....	20
Figura 3-	Ilustração sobre o reconhecimento de moléculas MHC pelas células NK...	20
Figura 4-	Ilustração sobre a análise por citometria de fluxo das células NK CD56 ^{bright} e CD56 ^{dim}	24
Figura 5-	Expressão da fração do sistema complemento-C4d- nos capilares peritubulares	58
Figura 6-	Expressão das células por estudo imuno-histoquímico para os marcadores CD3, CD8, CD4, CD68, CD16, CD57 e CD56	59
Figura 7-	Representação gráfica da tabela 3: Box Plot dos valores da contagem média de células positivas CD56, CD57, CD16, CD68, CD3, CD8 e CD4 nos compartimentos intersticial (i) e glomerular (g)	68
Figura 8-	Expressão das células CD56+ e CD57+, no compartimento intersticial, em rejeições agudas mediadas por células T (aTCMR) e das células CD16+ e CD68+, no compartimento glomerular, em rejeições agudas mediadas por anticorpos (aABMR)	69
Figura 9-	Curvas ROC das variáveis células CD56+ intersticiais, CD56+ glomerulares, células CD16+ intersticiais e CD16+ glomerulares	77
Figura 10-	Curvas de Sobrevida do Enxerto: Curva de sobrevida do enxerto analisada em 59 biópsias.....	78
Figura 11-	Sobrevida do Enxerto agrupando casos quanto à média de células CD56 positivas e quanto ao tipo de rejeição.....	79
Figura 12-	Associações entre células CD56+ no compartimento intersticial e escores de lesão endotelial (ptc: capilarite peritubular, g: glomerulite)	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Características clínicas dos pacientes diagnosticados com rejeição aguda por biópsia de rim transplantado.....	62
Tabela 2-	Comparação dos valores da análise histomorfométrica para os marcadores imuno-histoquímicos (IHQ) CD56, CD57, CD16, CD68, CD3, CD8 e CD4 entre os grupos de rejeição aguda mediada por células T (aTCMR) e mediada por anticorpos (aABMR) com (C4d+) e sem (C4d-) evidência de deposição de C4d, em diferentes compartimentos das biópsias de rim transplantado	64
Tabela 3-	Comparação dos valores da análise histomorfométrica para os marcadores imuno-histoquímicos (IHQ) CD56, CD57, CD16, CD68, CD3, CD8 e CD4 entre os grupos de rejeição aguda mediada por células T (aTCMR) e mediada por anticorpos (aABMR) em diferentes compartimentos das biópsias de rim transplantado	67
Tabela 4-	Poder estimado do teste estatístico para os marcadores CD56, CD57, CD16, CD68, CD3, CD8 e CD4 entre os grupos de rejeição aguda mediada por anticorpos com e sem evidências de C4d (aABMR C4d+ / -) e rejeição aguda mediada por células T (aTCMR)	70
Tabela 5-	Correlações entre os marcadores de células NK (células CD56+, CD57+ e CD16+) e de monócitos/macrófagos (CD68+) em biópsias de rim transplantados, por localização das células (compartimento no parênquima renal) e por tipo de rejeição aguda	72
Tabela 6-	Associação entre os valores da análise IHQ dos marcadores (CD56, CD16, CD3, CD8, CD4 e CD68) e os escores de rejeição aguda (glomerulite-g e capilarite peritubular-ptc) nos compartimentos intersticial e glomerular	74
Tabela 7-	Estimativa da área sob a curva obtida via curva ROC dos marcadores	76

RESUMO

Santos DC. *Estudo das células Natural Killer (NK) em biópsias de transplante renal com diagnóstico de rejeição aguda C4d positiva ou negativa* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: O objetivo do estudo foi avaliar o perfil de marcadores imuno-histoquímicos relacionados às células NK em biópsias de aloenxertos renais com diagnóstico anatomopatológico de rejeição aguda (mediadas por células T ou anticorpos) e estabelecer relações desses marcadores com parâmetros morfológicos de lesão à microcirculação e sobrevida do enxerto. **MÉTODOS:** Estudo retrospectivo histórico que revisou 74 biópsias realizadas entre janeiro de 2009 e dezembro de 2012, de pacientes com rejeição aguda mediada por células T (n=36), rejeição aguda mediada por anticorpos com expressão positiva (n=19) ou negativa (n=19) para o marcador C4d, juntamente com levantamento de dados clínicos e laboratoriais pertinentes ao estudo. Foram realizadas reações imuno-histoquímicas, para os marcadores CD56, CD57, CD16, CD68, CD3, CD8 e CD4 com ênfase para os marcadores CD56 e CD16. Foi feita análise das células positivas em toda a cortical da biópsia nos compartimento intersticial, glomerular e vascular. Testes estatísticos foram aplicados conforme os pressupostos definidos no objetivo da pesquisa. **RESULTADOS:** No compartimento intersticial, células CD56+ ($P = 0,004$) e CD57+ ($P < 0,001$) foram expressas em maior quantidade em biópsias negativas para dosagem sérica de anticorpos específicos anti-doador (DSA) com diagnóstico de rejeição aguda mediada por células T. CD56 intersticial foi associado estatisticamente com presença de glomerulite ($g \geq 1$) ($P = 0,02$) e ausência / leve capilarite peritubular ($ptc \leq 1$) ($P = 0,003$). Células intersticiais positivas para o marcador CD56 com média superior a $0,56 \text{ céls/mm}^2$ tiveram uma pior sobrevida do enxerto renal ($P = 0,028$). Biópsias com contagem inferior ou igual a $0,56 \text{ cél/mm}^2$ tiveram associação estatisticamente significativa para ausência ou leve capilarite peritubular ($P = 0,012$) e com contagem superior a $0,56 \text{ céls/mm}^2$, foram associadas à presença de glomerulite ($P = 0,002$). Foi observado maior número de células positivas para o marcador CD16 no compartimento glomerular em biópsias positivas para dosagem sérica de DSA com diagnóstico de rejeição aguda mediada por anticorpos ($P = 0,03$) e em biópsias com presença de glomerulite ($P = 0,009$). Presença de maior número de células CD16+ no compartimento intersticial associou-se com capilarite peritubular ($P = 0,0001$). **CONCLUSÕES:** Maior expressão de células CD56 positivas no compartimento intersticial das biópsias foi significativamente associada com escores relacionados à lesão na microcirculação, especialmente glomerulite, com rejeição aguda mediada por células T e pior sobrevida do enxerto renal. Células CD16 positivas, no compartimento glomerular foram associadas com rejeição aguda mediada por anticorpos e glomerulite. As variações na expressão dos marcadores de células NK nos diferentes compartimentos da biópsia renal podem sugerir presença de envolvimento das células NK em diferentes vias do sistema imune nas rejeições agudas de aloenxertos renais.

Descritores: células matadoras naturais; rejeição de enxerto; aloenxertos; C4d; transplante renal; citotoxicidade celular anticorpo-dependente; CD56.

ABSTRACT

Santos DC. *Study of Natural Killer cells (NK) in renal transplant biopsies with positive or negative C4d acute rejection*. [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

INTRODUCTION: The aim of this study was to investigate the immunohistochemical profile of markers related to NK cells from renal allograft biopsies with morphological diagnosis of acute rejection (T-cells or antibodies mediated rejection) and to study associations of those markers with types of rejection, microcirculation injury morphological parameters and graft survival.

METHODOLOGY: Historical retrospective study that reviewed 74 biopsies performed between January 2009 and December 2012 in patients with acute T-cell-mediated rejection (n=36) and acute antibody-mediated rejection with (n=19) or without evident C4d deposition (n=19). The study was performed with relevant clinical and laboratory data. Immunohistochemical reactions were performed for CD56, CD57, CD16, CD68, CD3, CD8 and CD4 markers with highlights for CD56 and CD16. Counting of positive cells throughout cortical biopsy was performed in glomerular, interstitial and vascular compartments. Statistical tests were applied according to assumptions set out the goal of the study.**RESULTS:** DSA-negative biopsies-from patients with acute T-cell mediated rejection (aTCMR) had an increased expression of CD56+ and CD57+ cells ($P = 0.004$ and $P < 0.001$) in the interstitial compartment in comparison with donor-specific antibodies (DSA)-positive biopsies from patients acute antibody-mediated rejection with and without C4d deposition. Interstitial CD56+ cells had an increased expression for presence of glomerulitis ($g \geq 1$) ($P = 0.02$) and peritubular capillaritis ($ptc \geq 2$) ($P = 0.003$). Interstitial CD56+ cells with mean superior to 0.56cells/mm^2 had worse allograft survival ($P = 0.028$). CD56+ cells in the interstitial compartment with mean inferior or equal to 0.56cells/mm^2 associated with absence or mild peritubular capillaritis ($P = 0.012$) and mean superior to 0.56cells/mm^2 was associated with presence of glomerulitis ($P = 0.002$). CD16+ cells was increased in the glomerular compartment in DSA-positive biopsies ($P = 0.03$) and in the presence of glomerulitis ($P = 0.009$). Interstitial CD16+ cells associated with peritubular capillaritis ($P = 0.0001$).**CONCLUSION:** CD56+ cell infiltrates in the interstitial compartment were significantly associated with microcirculation injury scores, especially glomerulitis, acute T-cell mediated rejection and clinical outcomes. CD16+ cell infiltrates in glomerular compartment was associated with acute antibody-mediated rejection and glomerulitis. Our findings showed variations in expression of NK cells markers in renal biopsy different compartments which might suggest the involvement of NK cells in different immune system pathways in acute renal allograft rejection.

Descriptors: killer cells, natural; graft rejection; allografts; C4d; kidney transplantation; antibody-dependent cell cytotoxicity; CD56.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células *Natural Killer* (NK)

As células NK fazem parte de uma subfamília de linfócitos e compõem 5 a 20% das células mononucleares do sangue periférico em seres humanos. Esse tipo de linfócito apresenta como particularidade, a participação na resposta imune inata. Esse papel é notoriamente descrito na proteção contra agentes virais e neoplasias, promovendo a morte de células infectadas por vírus e células tumorais sem a necessidade de um processo de reconhecimento específico via apresentação antigênica prévia (Eidenschenk et al., 2006, Lanier et al., 2008).

Morfologia, expressão de marcadores e mesma origem de célula progenitora linfoide e medular óssea são os atributos que são utilizados para classificar as células NK como um tipo específico de linfócito. Elas são classificadas como componentes do sistema imune inato porque nestas não são detectados receptores de superfície celular antígeno-específicos.

O sistema imune inato se refere a um conjunto de células, moléculas solúveis, barreiras físicas e químicas que exercem rapidamente sua função de defesa através de um limitado número de receptores germinativos, diferente do que acontece na resposta imune adaptativa que apresenta amplo repertório de receptores antigênicos somáticos (Herberman et al., 1975).

Diferente do que ocorre nos linfócitos T e B, as células NK não demandam de rearranjos nos genes somáticos para produzir receptores altamente específicos que reconheçam as células alvo, a exemplo do TCR (do inglês T-cell receptor) (Sun JC & Lanier LL, 2011).

As células NK possuem uma série de receptores transmembrana (**Figura 1**) caracterizados como receptores de ativação responsáveis pelo reconhecimento de ligantes que induzem estresse e, receptores de inibição, que evitam a possibilidade das células NK atacarem células normais (Lanier LL, 2008).

FONTE- adaptado: Br J Haematol. 2011 Oct ; 155(1): 14-29.

Figura 1-Ilustração sobre os receptores de superfície das células *Natural Killer* e seus respectivos ligantes. Esta classificação é baseada em suas atividades primárias (receptores de ativação, inibição e co-receptores de ativação).

O reconhecimento de células-alvo pelas células NK envolve duas estratégias distintas, uma delas é o *missing-self*. Moléculas MHC de classe I expressas em células normais do hospedeiro não são destruídas pelas células NK devido o envio de sinais inibitórios. Contudo na ausência de ao menos um único alelo MHC classe I, esses sinais de inibição não são gerados e isso pode desencadear a destruição celular. A outra estratégia se caracteriza pelo uso de receptores ativadores que são capazes de reconhecer células que estão em dificuldade por meio de proteínas induzidas pelo estresse nas suas

superfícies.

Quando as células NK reconhecem essas proteínas ocorre eliminação da célula-alvo (Tizard IR, 2014, Ljunggren et al., 1990). Três grupos de receptores de células NK são reconhecidos: (1) os receptores KIR ou CD158, que são receptores similares às imunoglobulinas e são encontrados em primatas, (2) receptores de lectinas do tipo C-Ly49 expressos nos roedores e (3) os receptores NKG2D, expressos tanto em roedores como em primatas. Os três grupos contêm receptores de inibição e ativação (Tizard IR, 2014, Biassoni et al., 2001).

Os principais receptores de ativação na espécie humana são NKG2D, 2B4 e o grupo NKp46, NKp30 e NKp44, também reconhecidos como receptores de citotoxicidade natural (NCR) (Moretta et al., 1996). Os receptores inibitórios incluem CD94/NKG2A, heterodímero lecitina-*like*, que reconhece o alelo HLA-E e, receptores KIR que são específicos para alelos HLA A, B ou C (**Figura 2**) (Long E.O, 1999; Moretta et al., 2001).

A atividade da célula NK é regulada por um estrito equilíbrio entre o reconhecimento de sinais de ativação e inibição (Lanier LL, 2005). Uma grande reserva de grânulos citotóxicos citoplasmáticos contendo granzimas e perforinas, assim como RNA mensageiro de IFN- γ , pode ser rapidamente liberada em sinapses com as células alvo, se houver a ativação da célula NK (Bryceson et al., 2006).

Células NK são reconhecidas como uma das principais produtoras de IFN- γ em condições fisiológicas e patológicas. Essa produção possivelmente modula a resposta das células T nos órgãos linfoides periféricos. Essa modulação acontece após a chegada das células NK nesses órgãos secundários. Após essa chegada, acontece uma interação entre células T *naive* e células NK mediadas pelo IFN- γ (**Figura 3**) (Martin-Fontecha et al., 2004).

FONTE- adaptado: Science. 2011 Jan 7; 331(6013): 44–49.

Figura 2- Ilustração sobre o reconhecimento de células-alvo pelas células NK. Sinais de inibição e ativação.

FONTE- adaptado: Transplant International. 2009 Apr 21. 22(9): 859-868.

Figura 3- Ilustração sobre o reconhecimento de moléculas MHC pelas células NK. O não-reconhecimento de moléculas MHC classe I resulta em ativação da célula NK com produção de IFN- γ e um padrão de resposta imune dominante Th1.

Mais recentemente, estudos demonstram que as células NK participam da resposta imune adaptativa junto aos linfócitos B e T via produção de uma grande variedade de citocinas imunorreguladoras. Essa atividade é capaz de promover quimiotaxia de células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, além de auxiliar nas respostas efetoras das células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Sun et al., 2009, Moretta et al., 2005, Robbins et al., 2007). Citocinas como IL-15, IL-12 e IL-18 são exemplos de mediadores inflamatórios necessários para a ativação de células NK e para sua plena atividade dentro da resposta imune (Mortier et al., 2009, Guia et al., 2008, Chaix et al., 2008).

Células NK também secretam e são reguladas por uma série de citocinas pró-inflamatórias e imunossupressoras (Walter et al., 2005). É o que acontece por exemplo, no sistema célula NK-IFN- γ , que se inicia quando macrófagos fagocitam antígenos invasores e produzem TNF- α e IL-12. Sequencialmente essas citocinas são capazes de induzir células NK a produzirem IFN- γ . O próprio IFN- γ , por sua vez, aumenta a atividade das células NK, promovendo rápida diferenciação das células pré-NK, e este eixo desencadeia a ativação de macrófagos, com aumento da produção de TNF- α (Tizard IR, 2014). Recentemente discute-se que as células NK são capazes de manter auto-tolerância dentro da resposta imune e até formar uma espécie de memória imunológica antígeno-específica, o que em alguns pontos caracteriza essas células na fronteira entre a resposta imune inata e a adaptativa (Vivier et al., 2011).

As células NK se caracterizam por expressar CD56. Este é um marcador tradicional de imunofenótipo das células NK dentro do espectro de linfócitos. É uma isoforma de 140 kDa conhecida por ser uma molécula de adesão celular neural (NCAM) encontrada nas células NK e em uma minoria de linfócitos T (Lanier et al., 1989).

Outra molécula expressa pelas células NK é o CD57. A expressão de CD57 está

relacionada à maturidade celular para os grupos NK e T CD8⁺ (Chattopadhyay et al., 2009). Segundo Lopez-Vergès et al (2010), as células NK-CD57⁺ são mais responsivas ao estímulo do CD16 e quando ativadas por este, apresentam maior potência na atividade citolítica.

1.2. Receptores Fc: Receptor da porção Fc de Anticorpos nas Células NK

Os linfócitos apresentam receptores para anticorpos, que são denominados receptores Fc (FcR) porque estes se ligam à porção Fc da molécula do anticorpo. Os FcRs para imunoglobulina G (IgG) são conhecidos como receptores FcγR, devido ao fato de se ligarem a cadeia gama (γ) da IgG. São descritos quatro receptores diferentes em leucócitos de humanos e murinos: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) e FcγRIV (Ellebrechet et al., 2015, Tizard IR, 2014). Esses receptores são glicoproteínas com múltiplas cadeias. Quando uma cadeia se liga ao anticorpo, as outras são responsáveis pela transdução do sinal. O CD16 é molécula de cerca de 50- 65 kDa que apresenta baixa afinidade pela molécula IgG, ligando-se principalmente aos imunocomplexos. A sinalização por meio do CD16 pode dar início à ativação das células NK (Tizard IR. 2014).

O CD16/FcγRIIIA é um receptor celular de superfície que capacita as células NK a detectarem anticorpos e a exercerem a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). CD16 identifica a porção Fc dos anticorpos que opsonizam um antígeno desencadeando uma sinalização intracelular.

Essa sinalização ocorre através da subunidade que contem um receptor imunológico de ativação baseado em radical tirosina (ITAM) para exercer a ADCC (Leibson et al.,

1997).

O controle da ADCC mediada pelo CD16 e regulado pelas ITIMs (ITIM) que são expressas por células apresentadoras de antígenos (APCs) (Clynes et al., 2000).

Ainda através do CD16, as células NK também são capazes de identificar células que não expressam antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) classe I (Lanier et al., 1986). O CD16 é expresso nas células NK, neutrófilos e basófilos, contudo não é expresso nos linfócitos B e em algumas subfamílias de linfócitos T (Lanier et al., 1983) e é classificado na família de receptores KIR (Caligiuri et al., 2008).

Em estudo baseado em análise por microarranjos, a variante CD16a foi identificada em resíduos transcricionais da via relacionada à rejeição mediada por anticorpos (Venner et al., 2015). CD16: CD16a e CD16b; geralmente células NK e monócitos expressam CD16a enquanto a variante CD16b pode ser expressa em neutrófilos, contudo, o CD16b não consegue mediar as mesmas funções do CD16a devido a falta de um domínio ITAM (Lanier et al., 1988).

Há uma classificação das células NK com base na densidade de moléculas CD56 em sua superfície que é analisada através do exame de citometria de fluxo (**Figura 4**). Nesta classificação, as células NK podem ser subdivididas em dois principais grupos que são: CD56^{dim} e CD56^{bright}. O grupo CD56^{dim} expressa a maioria dos receptores de superfície celular, entre eles o CD16. Este grupo celular também possui grânulos intracelulares conhecidos por perforinas e granzimas que são liberados no mecanismo de citotoxicidade. Células CD56^{bright} regulam a resposta imune através de estimulação de citocinas tais como IL-2, IL12 ou IL15 (Neudoerfl et al., 2013). Sugere-se que as células NK não se desenvolvam totalmente na medula óssea. Isso se deve a observação da subfamília CD56

^{bright} que pode ser isolada de tecidos linfoides secundários, tais como linfonodos e tonsilas. Já as células NK $CD56^{dim}$ são encontradas geralmente na medula óssea, sangue e baço (Fehniger et al., 2003).

FONTE-adaptado: Trends in Immunology. Vol 22, Issue 11, 1 November 2011, Pages 633-640.

Figura 4- Ilustração sobre a análise por citometria de fluxo das células NK $CD56^{bright}$ e $CD56^{dim}$.

As células NK $CD56^{bright}$ (demarcação vermelha) representam cerca de 10% de todas as células NK humanas e são $CD16^{-}$ ou $CD16^{dim}$. As células $CD56^{dim}$ (demarcação azul) representam aproximadamente 90% das células NK e apresentam uma alta densidade para expressão do $CD16$ ($CD16^{bright}$). Abreviações: FITC: (do inglês: fluorexcein isothiocyanate), PE (do inglês: phycoerythrin).

Cerca de 90% das células NK periféricas conhecidas como $CD56^{dim} CD16^{+}$ apresentam alta citotoxicidade *in vitro* (Moretta et al., 2001). Mais de 95% das células NK $CD56^{dim}$ são $CD16^{bright}$, ou seja, possuem alta densidade de $CD16$, que é capaz de fazer ligação estável com a porção Fc das imunoglobulinas IgG. (Lanier et al., 1986).

1.3. Papel das Células NK em transplante de órgãos sólidos

Um estudo experimental de transplante hepático em modelos animais (ratos) identificou presença de células NK do receptor infiltrando o aloenxerto hepático nas 25 primeiras horas pós-transplante e notou-se que o nível de IFN- γ produzido nesses aloenxertos nas primeiras 3 horas pós-transplante também era aumentado. Neste estudo, as células NK foram consideradas como a principal fonte de IFN- γ porque na ausência dessas células os níveis desta citocina foram significativamente diminuídos assim como, foi observada uma sobrevida prolongada dos enxertos hepáticos (Obara et al., 2005).

Estudos experimentais com rejeição aguda mediada por anticorpos investigaram o papel das células NK e do sistema complemento em xenoenxertos de modelos com camundongos. Utilizando anticorpos para xenoantígenos, observaram que a IgG1 é uma fraca ativadora de complemento e que possui habilidade de mediar rejeição através do receptor Fc γ RIII da célula NK, ao contrário do observado para IgG3, que induz rejeição por ativação do complemento (Yin et al., 2004).

Um estudo mostrou também que em rejeições agudas mediadas por anticorpos, a depleção de células NK pode prolongar a sobrevida de xenoenxertos cardíacos de ratos, contudo o tratamento realizado no experimento para depleção de células NK também afetou os macrófagos, o que limitou maiores conclusões (Chen et al., 2006).

Outro estudo experimental, com modelos animais (camundongos) em transplante cardíaco, observou que a intensidade da vasculopatia crônica do enxerto foi significativamente menor em animais com depleção de células NK. Em animais com depleção de células NK também foi observada uma redução significativa de vasculopatia crônica do aloenxerto cardíaco mediada por anticorpos séricos anti-doador (DSA)

(Hirohashi et al., 2012).

1.4. Células NK e transplante renal

Lesão renal causada por isquemia seguida por reperfusão ocorre após período de reduzido fluxo sanguíneo no aloenxerto renal e é considerada a principal causa de lesão renal aguda em rins transplantados (De Rosa et al., 2016). Em 2008, um estudo experimental *in vitro* demonstrou que nestas situações de lesão decorrente da isquemia-reperfusão, há correlação entre células NK e células epiteliais tubulares renais. Neste estudo observou-se também um significativo aumento da expressão do receptor NKG2D em células epiteliais tubulares apoptóticas, concluindo-se a partir deste ponto, que células NK poderiam contribuir para apoptose de células tubulares renais nas condições de isquemia-reperfusão (Zhang et al., 2008).

Em 1990, Kirby e colaboradores publicaram um estudo experimental em que anticorpos IgG anti-células renais adicionados a cultura de células renais humanas demonstravam que as células NK poderiam causar citólise através da ADCC. Os resultados do estudo comprovaram que pacientes transplantados renais desenvolviam anticorpos IgG capazes de se ligar às células epiteliais tubulares e que a presença desses anticorpos na superfície das células tubulares permitia que células NK provocassem a citólise das células epiteliais tubulares pelo mecanismo do ADCC. Esta lise celular aconteceu devido as células epiteliais estarem ligadas as imunoglobulinas IgG.

Este estudo foi consistente com outras publicações que demonstraram que não existia lise de células epiteliais renais quando estas estavam em contato com preparações de células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Células NK quiescentes, ou seja, não ativadas pela ligação entre células epiteliais e imunoglobulinas IgG, não provocavam

lise nas células epiteliais (Kirby et al., 1989, Miltenburg et al., 1988). Essas mesmas publicações demonstraram in vitro que a capacidade das células NK de causar lise nas células epiteliais renais necessitava como pré-requisito de um ambiente com uma significativa concentração de IL-2. Recentemente um estudo demonstrou, através de observações experimentais de aloenxertos renais em camundongos CD8^{-/-} CCR5^{-/-}, que as células NK mostram importante participação no processo inflamatório originário da rejeição mediada por anticorpos nas primeiras duas semanas pós-transplante e também na sobrevida do enxerto nos primeiros cem dias. O modelo animal CD8^{-/-} CCR5^{-/-}, deficiente na produção do receptor do tipo 5 de quimiocinas com o domínio CC (CCR5), apresenta picos nos títulos séricos de DSA de novo nos primeiros 15 dias pós transplante, sendo um modelo experimental interessante para observação de rejeições agudas mediadas por anticorpos. O estudo mostrou que houve um pico na produção de RNA mensageiro para perforina, granzima B e IFN- γ no 6º dia pós-transplante neste grupo, ou seja, produção de enzimas citolíticas não dependentes da presença de células T-CD8. Esse mesmo grupo CD8^{-/-} CCR5^{-/-} teve uma expressiva melhora da sobrevida do aloenxerto renal e retardo para episódios de rejeição após terem sido submetidos à depleção das células NK (Kohei et al., 2016). Em 1989, Miltenburg e colaboradores encontraram importante relação entre o mecanismo ADCC e anticorpos anti-célula endotelial (não-HLA) em casos de pacientes transplantados renais. O estudo comentou sobre a relevância desses antígenos endoteliais em transplante renal e da sua relação com a formação de anticorpos anti-célula endotelial e susceptibilidade ao ADCC. Esses anticorpos uma vez produzidos pós-transplante se ligam aos antígenos endoteliais e podem ativar o receptor Fc das células linfomononucleares presentes no enxerto. Antígenos anti-HLA não foram reconhecidos neste estudo. Células NK foram identificadas entre as células mononucleares de sangue periférico que são responsáveis pela lise celular e o estudo

também sugeriu que as imunoglobulinas que reagem contra as células endoteliais no ensaio de ADCC são da subclasse IgG1. Em 2010, Sagoo e colaboradores encontraram uma interessante associação entre número de células NK no sangue periférico de pacientes transplantados renais. Foi observado um aumento no número de células NK séricas em um grupo de pacientes tolerantes ao transplante renal sem o uso temporário de medicamento imunossupressor.

Outro estudo encontrou que a presença de anticorpos anti-doador (DSA) em pacientes transplantados estava associada com reduzido número de células NK CD56dim no sangue periférico. Observou-se também significativa diminuição das células NK CD56dim CD16+ em pacientes transplantados comparados a um grupo de doadores saudáveis. Encontrou-se mais especificamente que a presença de anticorpos anti-HLA classe I e/ou classe II no soro de pacientes transplantados renais associou-se com a diminuição no número absoluto de células NK periféricas CD56dim e CD56bright. Essa mesma associação não foi encontrada para anticorpos não-HLA (anticorpos específicos MICA). No estudo essa observação foi interpretada como compatível com a elevação do DSA recrutando células NK CD16+ periféricas para dentro do enxerto e assim promovendo a ativação do mecanismo ADCC (Neudoerfl et al., 2013, Farkash et al., 2012).

Em 2010, Hidalgo e colaboradores identificaram, com base em fragmentos transcricionais de células NK e pesquisa imuno-histoquímica de células NK em biópsias, significativa expressão de resíduos transcricionais de DSA (que foram aumentados significativamente em rejeições mediadas por anticorpos, neste mesmo estudo) nas células NK e endotélio e aumento de imunoexpressão de CD56 (células NK) e CD68 (macrófagos) em capilares peritubulares. Nesta última observação, o número médio de células CD56 e CD68 imunopositivas foi significativamente maior em casos de rejeição

mediada por anticorpos (ABMR, do inglês *Antibody-Mediated Rejection*) com ou sem imunoeexpressão de C4d comparado ao grupo com casos de rejeição mediada por células T (TCMR, do inglês *T-Cell-Mediated Rejection*). Esse resultado também levantou a discussão sobre o papel que as células NK exerceriam na lesão da microcirculação, já que o aumento identificado foi em capilares peritubulares (PTC, do inglês *peritubular capillary*) (Hidalgo et al., 2010).

Esse estudo reforçou a ideia de que a associação entre resíduos transcricionais de células NK e biópsias DSA positivas implicaria em novas discussões sobre o modelo proposto de que as células NK se ligam aos DSA presentes na microcirculação através do receptor CD16 levando à ADCC. O que também acontece com macrófagos e células da série granulocítica que interagem com endotélio opsonizado por anticorpos.

Em 2012, foi novamente publicado um estudo por Hidalgo e colaboradores que se baseou em análise por micro arranjos de fragmentos transcricionais de células NK e T de 403 biópsias de rim transplantado. Nestas análises, os autores encontraram uma alta expressão de transcritos relacionados às células NK associada à rejeição mediada por anticorpos, com correlação significativa para inflamação microvascular (*ptc-peritubular capillaritis* e *g-glomerulitis*) e DSA . Esse achado, entretanto, foi encontrado apenas para biópsias pós-transplante tardias. Para biópsias pós-transplante recentes, foi encontrada associação entre transcritos relacionados às células NK e rejeição mediada por células T e *borderlines*. Desta forma, houve correlação significativa para elementos como inflamação intersticial (i) e tubulite (t). Outro ponto interessante é que houve alta frequência de transcritos relacionados às células NK em biópsias tardias com diagnóstico de rejeição mista (mediada por anticorpos e por células T). Ainda observou-se nas biópsias tardias, que os escores de transcritos relacionados às células NK correlacionaram-se principalmente com lesões relacionadas à microcirculação como g,

cg e ptc, com correlação moderada para atrofia e fibrose, mais comuns em biópsias tardias. Em biópsias recentes, houve forte correlação entre esses transcritos de células NK nas biópsias para os escores i e t. Neste cenário também houve fraca correlação para ptc e nenhuma para g. O mesmo mecanismo de ligação da célula NK ao DSA (através do CD16) aderido ao endotélio é proposto, contudo, o fator tempo promoveria um reconhecimento mais eficiente entre a célula NK e este anticorpo (Hidalgo et al., 2012).

1.5. Transplante Renal: o papel da biópsia renal

Transplante renal é tratamento para pacientes com doença renal crônica terminal decorrente de uma grande variedade de causas base. (Scheuher C, 2016, Hariharan et al., 2000). A disfunção do enxerto renal transplantado pode ser diagnosticada por uma importante ferramenta que é a biópsia renal. Além do diagnóstico ela consegue fornecer importantes informações sobre a causa dessa disfunção (Colvin et al., 1996).

A biópsia precisa ter quantidade e qualidade suficientes de material para uma correta avaliação e interpretação (Séron et al., 2008). É recomendada pela classificação de Banff, reunião bienal de consenso entre diversos especialistas em Patologia dos Aloenxertos Renais, cortes seriados de biópsia de rim transplantado, com secções de espessura em torno de 3-4µm, colorações para hematoxilina e eosina (H&E), reagente periódico ácido-Schiff (PAS) e tricrômico de Masson. A coloração histoquímica de PAS é interessante para determinar o limite da membrana basal tubular e definir a presença de tubulite, caracterizar uma hialinose arteriolar e atrofia tubular; também apresenta utilidade na identificação de glomerulite. O Tricrômico de Masson auxilia na identificação de fibrose intersticial e subintimal (Racusen et al., 1999). Diante de uma disfunção do enxerto observada clinicamente, alguns fatores podem indicar a realização de uma biópsia de rim

transplantado, entre estes estão: retardo na função do enxerto, diminuição na função do enxerto abaixo do esperado para a situação particular do paciente, aumento abrupto da creatinina sérica, aumento progressivo dos níveis de creatinina, proteinúria >1,0g, alterações no sedimento urinário sem causa urológica justificada e até mesmo, mudanças no esquema imunossupressor (Mubarak et al., 2012).

Em centros de referência em transplante renal, biópsias denominadas como biópsias protocolares são realizadas em períodos pré-determinados em enxertos funcionalmente normais com o objetivo de se identificar processos subclínicos que podem determinar implicações na sobrevida do enxerto em longo prazo (Souza et al., 2013, Choi et al., 2005).

As causas de disfunção do enxerto dependem do tempo pós-transplante, tipo de doador (vivo ou falecido), tipo de imunossupressão e doença de base (Kazi et al., 2012). Cerca de 30 a 50% das disfunções ocorrem no período pós-transplante recente (John et al., 2010). A classificação das causas de disfunção do aloenxerto renal inclui duas grandes categorias: disfunções recentes ou tardias. Entre as causas de disfunção recente (0 a 6 meses pós-transplante) estão: Rejeição Aguda Celular, Rejeição Aguda Humoral, Toxicidade Aguda por Inibidores de Calcineurina, Pielonefrite Aguda, Necrose Tubular Aguda e Microangiopatia Trombótica (John et al., 2010).

Já as causas de disfunção tardia do enxerto (> de 6 meses pós-transplante) incluem: Rejeição Crônica Celular, Rejeição Crônica Humoral, Toxicidade Crônica por Inibidores de Calcineurina, Pielonefrite Crônica, Nefrosclerose Hipertensiva, Nefropatia do Poliomavírus, Glomerulopatias/Glomerulonefrites Recorrentes e De novo, Fibrose Intersticial e Atrofia Tubular (John et al., 2010).

Quanto aos requisitos para a análise da biópsia de enxerto renal, alguns pontos

devem ser destacados: o tempo pós-transplante é de fundamental importância, visto que ele é utilizado para uma correta interpretação de qual tipo de disfunção está ocorrendo no enxerto renal. Fragmentos de parênquima cortical e medular devem ser sempre representados para uma adequada análise morfológica e o material deve ser também suficientemente amostrado para estudo de imunofluorescência e ou microscopia eletrônica, quando indicados (Javed et al., 2012).

1.6. A patogênese da rejeição

Rejeição é um mecanismo imunopatológico contra o enxerto que envolve a resposta imune inata e adaptativa. Os alvos principais dessa resposta são os antígenos MHC que são conhecidos também como HLA. O sistema HLA é caracterizado por glicoproteínas polimórficas e se localiza, na espécie humana, no braço curto do cromossomo 6. Os genes HLA são responsáveis pela codificação de duas classes estruturalmente distintas de antígenos de superfície celular: classe I e classe II. Os antígenos classe I são formados por uma cadeia polimórfica de 44 Kd ligada a uma molécula de microglobulina, situam-se nos loci A, B ou C e são expressos na superfície de todas as células nucleadas e também das plaquetas. Os antígenos de classe II são constituídos por uma cadeia α de 34 Kd e uma cadeia β de 29 Kd e são encontrados nos loci DP, DQ ou DR; se expressam nos macrófagos/monócitos, células dendríticas, linfócitos B e endotélio (Suthantiran et al., 1994).

Linfócito T citotóxico antígeno-específico é o principal tipo celular participante dos mecanismos de rejeição ao aloenxerto. Os linfócitos T CD8⁺ são ativados pelo reconhecimento dos antígenos HLA classe I. Esses antígenos são responsáveis pela maturação dessas células citolíticas. As células CD8⁺ do receptor tem seu primeiro

contato com as APCs do doador que estão presentes no enxerto, este momento é denominado via de alorreconhecimento direto (Arakelov et al., 2000). Além desta via, onde as APCs são as principais indutoras dos linfócitos T citotóxicos, existe outra teoria baseada em um mecanismo de apresentação direta do antígeno através de células endoteliais vasculares ativadas. Foi proposto que esta via poderia sozinha induzir as células TCD8+ a um fenótipo efetor para causar uma rejeição aguda (Kreisel et al., 2002).

Em estudos experimentais, observa-se que após a ativação das células CD8+, ocorre a expansão clonal das células alorreativas e em aproximadamente 1 a 3 dias após a ativação da célula T precursora, a formação de grânulos citotóxicos contendo perforinas e granzimas pode ser detectada. A interação entre o receptor TCR da célula T citotóxica CD8+ no complexo MHC I presente na célula alvo, promove a fusão dos grânulos citotóxicos na membrana da célula T e a consequente liberação destes como em uma sinapse imunológica. O final deste processo desencadeia a apoptose da célula alvo (Russel et al., 2002).

Na via de alorreconhecimento indireto, os aloantígenos do doador são processados e apresentados na forma de peptídeos pela APC do receptor ao linfócito T do mesmo (Benichou et al., 1999). Nesta via, geralmente, os antígenos são apresentados junto à molécula HLA classe II. Os antígenos HLA classe II ativam os linfócitos T auxiliares CD4+ que são responsáveis pela produção de diferentes perfis de citocinas (Rocha et al., 2003), entre estes, discutiremos brevemente sobre os perfis Th1 e Th2.

As células T helper 1 (Th1) CD4+ antígeno específicas após se se ligarem aos aloantígenos, sintetizam e liberam citocinas pró-inflamatórias como interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interferon (IFN) α , β , γ , fator de necrose tumoral- β (TNF- β). Essas citocinas ativam monócitos/macrófagos e células NK e estas células, por sua vez, infiltram o enxerto no processo de rejeição. Essa reação de hipersensibilidade tardia

amplifica a produção de citocinas e quimiocinas com ação quimiotática e influência na permeabilidade e integridade endotelial, o que promove liberação de enzimas proteolíticas, óxido nítrico e outros fatores solúveis responsáveis pela progressão da rejeição (Sirak et al., 1997).

Os linfócitos TCD4+ perfil Th2 produzem interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13) e participam da produção de anticorpos (Karczewski et al., 2009).

A interação dos anticorpos com o aloantígeno pode ativar uma resposta inflamatória que recruta o sistema complemento ou ativar células como os macrófagos ou células NK para desencadear a ADCC (Ponticelli C, 2012).

Células NK ou macrófagos ligam-se a porção Fc da molécula de anticorpo, promovendo a lise por apoptose da célula alvo (Mosmann et al., 1989). A ligação entre receptores Fc na célula NK desencadeia uma citotoxicidade mediada por liberação de grânulos citoplasmáticos de perforina e granzima. Nos macrófagos esta mesma ligação promove a liberação de óxido nítrico, TNF- α e espécies reativas de oxigênio (Rocha et al., 2003).

A participação das células NK não é baseada em resposta antígeno específica, mas está associada à presença de seus receptores de ativação e inibição (descritos anteriormente) (George et al., 1997). Quando moléculas MHC classe I próprias do indivíduo (do inglês, *self*) se ligam aos receptores de inibição, este sinal evita a ativação de células NK, contudo a ausência deste MHC-*self*, devido fenótipo alogênico presente no enxerto, pode resultar na atividade citolítica da célula NK que também é mediada por grânulos citotóxicos, similar ao mecanismo relacionado com células T CD8+ citotóxicas (Cucchiari et al., 2016, Shresta et al., 1995).

A interação de todos esses elementos do sistema imune no aloenxerto podem comprometer os compartimentos glomerular, tubular, intersticial e vascular, através de citotoxicidade celular, reação de hipersensibilidade tardia ou mediada por anticorpos. Assim, a classificação do tipo de rejeição é baseada no tempo estimado de surgimento e no mecanismo imunopatológico predominantemente envolvido (Colvin et al., 2005).

1.7. Rejeição Aguda Mediada por células T

A rejeição aguda mediada por células T (aTCMR do inglês, acute T-cell mediated rejection), também denominada como Rejeição Celular, é principalmente caracterizada pela infiltração de células linfomononucleares (TCD8+ e TCD4+) nos compartimentos túbulo-intersticial, glomerular e arterial do enxerto (Colvin et al., 2007).

O sistema complemento e seus fatores reguladores também parecem estar envolvidos no desencadeamento e evolução da aTCMR. Um recente estudo experimental com ratos e painel imuno-histoquímico com biópsias renais humanas mostrou que a deficiência de fatores reguladores do sistema complemento pode estar associada ao progresso da aTCMR (Yamanaka et al., 2016).

De acordo com a classificação de Banff, gradua-se esse infiltrado intersticial como escore i, sendo que i1 representa infiltrado inflamatório em até 25% do parênquima cortical renal, i2 de 26 a 50% do córtex e i3, infiltrado acima de 50% da cortical representada na biópsia renal (Racusen et al., 2003). A base fisiopatológica da aTCMR é descrita com base na apresentação e interação entre APCs e linfócitos T. APCs, especialmente células dendríticas, são fundamentais neste processo de rejeição. Após o transplante e o alorreconhecimento direto entre APC e célula T, as células T liberam quimiocinas que estimulam as APCs a migrarem para órgãos linfoides e para o baço para,

finalmente, povoarem o enxerto. A interação entre célula T e APC, também denominada de coestimulação, envolve a presença de moléculas específicas presentes na superfície da célula T e das APCs, tais como os conjugados CD28/CTLA4 e CD80/86, CD40 e CD154, e CD27 e CD70.

A deficiência daquelas moléculas pode apresentar um efeito direto na atividade da rejeição aguda e consequentemente, na sobrevida do enxerto.

A coestimulação é necessária para a ativação da célula T atuando através de citotoxicidade direta nas células tubulares e endoteliais ou produzindo e liberando citocinas que terão efeito sobre outras células. Essas citocinas podem agir diretamente nas células do parênquima ou indiretamente através dos efeitos que causam no endotélio e no suprimento vascular (Dooms et al., 2006, Cornell et al., 2008).

A tubulite, uma lesão dependente da célula T, é um importante critério histopatológico desse tipo de rejeição aguda. Essa lesão é responsável, clinicamente pela rápida elevação dos níveis de creatinina sérica no paciente transplantado renal (Jabs et al., 2003). A infiltração tubular se caracteriza pela presença de células inflamatórias atravessando a membrana basal tubular e se depositando entre esta e a célula tubular. A tubulite escore t1 compreende um máximo de 4 células por secção transversal, t2, de 5 a 10 células por secção transversal e t3 mais de 10 células por secção transversal ou áreas de intensa ruptura da membrana basal tubular associada a intenso processo inflamatório (Racusen et al., 2003).

Endarterite afeta pequenas e grandes artérias e é graduada de acordo com o nível de obstrução da luz do vaso decorrente de processo inflamatório. Os glomérulos também podem apresentar lesões que variam desde leve infiltrado linfomononuclear até acometimento severo. Células endoteliais passam por efeito de apoptose na rejeição

causada por efeito de perforinas e expressam receptores de quimiocinas que são os mesmos correspondentes à fase de alorreconhecimento. Essas quimiocinas também participam da regulação das moléculas de adesão (ICAM-1, PCAM) no endotélio que recrutam a resposta inflamatória e a intensificam (Zhang et al., 2003).

Abaixo transcrevemos a recente classificação de Rejeição Aguda mediada por células T segundo critérios atuais da conferência de Banff (Sis et al., 2010): Grau/tipo IA: casos com infiltrado intersticial e tubulite (infiltrado intersticial em mais de 25% do parênquima renal-i2 ou i3 e tubulite moderada-t2); IB: casos com infiltrado intersticial e tubulite (infiltrado intersticial em mais de 25% do parênquima renal-i2 ou i3 e tubulite severa-t3); IIA: casos com leve a moderada arterite intimal (v1), independente do estado do infiltrado intersticial ou da presença de tubulite; IIB: casos com severa arterite intimal (v2), acometendo mais de 25% do lúmen vascular, independente do estado do infiltrado intersticial ou da presença de tubulite; III: casos com arterite transmural e/ou necrose fibrinoide na camada média (v3), independente do estado do infiltrado intersticial ou da presença de tubulite.

Quando os achados histológicos não alcançam os critérios plenos de rejeição aguda mediada por células, geralmente pode ser um caso de suspeita de rejeição ou de alterações limítrofes para rejeição (do inglês, *Borderline Changes*). Nesta classificação encontramos infiltrado intersticial em menos de 25% do parênquima com qualquer foco de tubulite (t1, t2 ou t3) ou infiltrado intersticial em mais de 25% do parênquima (i2 ou i3) com foco discreto de tubulite (t1) (Solez et al., 2008). Um recente estudo avaliou essa categoria como um espectro mais leve da Rejeição Celular Aguda, demonstrando inclusive uma diferença estatisticamente significativa entre a sobrevida de um grupo de pacientes com alterações limítrofes na biópsia comparada a do grupo controle, que não apresentava rejeição (Wu et al., 2014).

1.8. Rejeição Aguda mediada por anticorpos

A rejeição mediada por anticorpos também denominada rejeição humoral, ocorre pela presença de aloanticorpos específicos anti-doador IgG pré-formados (pré-sensibilização) ou por anticorpos formados no pós-transplante denominados como “*De novo*” (Bohmig et al., 2002).

A presença de anticorpos pré-formados anti-HLA IgG previamente estavam associados a rejeição hiperaguda. Com a introdução da prova-cruzada por citotoxicidade dependente do complemento, a incidência deste tipo de rejeição praticamente desapareceu (Patel et al., 1969).

Atualmente o exame de prova cruzada é realizado por citometria de fluxo e a identificação de anticorpos anti-HLA é feita por ensaios de fase sólida que são muito mais sensíveis e específicos para detectar anti-HLA classe I e II. A maior sensibilidade dos testes permitiu a detecção de níveis mais baixos de aloanticorpos e consequentemente contribuiu para um maior interesse nas rejeições mediadas por anticorpos (Sumitran-Karuppan et al., 1996).

A rejeição mediada por anticorpos foi identificada por testes de reações cruzadas pós-transplante e foi associada, através de diversos estudos a diferentes componentes histopatológicos (Feucht et al., 1996, Halloran et al., 1990). Hoje é aceita como uma distinta entidade clínico-patológica em transplante.

Os pacientes com rejeição aguda mediada por anticorpos (aABMR do inglês, acute Antibody-Mediated Rejection), podem apresentar uma rápida elevação da creatinina, que pode ocorrer dias, semanas ou até mesmo anos após o transplante renal. Essa alteração da função renal não é um fator capaz de fazer distinção com o diagnóstico de aTCMR, e

por isso a biópsia renal é indispensável (Cornell et al., 2008).

A morfologia é caracterizada pela presença de acúmulos de células inflamatórias (principalmente neutrófilos e monócitos/macrófagos) nos lúmens dos capilares glomerulares e dos peritubulares, respectivamente glomerulite e pericapilarite. Geralmente esses capilares estão dilatados e podemos encontrar também endoteliose. Tubulite e endarterite mínimos também podem ser encontrados e perfis mais acentuados são vistos quanto há associação com rejeição celular aguda. Em casos severos, são observados microtrombos, áreas de hemorragia e infarto no parênquima, assim como necrose fibrinoide na parede das artérias (Fahim et al., 2007, Tinckam et al., 2005). Em muitos casos o único achado morfológico encontrado é uma necrose tubular aguda, critério denominado na classificação de Banff como ATN-like (ou seja, semelhante à Necrose Tubular Aguda) (Sis et al., 2010, Mengel et al., 2012).

A imunofluorescência usual dificilmente consegue detectar deposição de anticorpos nos vasos. Isso se deve a rápida lise de depósitos de imunoglobulinas e de complemento nos possíveis locais de depósito (Trpkov et al., 1996, Collins et al., 1999).

O diagnóstico da rejeição mediada por anticorpos se tornou mais fácil com a identificação da fração do sistema complemento C4d em biópsias. Em 1989, a reação de imunoperoxidase indireta com anticorpos monoclonais dos componentes do sistema complemento detectou a presença de C4d nos glomérulos (Zwirner et al., 1989). Após essa observação, hipóteses foram aventadas sobre a relação do C4d com a ativação da via clássica do complemento. A via clássica do complemento é descrita como a gênese principal do C4d. Quando C1q interage com o complexo antígeno-anticorpo, uma modificação estrutural no complexo C1qrs ocorre e ativa o C1s. O C1s se quebra de forma proteolítica e o C4 se transforma nas frações C4a e C4b. O C4b é clivado nas frações C4c e C4d. Os fatores de clivagem são responsáveis pela conservação do radical reativo do

grupo tioester na fração C4d. A capacidade de se ligar de forma permanente a membrana basal é conferida pela preservação deste radical reativo e isto faz o C4d um marcador indireto da presença de anticorpo no parênquima renal (Feucht et al., 1991, Feucht et al., 1993). A molécula de C4d é um peptídeo inativo com 42Kd que isolada não tem atividade funcional, porém pode ficar aderida a membrana basal dos capilares por vários dias após o desaparecimento das imunoglobulinas e da ativação do sistema complemento (Moll S and Pascual M, 2005). Alguns estudos documentaram a presença de C4d até 18 dias após o início da injúria humoral (Mauiyyedi et al., 2002, Nickelleit et al., 2002).

A expressão do C4d foi pesquisada em biópsias de enxerto renal com a demonstração de depósitos lineares nos capilares peritubulares (PTC-do inglês peritubular capillary). O mesmo grupo constatou que a deposição de C4d em PTCs estava relacionada a uma forma severa de rejeição ligada aos anticorpos séricos alorreativos (Feuchet et al., 1991, Feucht et al., 1993). Na época, uma proposta para os possíveis estágios de desenvolvimento da ABMR foi feita levando-se em consideração a presença de anticorpos anti-doador específicos “de novo”: ligação dos anticorpos aos aloantígenos, ativação do sistema complemento com deposição do C4d nos capilares, desenvolvimento de resposta inflamatória e manifestações clínicas (Takemoto et al., 2004).

Desde a descoberta do marcador C4d e da demonstração de sua associação com rejeição mediada por anticorpos, foi postulado na Conferência de Banff de 2007 (Solez et al., 2008) que para a definitiva conclusão diagnóstica da aABMR, os três critérios eram necessários: 1.alguma evidência histológica de rejeição humoral como inflamação nos capilares peritubulares e/ou glomerulares (ptc/g>0), lesão vascular equivalente ao score v3 ou um quadro de necrose tubular aguda símile com mínima inflamação; 2.evidência sérica da presença de anticorpos circulantes anti-doador; 3.Presença de C4d positivo.

Com o advento de numerosos estudos que buscam estabelecer padrões morfológicos

associados com características moleculares, a conferência de Banff de 2013 discutiu o diagnóstico de Rejeição Mediada por Anticorpos sem evidências de deposição de C4d (Haas et al., 2014).

Essa inclusão teve por base os estudos que mostravam presença de rejeição humoral mesmo quando o C4d era negativo ou duvidoso. Um desses estudos demonstrou que casos de rejeição mediada por anticorpos subclínica (observada em biópsias protocolares) com deposição negativa de C4d, ou seja, casos que tinham evidências sorológicas e histológicas para rejeição mediada por anticorpos, mas que não tinham C4d positivo, mostravam uma sobrevida intermediária a casos que contemplavam todos os critérios da rejeição humoral e casos que não eram humorais (Loupy et al., 2009).

Um estudo elaborado por Sys et al, demonstrou a presença de componentes transcricionais de endotélio em casos que também apresentavam anticorpos específicos anti-doador. Esses casos foram diagnosticados como rejeição mediada por anticorpos partindo-se do princípio que os anticorpos lesam principalmente o endotélio residente da microcirculação do enxerto. A utilização desses componentes transcricionais se mostrou como um método mais sensível que a identificação do C4d nos capilares peritubulares para o diagnóstico de rejeição humoral (Sis B and Halloran PF, 2010).

Outro estudo, do mesmo grupo, demonstrou que mais de 40% dos casos com glomerulopatia do transplante com presença de anticorpos anti-HLA detectados eram C4d negativos (Sis et al., 2007).

Esse último estudo norteou a investigação dos níveis de RNAm de genes envolvidos na ativação e na lesão do endotélio. Biópsias com alta expressão desses componentes transcricionais e presença de anticorpos específicos anti-doador apresentavam coincidentemente alterações morfológicas sugestivas de rejeição mediada por anticorpo:

capilarite, glomerulite, glomerulopatia do transplante, alterações de fibrose e atrofia túbulo-intersticial. Esses mesmos casos foram também os que apresentaram o pior prognóstico (Sis et al., 2009). Em outro estudo realizado com pacientes sensibilizados e cujas biópsias protocolares foram analisadas três meses após o transplante, observou-se que a presença de C4d ou capilarite foi fator de risco para o desenvolvimento de glomerulopatia do transplante, e que a capilarite peritubular teve valor prognóstico mesmo na ausência de positividade para o C4d (Loupy et al., 2011).

Haas e Mirocha observaram que pacientes biopsiados nos primeiros três meses pós-transplante, com presença de anticorpos anti-doador, que não tiveram imunoexpressão para C4d e que não foram tratados para rejeição mediada por anticorpos, tiveram maiores taxas de progressão para a glomerulopatia do transplante do que os pacientes que receberam o tratamento (Haas M and Mirocha J, 2011).

Os mecanismos da rejeição humoral nos casos C4d negativos ainda não estão totalmente esclarecidos. Um recente estudo experimental demonstrou que a simples presença de aloanticorpos já pode alterar o estado do endotélio, independente da presença do complemento ou de resposta inflamatória. Células endoteliais expostas a aloanticorpos expressam maior quantidade de moléculas de adesão e fatores de crescimento (Zhang X and Reed EF, 2009).

Diante do exposto, os atuais critérios para rejeição mediada por anticorpos passam a ser (Haas et al., 2014): 1- Evidências histológicas: inflamação nos capilares peritubulares e glomerulares (ptc/g>0) continua como critério assim como necrose tubular aguda símile. Incluiu-se o critério de presença de arterite intimal ou transmural, antes sendo apenas escore v3, agora se considera v>0; 2- Manteve-se evidência de anticorpos específicos anti-doador (HLA ou outros antígenos não-HLA); 3- O terceiro critério passa a ser “evidência de interação do anticorpo com o endotélio”, incluindo-se ao menos um

desses itens: presença de moderada inflamação na microcirculação com $g + ptc \geq 2$, sendo que ao menos o g seja ≥ 1 , presença de C4d positivo (C4d2 ou C4d3 em secções congeladas para imunofluorescência ou C4d>0 para secções em parafina no estudo imuno-histoquímico) ou aumento da expressão de fragmentos transcricionais de genes que sejam indicativos de lesão endotelial.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Diante dos avanços relacionados aos transplantes e das novas necessidades diagnósticas que visam restringir o tempo entre a rejeição e a intervenção após lesão renal, torna-se de fundamental importância o estudo de novos marcadores diagnósticos que possam estar presentes na própria biópsia de rim transplantado e que sejam de fácil acessibilidade na rotina diagnóstica do patologista para uma rápida resposta ao nefrologista clínico quanto ao prognóstico da rejeição. O estudo das células NK através de imuno-histoquímica pode fornecer importantes informações sobre aspectos ainda não esclarecidos sobre a fisiopatogenia da rejeição aguda mediada por células T e por anticorpos com e sem evidências de deposição do C4d. A técnica imuno-histoquímica para a detecção das células NK e de fácil aplicabilidade e diante de resultados consistentes pode facilmente ser utilizada.

3. OBJETIVOS

Principal: Estudar o perfil imuno-histoquímico de marcadores associados à expressão das células NK entre rejeições agudas mediadas por células T ou anticorpos em biópsias de rim transplantado.

Secundários: -avaliar a expressão das células NK através dos marcadores imuno-histoquímicos CD56, CD57 e CD16, macrófagos pelo CD68 e células T através do CD3, CD8 e CD4 em biópsias com diagnóstico limítrofe ou conclusivo para rejeição aguda na presença ou ausência de expressão do marcador C4d;
-estabelecer relações desses resultados com a injúria na microcirculação e a sobrevida do enxerto em rejeição aguda, dentro dos compartimentos intersticial, glomerular e vascular da amostra de biópsia renal.

4. MÉTODOS

4.1. Casuística

Este é um estudo retrospectivo que avaliou inicialmente 84 biópsias de pacientes submetidos a transplante renal isolado, com doador falecido ou vivo. Todas as biópsias analisadas foram colhidas entre janeiro de 2009 e dezembro de 2012 na Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) com registro de número 9367, cadastrado na Plataforma Brasil com CAAE inicial de número 03770112.5.0000.0068, parecer consubstanciado do CEP de número 184.118 e data de relatoria em 18 de janeiro de 2013. O projeto foi submetido à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), com aceite de concessão e aprovação de auxílio pesquisa em 26 de janeiro de 2013 sob nº de processo 2012/21604-9.

Critérios de inclusão

- Seleção das biópsias respeitando-se os critérios de adequação do material representativo de acordo com os atuais critérios de Banff para o diagnóstico e para a realização da técnica de imuno-histoquímica (ver Comentário);

Comentário: Foi selecionado um grupo-controle de biópsias sem inflamação como uma comparação para a frequência de células CD56 +, mas não foram encontradas referências na revisão da literatura sobre o número estimado de biópsias para esta comparação, no entanto todas as biópsias expressaram negatividade para o marcador imuno-histoquímico CD56.

- Seleção de todas as biópsias diagnosticadas exclusivamente como rejeição aguda mediada por células T e/ou anticorpos e com critérios sugestivos ou limítrofes para rejeição aguda com presença ou ausência de expressão do marcador C4d;
- Admissão de biópsias de pacientes com ao menos dois anos de acompanhamento clínico pós-transplante;
- Coleta de parâmetros clínicos, laboratoriais e prognósticos das biópsias avaliadas que estivessem pertinentes aos objetivos do estudo;
- Seleção de biópsias de pacientes que receberam rim de doador com tipagem ABO compatível e com prova cruzada negativa (prova cruzada contra linfócitos T e B por citotoxicidade e/ou citometria de fluxo).

Critérios de exclusão

- Biópsias de pacientes recebendo alguma droga em fase de investigação;
- Biópsias de pacientes receptores de transplantes de múltiplos órgãos ou com transplante prévio não renal;
- Biópsias que tivessem outro diagnóstico concomitante aos casos admitidos nos critérios de inclusão (por exemplo, infecções, glomerulopatias recidivantes ou *De novo*, doenças sistêmicas, distúrbios circulatórios, entre outros);
- Biópsias que não preenchessem os critérios de adequabilidade do material;
- Biópsias com diagnóstico de rejeição crônica;

4.2. Desenho do estudo

A revisão das biópsias foi a primeira etapa a ser realizada, nesta foram anotados e tabulados o diagnóstico feito na época, o resultado da pesquisa de anticorpos anti-HLA imediatamente antes do transplante e após o evento do respectivo diagnóstico (pelos

métodos de ELISA e/ou teste de microesferas marcadas-Luminex^R), o tipo de anti-HLA do isotipo IgG (teste qualitativo), porcentagem e especificidade (teste quantitativo) e porcentagem do PRA (teste de reatividade contra painel).

Ainda foram anotados os critérios histopatológicos de acordo com as colorações habituais definidos como escores agudos pelos critérios de Banff:

- g (glomerulite) como g0, g1, g2 ou g3
- i (inflamação intersticial) como i0, i1, i2 ou i3
- t (tubulite) como t0, t1, t2 ou t3
- v (arterite) como v0, v1, v2 ou v3
- ptc (capilarite peritubular) como ptc0, ptc1, ptc2 ou ptc3

As pesquisas de C4d por imunofluorescência indireta (ver técnica de imunofluorescência acima) e ou imunoperoxidase (ver técnica padrão de imunohistoquímica) foram igualmente anotadas conforme critérios de Banff como exemplificado abaixo:

- C4d0-negativo (sem qualquer deposição)
- C4d1-padrão indeterminado (deposição entre 1 a 10% dos capilares peritubulares)
- C4d2-positivo focal (deposição entre 11 a 50% dos capilares peritubulares)
- C4d3-positivo difuso (deposição superior a 50% dos capilares peritubulares)

Todas as biópsias com C4d1por imunofluorescência foram incluídas no grupo de biópsias C4d negativas e biópsias C4d2 e C4d3 foram consideradas positivas dentro do estudo.

Ao final da primeira triagem, obteve-se amostragem de 84 biópsias elegíveis, sendo 14 delas do ano de 2009 (16,66%), 23 de 2010 (27,38%), 38 de 2011 (45,23%) e 9 de 2012 (10,71%) .

Todas as lâminas e blocos histológicos foram oficialmente solicitados ao Departamento de Anatomia patológica do HC-FMUSP para nova análise e classificação, juntamente com mais 20 blocos e lâminas de casos controles referentes a biópsias obtidas durante cirurgia de transplante renal, habitualmente denominadas biópsias “tempo zero”.

Após nova análise e classificação, obtivemos os seguintes dados: 7 biópsias classificadas conforme o diagnóstico de Alterações limítrofes de Banff (8,33%), 35 biópsias (13 rejeições celulares vasculares) como Rejeição Aguda mediada por células T (41,66%), 18 biópsias como Rejeição Aguda mediada por Anticorpos (21,42), 4 biópsias (4,76%) como Rejeição Aguda Mista (Rejeição Mediada por Anticorpos e Rejeição Aguda Celular) e, 20 biópsias (23,80%) com critérios sugestivos porém não conclusivos para Rejeição Aguda mediada por Anticorpos. Do total de 20 casos, 19 apresentavam a pesquisa de anticorpos anti-doador (DSA) positiva pós-transplante e/ou no momento da biópsia. Apenas uma biópsia não apresentava DSA positivo, porém demonstrava a pesquisa de C4d fortemente positiva (C4d3 no exame de imunofluorescência e imunoistoquímica) e critério morfológico compatível, o que justificou sua classificação como suspeita para rejeição mediada por anticorpos. No momento em que as biópsias foram feitas, 61,9% destas se incluíam na categoria ≤ 3 meses de tempo pós-transplante.

Ainda quanto à classificação da amostra, 60,71% das biópsias foram feitas em indivíduos considerados clinicamente sensibilizados.

Com as informações acima descritas, avançamos para a etapa de revisão ou reclassificação dos diagnósticos para estabelecimento dos grupos de estudo. Desta etapa cinco categorias foram identificadas segundo critérios atuais da classificação de

Banff: Biópsias com diagnóstico suspeito para rejeição aguda mediada por células T (n=7), porém, sem todos os critérios conclusivos da classificação de Banff, enquadrando-as na categoria de alterações limítrofes para rejeição aguda ou alterações *borderline*; Biópsias consistentes com o diagnóstico de rejeição aguda mediada por células T ou rejeição aguda celular (n=29). Biópsias com características mistas para rejeição aguda mediada por células T e mediada por anticorpos (n=4). Biópsias consistentes com o diagnóstico de rejeição aguda mediada por anticorpos (n=19). Biópsias sem evidências de depósito de C4d, mas com presença de moderada inflamação na microcirculação com $g + ptc \geq 2$, sendo ao menos o $g \geq 1$, presença de anticorpo específico anti-doador e outras evidências histológicas de rejeição humoral como presença de arterite intimal ou transmural ou padrão de necrose tubular aguda (n=19). Este último grupo foi classificado como padrão de rejeição aguda mediada por anticorpo com deposição negativa para C4d (com C4d0 ou C4d1 por imunofluorescência ou C4d0 por imunoperoxidase).

Casos diagnosticados como rejeição aguda mista foram excluídos de análises posteriores. O total de casos selecionados a partir desta fase do estudo foi de 74 biópsias.

Com análise histomorfológica concluída, as biópsias foram submetidas ao estudo imuno-histoquímico proposto pelo estudo. Anticorpos Primários Utilizados: Células *Natural Killer* (NK): CD56 (clone: 123 C3. D5. marca: Novocastra®) e CD57 (clone: NK1. marca: DBS®), Macrófagos: CD68 (clone: KP1. marca: Dako®), Receptor FcγRIII: CD16 (clone: 2H17. marca: Monossan®), Linfócitos T auxiliares: CD4 (clone: 4B12. marca: Dako®), Linfócitos T citotóxicos: CD8 (clone: CD8/144B. marca: Dako®) e Linfócitos T: CD3 (clone: F7.238. marca: Dako®).

4.3. Análise histológica

As biópsias renais foram fixadas em Duboscq-Brazil imediatamente após coleta, permaneceram neste fixador por um período mínimo de 40 minutos e sequencialmente foram transferidas para solução de formol a 10%, seguido de habitual processamento histológico e inclusão em parafina.

Foram confeccionadas quatro lâminas com secções de três micrômetros, coradas por hematoxilina-eosina (HE), acido periódico de Schiff (PAS), tricrômico de Masson (TM) e prata (PASM). A análise histológica foi realizada aplicando-se os critérios da classificação atual de Banff. Houve revisão e comparação com o diagnóstico anterior e, no caso de divergência, as biópsias foram revistas por um terceiro patologista independente.

4.4. Imunofluorescência: Pesquisa de C4d em biópsias a fresco congeladas

Secções congeladas e não fixadas de biópsias de enxerto renal foram coradas para C4d pela técnica de imunofluorescência em três tempos com anticorpo monoclonal. Biópsias previamente cortadas em criostato e colocadas em lâminas silanizadas foram secas a temperatura ambiente por 20 minutos. Foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de avidina-biotina (Blocking Kit, Erviegas), 20 minutos para cada solução em temperatura ambiente. Posteriormente, as secções foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-C4d (A213-Quidel Corporation, Santa Clara, Ca/USA), diluído a 1:100 em albumina bovina, com incubação por 30 minutos sob temperatura ambiente. Após lavagem em solução salina tamponada, foi feita incubação com anticorpo secundário biotinilado de cavalo anti-IgG de camundongo (BA2000-Vector Laboratories Inc., Burlingame, Ca/USA), diluído a 1:100 em albumina bovina, com incubação por 30 minutos sob temperatura ambiente.

Após lavagem foi feita a incubação com isotiocianato de fluoresceína conjugada à estreptavidina (AS5001-Vector Laboratories Inc., Burlingame, Ca/USA) diluída em albumina bovina a 1:100 por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em solução salina e montadas no padrão habitual. As secções foram examinadas em microscópio de epiluminação no aumento de 400X. Os escores para C4d em capilares peritubulares foram analisados sem o conhecimento dos dados clínicos e morfológicos.

A positividade foi calculada de acordo com a porcentagem de capilares peritubulares corados, avaliando-se cinco campos de grande aumento (400X), contando-se um mínimo de 20 capilares. As áreas de necrose e fibrose foram excluídas da análise.

A reação foi considerada negativa ou positiva de acordo com os critérios estabelecidos pela classificação de Banff 2011.

Nos casos nos quais a informação sobre a realização de imunofluorescência não estava disponível, foi utilizada a técnica de imunoperoxidase para o estudo do C4d (**Figura 5-A e B**).

4.5. Estudo imuno-histoquímico

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas na Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP. Após seleção das biópsias, os respectivos blocos foram separados e de cada um foram feitas oito lâminas com duas secções de 3 µm de espessura para cada biópsia, todas devidamente identificadas e silanizadas.

Para garantir maior sensibilidade, a fim de se evitar a reação de fundo pela interação biotina-avidina, a amplificação foi efetuada com polímeros de segunda

geração Novolink (Novocastra,UK). As lâminas anteriormente silanizadas seguiram as etapas técnicas: desparafinização durante 30 minutos em estufa a 60°C, imersas em Xilol (I), e após 10 minutos, em temperatura ambiente, imersas em Xilol (II). A hidratação foi realizada através de imersão em álcool absoluto (duas vezes) por 2 minutos e depois em álcool a 95% (duas vezes) por 2 min, quando então foram re-hidratadas em água corrente. Sequencialmente foram submetidas a bloqueio de peroxidase endógena por incubação com peróxido de hidrogênio a 3% (Novocastra TM Peroxidase Block), em seis ciclos de 5 minutos, seguida de incubação com caseína a 0,4% em soro com tampão fosfato e produtos estabilizadores surfactantes, assim como Bronidox L a 0,2% (Novocastra TM protein Block). Após lavagem em água corrente, de acordo com o antígeno testado, foi feita recuperação antigênica com tripsina ou com aquecimento em panela de pressão a 95°C durante 3 minutos, com tampão citrato 10mM em PH 6,0. Então foi realizada nova lavagem em água corrente destilada e três trocas em tampão TRIS em PH de 7,4. As lâminas então foram incubadas com o anticorpo primário por 18 horas a 4°C. Novamente foi feita outra lavagem ao término desse tempo, com tampão TRIS, em três trocas de 2 minutos, sendo finalmente realizada a aplicação de Novocastra TM *Post Primary Block*, constituído por soro animal a 10% (v/v) em soro tamponado TRIS/ProClin TM 950 a 0,09% (com o objetivo de favorecer a penetração do polímero). Na sequencia, o *Novolink TM Polymer* teve o objetivo de reconhecer os anticorpos primários ligados ao tecido e essa ligação, após outra lavagem com TRIS, foi revelada com o uso do cromógeno 3,3''diaminobenzidina a 1,74% p/v, em solução estabilizadora (DAB). A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Mayer (Hemalaum-Merck) e, após desidratação em bateria com álcool e xilol, os cortes foram montados em *Entellan*.

Para todos os anticorpos primários envolvidos na pesquisa foram feitas reações imuno-histoquímicas com controles externos positivos e negativos para cada imuno-expressão, com o objetivo de se obter maior precisão nos resultados.

4.6. Análise Histomorfométrica

A análise das células NK foi efetuada nos glomérulos (microcirculação), no interstício (incluindo capilares peritubulares) e em vasos de maior calibre (intimides, vasculites intramural e ou transmural), através da contagem de todas as células positivas para os marcadores CD56, CD57, CD16 e CD68 (**Figura 6**) relacionadas à área em milímetros quadrados na qual as mesmas foram identificadas. A quantificação dos demais grupos celulares (CD3, CD4, CD8) (**Figura 6**) foi realizada para os mesmos compartimentos descritos acima, através da contagem de todas as células positivas para cada respectivo marcador em relação à área em milímetros quadrados na qual as mesmas foram identificadas. Foram selecionados controles negativos e positivos como parâmetros de análise de expressão imuno-histoquímica. Todas as análises citadas foram realizadas na porção cortical das biópsias em estudo, em todos os campos. Nos casos de análise de compartimento intersticial, obteve-se média de células por área (mm^2) e nos compartimentos glomerular e vascular, obteve-se média de células por unidade (glomérulo ou vaso). O método de contagem se baseou na análise por microscópio ótico Olympus® modelo CH40RF100 com aumento 400X feito por patologista devidamente treinado.

Figura 5- Expressão da fração do sistema complemento-C4d- nos capilares peritubulares.
A: C4d por imunofluorescência; B: C4d por imuno-histoquímica.

Figura 6- Expressão das células por estudo imuno-histoquímico para os marcadores CD3, CD8, CD4, CD68, CD16, CD57 e CD56. * CD3, CD8, CD68, CD4, CD16, CD56 e CD57: aumento 100X; ** CD57: aumento 200X; *** CD56 e CD16: aumento 400X

4.7. Análise Estatística

Os resultados foram expressos em mediana, máximo e mínimo para variáveis contínuas; para variáveis categóricas como idade do doador e do receptor, foram utilizadas, médias e desvio padrão. Para parâmetros não Gaussianos, escolhemos a representação em mediana ao invés de média. Estudo de associações/comparações que incluíam dados de variáveis categóricas foi escolhido o teste qui-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher. Estudo de associações/comparações que incluíam dados não paramétricos foi escolhido o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Múltiplas comparações de Dunn (para comparações entre três grupos) e teste de Mann-Whitney (para comparações entre dois grupos). A correlação entre as expressão dos marcadores foi estimada pelo coeficiente de correlação de Spearman. Para todos os marcadores foi realizada análise ROC utilizando modelo logístico, definindo como desfecho a perda do enxerto no período de seguimento estudado. Na curva ROC, os marcadores que geraram as maiores áreas sob as curvas foram selecionados para a etapa seguinte. A sobrevida do enxerto foi calculada pelos métodos de Kaplan-Meier e log-rank através do software Graph Pad Prism (versão 5.05, GraphPadprism Software Inc. ,San Diego, CA, USA). As análises de comparação, correlação e curva ROC foram feitas com o software Statistical Package for the Social Sciences, versão 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Diferenças foram consideradas significativas se $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

Estudamos um total de 74 biópsias de 59 pacientes. As biópsias foram coletadas entre 2009 e 2012. O período de tempo pós-transplante nos casos variou entre 2 dias e 32 meses, com tempo pós- transplante médio de aproximadamente 4 meses e 15 dias e mediana de 42 dias. Das 74 biópsias, 38 apresentavam DSA positivo e todas foram classificadas como rejeição aguda mediada por anticorpos. Trinta e seis biópsias negativas (n=36) para DSA foram classificadas como rejeição aguda mediada por células. Dos 38 casos classificados como aABMR foram observadas 21(55,2%) biópsias com DSA classe I, 12 (31,6%) com DSA classe II, 5 (13,2%) com DSA classe I e II e 19 (50,0%) biópsias com pesquisa para C4d positiva.

A frequência de grupos da classificação de Banff nos casos de rejeição aguda mediada por células T foi: casos limítrofes ou suspeitos de rejeição aguda 19,4% (n=7), tipo ou grau IA: 13,9% (n=5), IB: 30,5% (n=11), IIA: 25% (n=9), IIB: 2,7% (n=1) e grau III: 8.4% (n=3).

Os valores de creatinina sérica e eGFR no momento da biópsia demonstraram médias de 5,5 mg/dl e 20,2 ml/min, desvios padrão = 3,61 mg/dl e 3,61 ml/min, valores máximos de 15,16 mg/dl e 68,89 ml/min e mínimos: 1,08 mg/dl e 3,26 ml/min, respectivamente. A **Tabela 1** mostra características clínicas e demográficas dos pacientes do estudo.

Tabela 1- Características clínicas dos pacientes diagnosticados com rejeição aguda por biópsia de rim transplantado.

Características clínicas	Todos (n = 59)	aTCMR (n = 33)	aABMR (n = 26)	P value
Idade do receptor, anos, média (mín-máx)	43,5 (16–63)	41,2 (16–63)	46,3 (23–62)	ns
Receptores femininos n(%)	32 (54,2%)	13 (39,4%)	19 (73%)	0,017
Primeiro transplante, n (%)	52 (88,2%)	32 (97%)	20 (76,9%)	0,036
HLA mismatches, n (%)				
A1	42 (71,2%)	23 (69,6%)	19 (73,0%)	ns
A2	51 (86,4%)	30 (90,9%)	21 (80,7%)	ns
B1	48 (81,3%)	25 (75,7%)	23 (88,4%)	ns
B2	47 (79,6%)	27 (81,8%)	20 (76,9%)	ns
DR1	42 (71,2%)	23 (69,6%)	18 (69,2%)	ns
DR2	43 (72,8%)	24 (72,7%)	19 (7,0%)	ns
Doença primária				
HAS	6 (10,1%)	5 (15,1%)	1 (3,8%)	ns
DM	3 (5,0%)	3 (9,0%)	0 (0%)	ns
GNC	2 (3,3%)	2 (6,0%)	0 (0%)	ns
Pielonefrite/Refluxo	6 (10,1%)	1 (3,0%)	5 (19,2%)	ns
Doença Policística	3 (5,0%)	2 (6,0%)	1 (3,8%)	ns
LES	3 (5,0%)	1 (3,0%)	2 (7,7%)	ns
Indeterminada	36 (61%)	19 (57,5%)	17 (65,3%)	ns
Terapia imunossupressora inicial				
MPA/Tac/ corticoesteroide	54 (93,1%)	29(50%)	25(43,1%)	ns
MPA/Tac	2(3,4%)	2(3,4%)	0(0,0%)	ns
MPA/ corticoesteroide	2(3,4%)	2(3,4%)	0(0,0%)	ns
Idade do doador, anos, média (mín-máx)	41,3(21–70)	40 (21–65)	47(25–70)	0,035
Dias pós-transplante, mediana (mín-máx)	42 (2-970)	120 (4-820)	20 (2-970)	0,084
Creatinina sérica final (mg/dl, média±DP)	2,52±2.31	2,16±1.80	2,97±2.80	ns
Perda do enxerto	22,0%	18,1%	26,9%	ns
Doadores falecidos, n (%)	35 (59,3%)	14 (42,4%)	21 (80,7%)	0,0036
Indução com timoglobulina, n (%)	34 (59,6%)	11 (35,4%)	23 (88,4%)	<0,0001

continua

Pré-existente	n (%)	8 (53,3%)	2 (13,3%)	6 (40%)	
DSA classe I	Mean MFI±SD	2614,56±18.1	1014,4±0.0	2904,36±22.1	0,021
Pré-existente	n (%)	4 (26,6%)	0 (0%)	4 (26,6%)	
DSA classe II	Mean MFI±SD	2521,24±38.1	0,0±0.0	2521,24±38,1	<0,0001
Pré-existente	n (%)	3 (20%)	0 (0%)	3 (20%)	
DSA classe I e II	mean MFI±SD	2228,1±27.3	0,0±0.0	2228,1±27,3	<0,0001
<i>De novo</i>	n (%)	16 (61,5%)	0 (0%)	16 (61,5%)	
DSA classe I	Mean MFI±SD	3119,25±21.4	0,0±0.0	3119,25±21.4	<0,0001
<i>De novo</i>	n (%)	7 (26,9%)	0 (0%)	7 (26,9%)	
DSA classe II	Mean MFI±SD	4112,12±19.2	0,0±0.0	4112,12±19.2	<0,0001
<i>De novo</i>	n (%)	3 (11,5%)	0 (0%)	3 (11,5%)	
DSA classe I e II	mean MFI±SD	4252,11±14.2	0,0±0.0	4252,11±14.2	<0,0001

HAS: Hipertensão arterial sistêmica; DM: *Diabetes mellitus*; GNC: Glomerulonefrite crônica; LES: *Lupus* eritematoso sistêmico; DP: desvio-padrão; MPA: micofenolato ácido e micofenolato mofetil; Tac: tacrolimus

Conforme observado na **Tabela 2**, a expressão do CD56 ($P = 0,007$) e CD57 ($P = 0,003$) no compartimento intersticial foi maior no grupo aTCMR do que nos grupos aABMR C4d positivo (+) e C4d negativo (-).

Também foi observada maior expressão de CD57 no compartimento vascular para o grupo aTCMR do que para os grupos aABMR ($P = 0,005$). Este resultado precisa ser avaliado com cautela visto que há muitos resultados de contagem equivalentes à zero no compartimento vascular.

O grupo aTCMR, também mostrou maior expressão de células CD3+ nos compartimentos intersticial ($P < 0,001$), glomerular ($P = 0,027$) e vascular ($P = 0,024$) e para células CD8+, nos compartimentos intersticial ($P < 0,001$) e vascular ($P = 0,042$). A expressão de células CD4+ no compartimento intersticial também foi maior nas aTCMR ($P < 0,001$).

Tabela 2- Comparação dos valores da análise histomorfométrica para os marcadores imuno-histoquímicos (IHQ) CD56, CD57, CD16, CD68, CD3, CD8 e CD4 entre os grupos de rejeição aguda mediada por células T (aTCMR) e mediada por anticorpos (aABMR) com (C4d+) e sem (C4d-) evidência de deposição de C4d, em diferentes compartimentos das biópsias de rim transplantado.

Marcador IHQ	aTCMR			aABMR						P ^a	comparações ^b
	(n = 36)			C4d–			C4d+				
	Méd	Mín	Máx	Méd	Mín	Máx	Méd	Mín	Máx		
CD56 intersticial	0,4	0,0	17,0	0,08	0,0	1,17	0,25	0,0	1,35	0,007	aTCMR>aABMR-C4d–
CD56 glomerular	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,91	0,07	0,0	0,66	ns	
CD56 vascular	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ns	
CD57 intersticial	2,6	0,0	44,0	0,53	0,05	7,82	0,8	0,17	8,7	0,003	aTCMR>aABMR (ambos)
CD57 glomerular	0,9	0,0	30,8	0,28	0,0	3,8	0,28	0,0	6,57	ns	
CD57 vascular	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,005	aTCMR>aABMR (ambos)
CD16 intersticial	5,3	0,1	70,0	2,4	0,23	23,4	4,72	0,09	64	ns	
CD16 glomerular	1,3	0,0	11,0	2,0	0,5	13,09	2,68	0,4	6,8	ns	
CD16 vascular	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	4,25	ns	
CD68 intersticial	5,0	0,1	64,5	2,62	0,0	20,4	5,16	0,12	76,6	ns	
CD68 glomerular	0,6	0,0	16,5	0,78	0,0	6,47	1,53	0,0	11,75	0,004	aTCMR<aABMR-C4d+
CD68 vascular	0,0	0,0	8,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	4,6	ns	
CD3 intersticial	40,4	3,2	87,6	4,54	0,0	44,9	10,6	0,0	42,1	0,000	aTCMR>aABMR (ambos)

continua

continua

CD3 glomerular	0,8	0,0	8,6	0,0	0,0	3,08	0,42	0,0	3,6	0,027	aTCMR>aABMR-C4d-
CD3 vascular	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	0,024	aTCMR>aABMR-C4d-
CD8 intersticial	28,0	1,9	77,1	4,7	0,1	42,8	10,0	0,18	81,1	0,000	aTCMR> aABMR (ambos)
CD8 glomerular	0,6	0,0	7,6	0,09	0,0	3,3	0,8	0,0	5,0	ns	
CD8 vascular	0,0	0,0	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,6	0,042	aTCMR>aABMR-C4d-
CD4 intersticial	1,8	0,0	74,5	0,19	0,0	16,2	0,65	0,0	22,2	0,001	aTCMR>aABMR-C4d-
CD4 glomerular	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	2,3	ns	
CD4 vascular	0,0	0,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5	ns	

^a Teste de Kruskal-Wallis. ^b teste de múltiplas comparações de Dunn.

A **Tabela 3** e as **Figuras 7 e 8** mostram a expressão do CD56 e CD57 no compartimento intersticial em aTCMR comparada à expressão de CD16 e CD68 no compartimento glomerular em aABMR. A expressão de células CD56+ e CD57+ no compartimento intersticial foi significativamente maior nas aTCMR ($P = 0,004$ e $P = 0,001$, respectivamente). A expressão de células CD16+ foi estatisticamente significativa no compartimento glomerular em aABMR ($P = 0,030$), assim como a expressão de células CD68+ que foi igualmente estatisticamente significativa no compartimento glomerular para aABMR ($P = 0,01$). CD57 também teve maior expressão no compartimento glomerular das aTCMR comparadas as aABMR ($P = 0,046$).

A análise do poder estimado dos testes estatísticos (**Tabela 4**) para os marcadores CD56, CD57, CD16, CD68, CD3, CD8 e CD4 nos grupos de rejeição aguda mediada por anticorpos com e sem evidências de C4d (aABMR C4d+ / -) e rejeição aguda mediada por células T (aTCMR) foi de aproximadamente 70% para a amostragem estudada sendo que um teste incapaz de discriminar indivíduos teria uma área sob a curva de 0,50. Valores iguais ou acima de 0,70 são considerados satisfatórios.

Tabela 3- Comparação dos valores da análise histomorfométrica para os marcadores imuno-histoquímicos (**IHQ**) CD56, CD57, CD16, CD68, CD3, CD8 e CD4 entre os grupos de rejeição aguda mediada por células T (**aTCMR**) e mediada por anticorpos (**aABMR**) em diferentes compartimentos das biópsias de rim transplantado.

Marcador IHQ	aTCMR (n = 36)			aABMR (n = 38)			<i>P_a</i>
	Méd	Mín	Máx	Méd	Mín	Máx	
CD56 intersticial	0,4	0,0	17,0	0,1	0,0	1,4	0,004
CD56 glomerular	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,9	ns
CD56 vascular	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ns
CD57 intersticial	2,6	0,0	44,0	0,8	0,1	8,7	0,001
CD57 glomerular	0,9	0,0	30,8	0,3	0,0	6,6	0,046
CD57 vascular	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0	0,001
CD16 intersticial	5,3	0,1	70,0	3,1	0,1	64,0	ns
CD16 glomerular	1,3	0,0	11,0	2,3	0,4	13,1	0,030
CD16 vascular	0,0	0,0	4,0	0,0	0,0	4,3	ns
CD68 intersticial	5,0	0,1	64,5	3,5	0,0	76,6	ns
CD68 glomerular	0,6	0,0	16,5	1,5	0,0	11,8	0,010
CD68 vascular	0,0	0,0	8,0	0,0	0,0	4,6	ns
CD3 intersticial	40,4	3,2	87,6	6,4	0,0	44,9	0,000
CD3 glomerular	0,8	0,0	8,6	0,1	0,0	3,6	0,017
CD3 vascular	0,0	0,0	6,3	0,0	0,0	4,0	0,010
CD8 intersticial	28,0	1,9	77,1	6,6	0,1	81,1	0,000
CD8 glomerular	0,6	0,0	7,6	0,4	0,0	5,0	ns
CD8 vascular	0,0	0,0	4,5	0,0	0,0	2,6	0,019
CD4 intersticial	1,8	0,0	74,5	0,5	0,0	22,2	0,002
CD4 glomerular	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	2,3	ns
CD4 vascular	0,0	0,0	6,0	0,0	0,0	4,5	ns

^a Teste de Mann-Whitney

Figura 7- Representação gráfica da tabela 3: Box Plot dos valores da contagem média de células positivas CD56, CD57, CD16, CD68, CD3, CD8 e CD4 nos compartimentos intersticial (i) e glomerular (g). Comparação entre rejeição aguda mediadas por células T (aTCMR) e rejeição aguda mediadas por anticorpos (aABMR).

Figura 8- Expressão das células CD56+ e CD57+, no compartimento intersticial, em rejeições agudas mediadas por células T (aTCMR) e das células CD16+ e CD68+, no compartimento glomerular, em rejeições agudas mediadas por anticorpos (aABMR).

CD56i e CD57i: células CD56+ e CD57+ no compartimento intersticial;
 CD16g e CD68g: células CD16+ e CD68+ no compartimento glomerular.

Tabela 4- Poder estimado do teste estatístico para os marcadores CD56, CD57, CD16, CD68, CD3, CD8 e CD4 entre os grupos de rejeição aguda mediada por anticorpos com e sem evidências de C4d (aABMR C4d+ / -) e rejeição aguda mediada por células T (aTCMR).

	aABMR C4d+ / -		aTCMR		Poder estimado
	MEDIA	DP	MEDIA	DP	
CD56 intersticial	0,28	0,35	1,44	3,28	>0,70
CD57 intersticial	1,41	1,99	5,27	8,25	0,75 – 0,80
CD16 intersticial	7,84	11,98	12,94	16,69	>0,70
CD68 intersticial	9,26	16,87	9,31	14,34	>0,70
CD3 intersticial	11,23	12,96	39,86	24,01	0,80 – 0,90
CD8 intersticial	12,95	17,51	33,56	22,90	> 0,90
CD4 intersticial	2,51	5,00	9,86	16,63	0,70 – 0,75
CD56 glomerular	0,17	0,25	0,16	0,29	>0,70
CD57 glomerular	0,72	1,28	2,21	5,35	>0,70
CD16 glomerular	2,82	2,33	2,13	2,36	>0,70
CD68 glomerular	2,41	2,69	1,53	3,30	>0,70
CD3 glomerular	0,75	1,10	1,46	2,01	>0,70
CD8 glomerular	0,76	1,08	1,09	1,45	>0,70
CD4 glomerular	0,15	0,43	0,03	0,09	>0,70

Quando submetemos os resultados ao estudo de correlação (**Tabela 5**), no compartimento intersticial para casos de aTCMR, encontramos correlação para os seguintes marcadores: CD56 e CD57 ($r = 0,429$; $P = 0,009$); CD56 e CD16 ($r = 0,489$; $P = 0,003$); CD57 e CD16 ($r = 0,483$; $P = 0,003$). Similar correlação foi observada para o grupo aABMR. Também no compartimento intersticial, nós não encontramos correlação entre expressão CD68+ e CD56+ em nenhum dos dois grupos (aTCMR e aABMR). No compartimento glomerular, as correlações estatisticamente significantes foram CD56+ e CD57+ no grupo aABMR ($r = 0,355$; $P = 0,029$); entre CD56+ e CD16+ no grupo aABMR ($r = 0,407$; $P = 0,011$); entre CD16+ e CD68, no grupo aTCMR ($r = 0,36$; $P =$

0.029) e no grupo aABMR ($r = 0,562$; $P = 0,000$).

A partir dos resultados expostos acima, em uma casuística de 59 biópsias correspondentes aos 59 pacientes, analisamos a contagem de células CD56+ e CD16+, assim como células CD68+, CD3+, CD8+ e CD4+, localizadas nos compartimentos intersticial e glomerular e comparamos com os escores de glomerulite (g) e pericapilarite tubular (ptc). Optou-se por não se analisar a contagem de células CD57 positivas nesta fase do estudo porque o CD57 incluiu nos resultados anteriores, a expressão para os marcadores CD56 e CD8 nos compartimentos estudados.

Os subgrupos estudados foram $g < 1$ e $g \geq 1$ para ausência ou presença de glomerulite, respectivamente e $ptc \leq 1$ e $ptc \geq 2$ para ausência/leve pericapilarite ou presença de pericapilarite, respectivamente.

Tabela 5- Correlações entre os marcadores de células NK (células CD56+, CD57+ e CD16+) e de monócitos/macrófagos (CD68+) em biópsias de rim transplantados, por localização das células (compartimento no parênquima renal) e por tipo de rejeição aguda.

Compartimento		aTCMR			aABMR		
Intersticial	Estatística	CD57	CD16	CD68	CD57	CD16	CD68
CD56	r^*	0,429	0,489	0,313	0,336	0,356	0,178
	P	0,009	0,003	ns	0,039	0,028	ns
CD57	r^*		0,483	0,435		0,595	0,514
	P		0,003	0,008		0,000	0,001
CD16	r^*			0,609			0,535
	P			0,000			0,001
		aTCMR			aABMR		
Glomerular	Estatística	CD57	CD16	CD68	CD57	CD16	CD68
CD56	r^*	0.100	0.149	0.149	0.355	0.407	0.182
	P	ns	ns	ns	0.029	0.011	ns
CD57	r^*		0.273	0.191		0.251	0.067
	P		ns	ns		ns	ns
CD16	r^*			0.364			0.562
	P			0.029			0.000

r^* : Coeficiente de correlação de Spearman

Na **Tabela 6**, houve associação estatisticamente significante entre células CD56+ no compartimento intersticial e casos com ausência / leve capilarite peritubular, ou seja, $ptc \leq 1$ ($P = 0,003$) e casos com presença de glomerulite ($g \geq 1$) ($P = 0,029$). Células CD16+ no compartimento intersticial foram associadas ao subgrupo $ptc \geq 2$ ($P = 0,0001$) e células CD16+ no compartimento glomerular foram associadas ao subgrupo $g \geq 1$ ($P = 0,009$).

O subgrupo $ptc \geq 2$ mostrou maior expressão de células CD3+ nos compartimentos intersticial e glomerular, respectivamente, $P < 0,0001$ e $P = 0,027$ e maior expressão de células CD8+ e CD4+, no compartimento intersticial com $P < 0,0001$ e $P = 0,02$, respectivamente.

No grupo $g \geq 1$ houve maior expressão, no compartimento glomerular, de células CD3+ no ($P = 0,034$), de células CD8+ ($P = 0,0006$) e no compartimento intersticial, de células CD68+ ($P = 0,0015$). A contagem de células CD16+ nos compartimentos intersticial e glomerular demonstrou diferença estatisticamente significativa para os escores de pericapilarite tubular e glomerulite, respectivamente. A positividade para células CD56 no compartimento intersticial foi estatisticamente significativa para ambos os escores, ptc e g.

Tabela 6. Associação entre os valores da análise IHQ dos marcadores (CD56, CD16, CD3, CD8, CD4 e CD68) e os escores de rejeição aguda (glomerulite-g e capilarite peritubular-ptc) nos compartimentos intersticial e glomerular

IHQ compartimento	g < 1	g ≥ 1	P	ptc ≤ 1	ptc ≥ 2	P
CD56 intersticial; (mín-máx) média	(0,0-5,7) 0,4	(0,0-0,0) 1,4	0,029	(0,0-1,5) 0,27	(0,07-17,0) 1,9	0,003
CD56 glomerular; (mín-máx) média	(0,0-1,1) 0,18	(0,0-0,8) 0,13	0,66	(0,0-1,14) 0,17	(0,0-1,0) 0,14	0,75
CD16 intersticial; (mín-máx) média	(0,09-70,0) 8,9	(0,4-64,0) 11,7	0,30	(0,09-20,6) 4,48	(0,4-70,0) 20,2	0,0001
CD16 glomerular; (mín-máx) média	(0,0-5,6) 1,71	(0,62-11,0) 2,79	0,009	(0,0-9,25) 2,17	(0,0-11,0) 2,41	0,77
CD3 intersticial; (mín-máx) média	(0,4-84,5) 29,2	(0,04-87,6) 27,04	0,78	(0,04-84,5) 7,31	(6,16-87,6) 17,3	<0,0001
CD3 glomerular; (mín-máx) média	(0,0-3,4) 0,61	(0,0-8,6) 1,61	0,034	(0,0-6,5) 0,63	(0,0-8,6) 1,93	0,0027
CD8 intersticial; (mín-máx) média	(0,18-70,0) 20,7	(0,8-77,1) 27,2	0,40	(0,18-66,8) 14,5	(1,88-77,1) 40,6	<0,0001
CD8 glomerular; (mín-máx) média	(0,0-1,6) 0,40	(0,0-7,6) 1,50	0,0006	(0,0-3,12) 0,65	(0,0-7,6) 1,47	0,08
CD4 intersticial; (mín-máx) média	(0,0-74,5) 9,38	(0,0-25,9) 4,31	0,08	(0,0-42,2) 3,73	(0,0-74,5) 11,99	0,02
CD4 glomerular; (mín-máx) média	(0,0-0,42) 0,014	(0,0-0,42) 0,030	0,34	(0,0-0,24) 0,006	(0,0-0,42) 0,049	0,10
CD68 intersticial; (mín-máx) média	(0,12-64,5) 5,69	(0,0-62,4) 9,57	0,0015	(0,0-64,5) 5,69	(0,4-62,4) 13,10	0,74
CD68 glomerular; (mín-máx) média	(0,0-9,66) 1,07	(0,0-16,5) 2,38	0,13	(0,0-16,50) 1,37	(0,0-11,75) 2,26	0,22

Min: Minimum. Max: Maximum. (1) Mann-Whitney test

g<1: ausência de glomerulite; g≥1: presença de glomerulite; ptc≤1: ausência de capilarite peritubular; ptc≥2: presença de capilarite peritubular

A curva ROC da variável CD56 no compartimento intersticial demonstrou como ponto de corte que valores acima 0,26 apresentariam melhor sensibilidade e ou especificidade (**Figura 9**). O valor de corte selecionado de 0,56 foi encontrado arbitrariamente pelos pesquisadores dentre os valores possíveis para a variável de decisão. Os outros marcadores também foram submetidos ao estudo de possíveis valores de corte que pudessem interferir na sobrevida do enxerto, porém nenhum deles apresentou resultados significantes (**Tabela 7**).

Uma curva inicial de sobrevida foi elaborada considerando-se as biópsias da casuística quanto aos tipos de rejeição aguda. O resultado demonstrou que rejeições agudas mediadas por anticorpos (C4d positivas e negativas, n=26) tiveram pior sobrevida quando comparadas com rejeições agudas mediadas por células T (n=33) (P = 0,034) (**Figura 10-A**). Quando foi considerada somente a contagem de células intersticiais CD56 positivas, o grupo com contagem $\leq$ a 0,56 céls/mm² (n=44) (sensibilidade de 46,2%, especificidade de 80,4%, acurácia de 72,1%,) mostrou melhor sobrevida comparado ao grupo com contagem superior a 0,56 céls/mm² (n=15). No período observado de 646 dias de seguimento pós-transplante, a perda do enxerto para casos com média de contagem maior que 0.56cells/mm² no compartimento intersticial foi de aproximadamente 41% (**Figura 10-B**). Dentre os casos com pior sobrevida (n=15 biópsias), 9 biópsias eram de pacientes com rejeição aguda mediada por células T (aTCMR) e 6, eram de pacientes com rejeição aguda mediada por anticorpos (aABMR) com e sem deposição para o C4d (P = 0,40).

Tabela 7- Estimativa da área sob a curva obtida via curva ROC dos marcadores.

Marcador	Area	ep	p	IC95%	Cutoff	Sens	Esp	Acuracia	Kappa	p
CD56 i	0,57	0.10	0,437	(0.36-0.78)	> 0,26	0,53	0,53	0,52	0,04	0,701
CD56 g ⁽¹⁾	0.51	0.09	0.905	(0.33-0.69)						
CD57 i	0.60	0.09	0.299	(0.41-0.78)	< 0.77	0.58	0.65	0.63	0.18	0.143
CD57 g	0.66	0.09	0.087	(0.48-0.84)	< 0.29	0.66	0.65	0.65	0.23	0.048
CD 16 i	0.50	0.10	0.964	(0.31-0.70)	< 3,87	0,53	0,57	0,56	0,07	0,508
CD 16 g	0.60	0.08	0.235	(0.44-0.77)	> 1.93	0.61	0.61	0.61	0.16	0.151
CD 68 i	0.61	0.09	0.259	(0.42-0.80)	< 3.43	0.61	0.56	0.57	0.12	0.250
CD 68 g	0.55	0.08	0.549	(0.39-0.72)	< 0,72	0,50	0,45	0,53	0,03	0,780
CD3 i ⁽²⁾	0.55	0.09	0.691	(0.35-0.72)	< 16,5	0,53	0,56	0,73		
CD3 g	0.57	0.08	0.432	(0.40-0.74)	< 0,46	0,53	0,52	0,51	0,03	0,752
CD8 i	0.52	0.10	0.657	(0.34-0.73)	> 16,8	0,53	0,56	0,55	0,06	0,549
CD8 g	0.51	0.09	0.904	(0.32-0.69)	> 0,46	0,53	0,52	0,51	0,03	0,753
CD4 i	0.57	0.09	0.442	(0.39-0.75)	< 0,66	0,61	0,59	0,59	0,14	0,196
CD4 g ⁽¹⁾	0.55	0.09	0.54	(0.37-0.74)						

(1) Ponto que maximiza sensibilidade e especificidade não identificados pela curva ROC

(2) Kappa não foi possível ser calculado

Na **Figura 11**, podemos observar as diferentes curvas de sobrevida do enxerto nos subgrupos que incluem média de células CD56 positivas e tipo de rejeição mostrando, por exemplo, que o subgrupo com rejeição aguda mediada por células T e menor média de células CD56+, apresentava maior sobrevida comparado ao outro subgrupo com o mesmo tipo de rejeição e média de células CD56+ > 0,56 céls/mm²; o mesmo sendo observado para os casos de rejeição aguda mediada por anticorpos. Esse resultado indica que a média de contagem de células CD56+ no interstício, foi o fator preponderante para a diferença estatisticamente significativa nas curvas de sobrevida observadas no estudo.

Quando analisarmos estes mesmos valores de corte de células CD56+ no compartimento intersticial e comparamos com os escores morfológicos de pericapilarite tubular e glomerulite, notamos que o valor de $CD56 \leq 0,56$ associou-se com $ptc \leq 1$ (critério de ausência ou leve pericapilarite tubular) ($p= 0,012$) (**Figura 12-A**) enquanto que o valor de $CD56 > 0,56$ associou-se com a presença de glomerulite ($g \geq 1$) ($P=0,002$) (**Figura 12-B**).

Figura 9- Curvas ROC das variáveis células CD56+ intersticiais, CD56+ glomerulares, células CD16+ intersticiais e CD16+ glomerulares. A (CD56i), B (CD56g), C (CD16i) e D (CD16g), com pontos de cortes $CD56i > 0,26$, $CD56g$ não identificado, $CD16i < 3,87$ e $CD16g > 1,93$, respectivamente.

Figura 10 - Curvas de Sobrevida do Enxerto: Curva de sobrevida do enxerto analisada em 59 biópsias. Comparação de casos quanto ao tipo de rejeição aguda (10-A) e quanto valor de contagem de células CD56+ no compartimento intersticial (10-B). Métodos de Kaplan-Meier e log-rank. Valores de P que foram considerados significantes ($P < 0,05$).

Figura 11- Sobrevida do Enxerto agrupando casos quanto à média de células CD56 positivas e quanto ao tipo de rejeição. Curva de sobrevida do enxerto analisada nas 59 biópsias comparando grupos de casos que incluem concomitantemente o valores de expressão de células CD56 positivas $\leq 0,56$ ou $> 0,56$ e tipo de rejeição aguda, mediada por células T ou por anticorpos. Métodos de Kaplan-Meier e log-rank. Valores de P que foram considerados significantes ($P < 0.05$).

Figura 12- Associações entre células CD56+ no compartimento intersticial e escores de lesão endotelial (ptc: capilarite peritubular, g: glomerulite). A: Discreta e/ou leve capilarite peritubular (ptc ≤ 1) mostrou associação com CD56+ ≤ 0.56 cells/mm². B: presença de glomerulite (g ≥ 1) mostrou associação com CD56+ > 0.56 cells/mm². * média $\pm$ DP (desvio padrão). Testes utilizados para comparações entre as biópsias: Qui-quadrado e teste exato de Fisher. Valores de P foram indicados onde há significância (P $< 0,05$).

6. DISCUSSÃO

As células NK tem sido tema de estudo em recentes publicações sobre patologia de transplante renal. Nas situações de isquemia-reperfusão, há indícios de que a lesão nas células epiteliais tubulares seja potencializada pela participação das células NK, como uma resposta inflamatória capaz de recrutar neutrófilos e liberar perforinas (Zhang et al, 2008).

Nos transplantes, células NK ativadas, podem ainda mediar apoptose de células epiteliais tubulares e contribuir nos mecanismos envolvidos na alorresposta celular e rejeição aguda (Zhang et al., 2010, Obara et al., 2005, Maier et al., 2001).

Em modelo experimental de rim transplantado com MHC compatível foi demonstrado que a atividade das células NK pode persistir por maior período de tempo e esta atividade pode mediar posteriormente um mecanismo de lesão ao enxerto independentemente das células T ou B (Zhang et al., 2015).

As células NK também podem desencadear um mecanismo de rejeição aguda ou uma situação de tolerância ao enxerto dependendo do tipo de receptor envolvido e da natureza da citocina liberada (Kitchens et al., 2006, Kim et al., 2007, Kroemer et al., 2008).

Alguns estudos relatam que as manifestações de rejeição observadas na biópsia de enxerto renal diferem entre os diferentes compartimentos da biópsia renal e a partir dessa observação, há a discussão sobre a importância de se caracterizar melhor os diferentes fenótipos da rejeição; a vasculopatia, por exemplo, tem recebido uma especial atenção na conferencia de Banff e são levantadas evidências de que a presença de vasculite pode estar associada com pior prognóstico da rejeição (Lefaucheur et al., 2013).

Discussões sobre a importância das lesões na microcirculação (glomerulite e

capilarite peritubular) salientam o papel que sítios específicos dentro da amostra de biópsia renal, como os glomérulos e os capilares peritubulares, podem representar na interpretação diagnóstica (Einecke et al., 2009) e o interstício (Mengel et al., 2009).

Inicialmente, nossos resultados mostraram que a expressão do marcador CD56, nas células localizadas no compartimento intersticial, associou-se à pericapilarite tubular e glomerulite. Outros marcadores de células T como o CD3, o CD4 e o CD8 foram estatisticamente associados somente à pericapilarite tubular.

Essa associação entre infiltração de células CD56+ nas biópsias de rim transplantado e capilarite peritubular também foi encontrada pelo estudo de Hidalgo e colaboradores (Hidalgo et al., 2010) contudo neste estudo, não há a descrição sobre o tempo pós-transplante de identificação dessa lesão no parênquima renal, ou seja, se a lesão era recente ou tardia ou sobre onde as células CD56+ positivas se localizavam na biópsia.

Também em relação ao número de células CD56+ no compartimento intersticial, observamos que valores médios de contagem acima de $0,56 \text{ céls/mm}^2$ estavam associados a pior sobrevida do enxerto renal e também associados com a presença de glomerulite na biópsia.

Este resultado pode contribuir com as discussões sobre a importância da glomerulite na perda do enxerto, já que não houve diferença estatisticamente significativa para o critério de tipos de rejeição aguda (aTCMR e aABMR) observado dentro do grupo de biópsias com pior curva de sobrevida.

Um recente artigo, publicado por Shin et al., 2015, encontrou correlação entre células CD56 positivas e sobrevida do enxerto; a mesma correlação para infiltrado de células CD56+ foi observada também para os casos com rejeições crônicas em atividade (rejeições mediadas por anticorpos) e em biópsias de enxerto renal tardias.

A relação entre células NK e sobrevida de enxertos em transplante já foi discutida em alguns estudos experimentais tal qual um modelo que observou que receptores de

aloenxertos hepáticos com depleção de células NK tinham maior sobrevida de enxerto e níveis menores de IFN- γ (Obara et al., 2005) e outro estudo que constatou que a inibição de células NK poderia prolongar a sobrevida do enxerto em transplante cardíaco (Maier et al., 2001).

Outras publicações associam polimorfismos nos genes KIR à sobrevida do enxerto (Nowak et al., 2012 and Kúsniarczyk et al., 2013) e relatam que células NK dos receptores podem exibir um perfil mais potente de citotoxicidade dependendo do número receptores codificados por genes KIR que consigam reconhecer HLA do doador como não-*self* (Vampa et al., 2003). Os receptores KIR são responsáveis pela detecção de HLA *self* o que pode impedir a citólise promovida pelas células NK para todas as células que não são reconhecidas como próprias (Parham, 2005).

Em outra perspectiva, quando o estudo analisou a expressão de marcadores de células NK nos dois diferentes tipos de rejeição aguda, aTCMR e aABMR, encontramos que houve uma predominância de células intersticiais positivas para os marcadores CD56 e CD57, juntamente com CD3, CD4 e CD8 nas biópsias com aTCMR.

A patogênese da aTCMR envolve as APCs (células apresentadoras de antígenos), mais especificamente as células dendríticas. O mecanismo de alorreconhecimento entre os linfócitos T e o MHC do doador promovido pela APC do doador (alorreconhecimento direto) ou APC do receptor (alorreconhecimento indireto) é base da resposta aloimune, sendo que a presença das moléculas MHC determinam a diferenciação das células T em CD8+ e CD4+ (26). As células CD8+ e CD4+ reconhecem aloantígenos expressos nas células do enxerto via TCR (receptor de célula T). Neste contexto, dois sinais são necessários para esse reconhecimento: o primeiro é proveniente da interação entre receptor TCR e antígeno presente na molécula MHC, o segundo sinal, vem de uma coestimulação decorrente da interação entre célula T e moléculas presentes na superfície da APC. Entre as numerosas vias de coestimulação que ocorrem nesse processo, uma das

mais estudadas é a interação entre CD28, que é encontrado na superfície da célula T, e os ligantes CD80 e CD86, presentes na APC (Clarkson et al., 2005)

Um estudo experimental, que se propôs a avaliar rejeição aguda em transplantes cardíacos, sugeriu com base em seus resultados, que as células NK podem auxiliar na ativação e ou diferenciação das células T alorreativas durante uma resposta imune ao transplante. Essa hipótese surgiu com base na observação de importante diminuição na produção de IFN- γ por células “in vitro” após depleção de células NK em camundongos CD28^{-/-}. Este estudo ainda mostra que as células NK alcançam um pico de infiltração no aloenxerto em aproximadamente seis dias pós-transplante enquanto as células TCD3⁺ não conseguem atingir um pico de infiltração antes dos oito dias pós-transplante. A discussão deste trabalho defende a importância de se considerar a ação da célula NK juntamente com a célula T na resposta imune ao aloenxerto (McNerney et al., 2006).

As células NK não precisam de uma sensibilização prévia para exercer sua atividade imune, elas reconhecem seus alvos através de um amplo espectro de receptores. A atividade da célula NK é mediada pelo equilíbrio entre receptores de ativação, responsáveis pela atividade “killer” e receptores de inibição que modulam sua citotoxicidade (Ljunggren et al., 1990). Células NK são conhecidas por serem as principais produtoras de IFN- γ em condições patológicas. A produção de IFN- γ pode modular a resposta das células T nos órgãos linfoides periféricos, possivelmente após a migração da célula NK para esses órgãos secundários (Martin-Fontecha et al., 2004).

A observação de maior expressão imunoistoquímica para marcadores de células NK na aTCMR pode sugerir que células NK possam atuar na potencialização deste tipo de rejeição juntamente com as células TCD8⁺ e que a produção de IFN- γ nesse processo consiga recrutar ainda mais células T aloantígeno-específicas (Watson et al., 1995).

Nossos resultados também identificaram que houve um predomínio de células

CD16+ no compartimento glomerular nos casos de aABMR e uma associação entre essa maior expressão de CD16 no glomérulo e glomerulite. O predomínio de células CD16+ glomerulares em biópsias com rejeição aguda mediada por anticorpos portanto, DSA positivas, pode indicar o envolvimento das células NK via ADCC neste tipo de rejeição.

Células NK podem atacar suas células alvo através de citotoxicidade natural e citotoxicidade celular dependente de anticorpo. A citotoxicidade natural da célula NK foi primeiramente observada na década de 70, quando foi observado que um grupo de “linfócitos” isolados de indivíduos normais e não imunizados poderia lisar células tumorais (Robertson et al., 1991). Na citotoxicidade natural ocorre mecanismo de adesão, mediada principalmente por integrinas, entre as células NK e a célula alvo formando-se um conjugado. Na citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC), ocorre uma interação entre o receptor para a porção Fc da imunoglobulina IgG-CD16 e a respectiva imunoglobulina ligada ao antígeno localizado na célula alvo. Para ambos os tipos de citotoxicidade ocorrem alterações dinâmicas na morfologia da célula NK. Grânulos líticos com perforinas e granzimas são movidos em direção ao sítio de interação com a célula alvo, conhecido como espaço sináptico (Smyth et al., 2005).

Tuijnman e colaboradores (1992), em estudo com biópsias de transplante cardíaco, encontrou correlação significativa entre imunoexpressão positiva de CD16 nos capilares e rejeição, sugerindo uma associação entre ativação endotelial e expressão do receptor FcγRIIIa.

Um estudo que analisou em *microarray* expressão de resíduos transcricionais seletivos, encontrou evidências que associam células NK e a fração CD16a do receptor CD16 à rejeição mediada por anticorpos. Este estudo propõe um modelo de rejeição mediada por anticorpos que inclui lesão à microcirculação e reparo induzido por um reconhecimento cognato envolvendo o receptor CD16 e anticorpos, por fim, desencadeando liberação de IFN-γ e a ADCC (Venner et al., 2015).

A fração CD16a pode ser expressa em células NK e monócitos. Uma segunda fração do CD16, o CD16b, é expresso em neutrófilos e apesar de ter um domínio extracelular similar ao da fração CD16a, sabe-se que eles não são capazes de mediar as mesmas funções (Lanier et al., 1988).

Nosso estudo também acrescentou a análise da expressão do marcador CD68, conhecido pela identificação de monócitos/macrófagos. Como observado nos resultados, células CD68+ no compartimento glomerular, não foram estatisticamente significantes para o escore de glomerulite, mas foram significativamente associadas aos casos de rejeição aguda mediada por anticorpos, tal qual ocorreu com o marcador CD16, também no compartimento glomerular. O elevado número de células CD68+ no compartimento glomerular em biópsias com aABMR pode estar refletindo uma relação, já descrita na literatura, entre a presença de macrófagos/monócitos e anticorpos HLA aderidos ao endotélio (Sund et al., 2004, Magil AB. 2009).

As associações estatisticamente significantes observadas entre as células CD56+ no interstício versus glomerulite e sobrevida do enxerto assim como as relações estudadas entre a positividade dessas células no interstício e rejeição aguda mediada por células T, confrontam as associações entre células CD16+ no glomérulo versus glomerulite e rejeição aguda mediada por anticorpos. Em todas as apresentações, os resultados podem sugerir possíveis interações entre células NK, critérios de lesão na microcirculação e tipos de rejeição.

Este estudo apresentou algumas limitações relacionadas à contagem de células CD56+ nas biópsias, já que a reação imuno-histoquímica apresentou alguns casos de *background* dificultando a análise da expressão, principalmente no interstício. Outra limitação foi a escolha de apenas um marcador imuno-histoquímico exclusivo de células *Natural Killer*, o CD56, já que tanto o marcador CD57 quanto o marcador CD16 podem ser encontrados em outros grupos celulares presentes no processo inflamatório da

rejeição.

Um questionamento levantado no estudo foi a expressiva quantidade de casos com rejeição aguda mediada por anticorpos encontrados na casuística e que normalmente não são observados em outros centros de transplante. Essa observação possivelmente se deve ao fato de que houve um maior registro de pacientes sensibilizados no serviço de transplante onde o estudo foi realizado, já que este também é considerado um centro de referência no Estado.

Contudo, acreditamos que estudos adicionais reproduzindo essa metodologia e ou acrescentando outros métodos, tais como a citometria de fluxo e, utilizando outros marcadores expressos exclusivamente nas células NK, podem favorecer a comprovação ou não dessas hipotéticas interações observadas neste estudo entre células NK, tipos de rejeição aguda e escores de lesão na microcirculação. Futuros estudos nessa temática podem nos ajudar a compreender a possível aplicabilidade dessas informações no manejo do paciente transplantado renal.

7. CONCLUSÕES

A presença de células CD56+ no compartimento intersticial das biópsias foi significativamente associada com escores relacionados à injúria na microcirculação: capilarite peritubular e glomerulite, assim como, rejeição aguda mediada por células T. Ainda observamos que a positividade de células positivas para o marcador CD56 no compartimento intersticial, com valor médio de contagem menor ou igual a 0,56 células por mm^2 , associou-se com maior sobrevida do enxerto e com ausência e/ou leve capilarite peritubular. Valor médio de contagem maior que 0,56 células por mm^2 teve associação com glomerulite e perda do enxerto na curva de sobrevida.

Células CD16 positivas, no compartimento glomerular, foram associadas principalmente com rejeição aguda mediada por anticorpos e glomerulite.

8. ANEXOS

COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo das células Natural Killer (NK) em rejeições mediadas por anticorpos:
Papel das células NK nas rejeições humorais C4d negativas

Pesquisador: DENISE MARIA AVANCINI COSTA MALHEIROS

Versão: 4

CAAE: 03770112.5.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 061682/2012

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto Estudo das células Natural Killer (NK) em rejeições mediadas por anticorpos: Papel das células NK nas rejeições humorais C4d negativas que tem como pesquisador responsável DENISE MARIA AVANCINI COSTA MALHEIROS, foi recebido para análise ética no CEP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP - HCFMUSP em 13/12/2012 às 10:09.

ADDITIONAL EXTRANET 28/01/12
21

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ESTUDO DAS CÉLULAS NATURAL KILLER (NK) EM REJEIÇÕES MEDIADAS POR ANTICORPOS: PAPEL DAS CÉLULAS NK NAS REJEIÇÕES HUMORAIS C4D NEGATIVAS

Pesquisador Responsável: Denise Maria Avancini Costa **Versão:** 3

Malheiros

Pesquisador Executante: Daniela Cristina dos Santos **CAAE:** 03770112.5.0000.0068

Co-autores: Niels Olsen Saraiva Câmara, Daisa Silva Ribeiro David, William Carlos Nahas, Álvaro Pacheco e Silva Filho, Lúcio Roberto Requião Moura, Rosa Marlene Viero, Maria Fernanda Cordeiro de Carvalho

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: PATOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9367

Número do Parecer: 106.966

Data da Relatoria: 25/09/12

Apresentação do Projeto: O projeto é bem apresentado e envolve estudo retrospectivo de espécimes de biópsia de rim transplantado tomadas para o diagnóstico de processo de rejeição.

Objetivo da Pesquisa: O projeto tem como objetivos comparar a imunexpressão das células NK e macrófagos em rejeições agudas e crônicas, mediadas por anticorpos, na presença e na ausência de depósitos de C4d; avaliar a expressão das células NK e macrófagos em rejeições onde foram observados elementos morfológicos sugestivos de rejeição humoral e estabelecer relações desses resultados com a sobrevida do enxerto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos, pois se trata de estudo retrospectivo histopatológico e imuno-histoquímico em espécimes de biópsias de rim, que foram tomadas por indicação de diagnóstico de rejeição de enxerto renal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Trata-se de projeto de pesquisa bem elaborado, com casuística expressiva (50 espécimes de biópsias) e que trará embasamento para a melhor diagnose, dos mecanismos imunopatológicos e conduta terapêutica da rejeição humoral de enxertos renais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Não se aplica.

Recomendações: Foi encaminhada anuência da coparticipante UNESP - Botucatu.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Aguardamos o encaminhamento da manifestação da outra coparticipante - Hospital Albert Einstein.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Aprovado

São Paulo, 25 de Setembro de 2012

PARECER Nº 106.966/2012 - 10-09-2012-1111-000106-4

9. DESFECHOS

Desfechos da tese: duas publicações nas respectivas Revistas *Transplant International* (2016) e *Nephrology* (2016).

Todos os relatórios e prestação de contas do auxílio FAPESP foram aprovados.

Transpl Int. 2016 Apr;29(4):443-52. doi: 10.1111/tri.12726. Epub 2015 Dec 22.

Compartment-specific expression of natural killer cell markers in renal transplantation: immune profile in acute rejection.

Dos Santos DC^{1,2}, Campos EF³, Saraiva Câmara NO³, David DS², Malheiros DM².

Nephrology (Carlton). 2016 Aug 18. doi: 10.1111/nep.12897. [Epub ahead of print]

Expression patterns of CD56+ and CD16+ cells in renal transplant biopsies with acute rejection: associations with microcirculation injuries and graft survival.

Dos Santos DC^{1,2}, Saraiva Camara NO³, David DS², Malheiros DM².

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arakelov A, Lakkis FG. The alloimmune response and effector mechanisms of allograft rejection. *Semin Nephrol.* 2000; 20:95-102.
- Benichou G. Direct and Indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci.* 1999; May 15; 4:D476-80.
- Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C, Moretta A. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev.* 2001 Jun;181:203-14
- Bohmig GA, Exmer M, Habicht A, Schillinger M, Lan U, Kletzmayer J, Saemann MD, Horl 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.
- Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* (2006) 107:159–66.
- Caligiuri MA. Human Natural Killer Cells. *Blood.* 2008; 112(3): 461-469.
- Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostick E, Horton H, Roederer M, De Rosa SC. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc biol.* 2009; 85 (1):88-97.
- Chen D, Weber M, Lechler R, Dorling A. NK-cell-dependent acute xenograft rejection in the mouse heart-to-rat model. *Xenotransplantation.* 2006; 13(5):408-414.

- Choi BS, Shin MJ, Shin SJ, Kim YS, Choi YJ, Kim YS, Moon IS, Kim SY, Koh YB, Bang BK, Yang CW. Clinical significance of an early protocol biopsy in living donor renaltransplantation: ten year experience at a single center. *Am J Transplant.* 2005; 5(6):1354-1360.
- Clarkson MR, Sayegh MH. T cell costimulatory pathways in allograft rejection in tolerance. *Transplantation.* 2005; 80(5):555-563.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* 2000; 6(4):443-446.
- 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: 2208-2214.
- Colvin RB. Cellular and molecular mechanisms of allograft rejection. *Annu Rev Med.* 1990; 41:361-75.
- Colvin RB. The Renal Allograft biopsy. *Kidney Int.* 1996; 50(3):1069-82.
- Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(10):807-817.
- 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. P1347-1490.
- Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney Transplantation mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol.* 2008; 3:189-220.

- Cucchiari D, Podestà MA, Ponticelli C. The critical role of innate immunity in kidney transplantation. *Nephron*. 2016; 132(3):227-37.
- De Rosa S, Antonelli M, Ronco C. Hypothermia and kidney: a focus on ischemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2016 Apr 6. pii: gfw038. [Epub ahead of print] Review.
- Dooms H, Abbas AK. Control of CD4+T-cell memory by cytokines and costimulators. *Immunol Rev*. 2006; 211:23-28.
- Eidenschenk C, Dunne J, Jouanguy E, Fourlinnie C, Gineau I, Bacq D, Macmahon C, Smith O, Casanova JL, Abel I, Feighery C. A novel primary immunodeficiency with specific natural-killer cell deficiency maps to the centromeric region of chromosome 8. *Am. J. Hum. Genet*. 2006; 78(4):721-727.
- Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009; 9 (11):2520.
- Ellebrecht CT, Srinivas G, Bieber K, Banczyk D, Kalies K, Künzel S, Hammers CM, Baines JF, Zillikens D, Ludwig RJ, Westermann J. J Autoimmun. Skin microbiota-associated inflammation precedes autoantibody induced tissue damage in experimental epidermolysis bullosa acquisita. 2016 Apr;68:14-22. doi: 10.1016/j.jaut.2015.08.007. Epub 2015 Sep 1.
- 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): 385-393.
- Farkash EA, Colvin RB. Diagnostic challenges in chronic antibody-mediated rejection. *Nat Rev Nephrol*. 2012 Mar 27; 8(5):255-257.

- Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56 bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T-celderived IL-2: a potencial new link between adaptative and innate immunity. *Blood*. 2003; 101(8):3052-3057.
- Feucht HE, Felber E, Gokel HJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, Held E, Riethmuller G, Land W, Albert E. Vascular deposition of complemen-split products in kidney allografts with cell mediated rejection. *Clin Exp Immunol*. 1991; 86: 464-470.
- Feucht HE, Opelz G. The humoral immune response towards HLA class II determinants in renal transplantation. *Kidney Int*. 1996; 50:1464-1475.
- 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.
- George T, Yu YY, Liu J, Davenport C, Lemieux S, Stoneman E, Mathew PA, Kumar V, Bennett M. Allorecognition by murine natural killer cells lysis of T-lymphoblasts and rejection of bone-marrow grafts. *Immunol Rev*. 1997; 155:29-40.
- Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, Castro MC, David DS, David-Neto E, Bagnasco SM, Cendales LC, Cornell LD, Demetris AJ, Drachenberg CB, Farver CF, Farris AB 3rd, Gibson IW, Kraus E, Liapis H, Loupy A, Nickleit V, Randhawa P, Rodriguez ER, Rush D, Smith RN, Tan CD, Wallace WD, Mengel M; Banff meeting report writing committee. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant*. 2014 Feb; 14 (2):272-283.
- Haas M, Mirocha J. Early ultrastructural danger in renal allografts: correlation with antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Am J Transplant*. 2011; 11(10):2123-2131.

- 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.
- Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved Graft survival after renal transplantation in united states, 1988 to 1996. *N Engl J Med*. 2000; 342(9):605-612.
- Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer*. 1975; Aug15; 16(2):216-229.
- Hidalgo LG, Sellares J, Campbell PM, Mengel M, Einecke G, Chang J, Halloran PF. NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with Donor-Specific Antibodies: Evidence for NK cell involvement in Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant*. 2010; 10(8):1812-1822.
- Hidalgo LG, Sellares J, Sis B, Mengel M, Chang J, Halloran PF. Interpreting Nk cell transcripts versus T cell transcripts in renal transplant biopsies. *Am J Transplant*. 2012; 12(5):1180-1191.
- Hirohashi T, Chase CM, Della Pelle P, Sebastian D, Alessandrini A, Madsen JC, Russell PS, Colvin RB. A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. *Am J Transplant*. 2012 Feb; 12(2):313-21.
- Jabs WJ, Sedlmeyer A, Ramassar V, Hidalgo LGG, Urmson J, Afrouzian M, Zhu LF, Halloran PF. Heterogeneity in the evolution and mechanisms of the lesions of kidney allograft rejection in mice. *Am J Transplant*. 2003; 3(12):1501-1509.
- Javed I. Kazi and Muhamed Murabak (2012). Pathology of Renal Transplantation, Topics in Renal Biopsy and Pathology, Dr. Muhammed Mubarak (Ed.), ISBN: 978-953-51-0477-3.

John R, Herzenberg AM. Our approach to a renal transplant biopsy. *J Clin Pathol*. 2010; 63(1):26-37.

Karczewski M, Karczewski J, Poniedziałek B, Wiktorowicz K, Glyda M. Cytometric analysis of TH1/TH2 cytokines in the urine of patients undergoing kidney transplantation. *Ann Transplant*. 2009; 14(3):25-28.

Kazi JL, Mubarak M. Biopsy findings in renal in renal allograft dysfunction in a live related renal transplant program. *J Transplant Technol Res*. 2012; 2(1): 108.

Kim J, Chang CK, Hayden T, Liu FC, Benjamin J, Hamerman JA, Lanier LL, Kang SM. The activating immunoreceptor NKG2D and its ligands are involved in allograft transplant rejection. *J Immunol*. 2007 Nov 15; 179(10):6416-20.

Kirby JA, Forsythe JLR, Proud G, Taylor RMR. Renal allograft rejection: possible involvement of lymphokine-activated killer cells. *Immunology*. 1989; 67(1):62-67.

Kirby JA, Givan AL, Shenton BK, Talbot D, Forsythe JL, Lennard TW, Proud G, Taylor RM. Renal Allograft Rejection: Possible involvement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Transplantation*. 1990; 50(2):225-229.

Kitchens WH, Vehara S, Chase CM, Colvin RB, Russel PS, Madsen JC. The changing role of natural killer in solid organ rejection and tolerance. *Transplantation*. 2006 Mar 27; 81(6):811-17.

Kohei N, Tanaka T, Tanabe K, Masumori N, Dvorina N, Valujskikh A, Baldwin WM 3rd, Fairchild RL. Natural killer cells play a critical role in mediating inflammation and graft failure during antibody-mediated rejection of kidney allografts. *Kidney Int*. 2016 Jun;89(6):1293-306. doi: 10.1016/j.kint.2016.02.030. Epub 2016 Apr 28.

- Kreisel D, Krupnick AS, Balsara KR, Riha M, Gelman AE, Popma SH, Szeo WY, Turka LA, Rosengard BR. Mouse vascular endothelium activates CD8⁺ T lymphocytes in a B7-dependent fashion. *J Immunol.* 2002; 169:6154-6161.
- Kroemer A, Xiao X, Degauque N, Edtinger K, Wei H, Demerci G, Li XC. The innate NK cells allograft rejection and a key role for IL-15. *J Immunol.* 2008 Jun15; 180(12):7818-26.
- Kuśnierczyk P. Are Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genes Important for the Prediction of Kidney Graft Rejection? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013 Aug; 61(4):321-5.
- Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1986; 136(12):4480-4486.
- Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the leu-7 (HNK-1) and LEU-11 (NK-15) antigens. *J Immunol.* 1983; 131(4):1789-1796.
- Lanier LL, Ruitenberg JJ, Phillips JH. Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural-killer cells and granulocytes. *J Immunol.* 1988; 141: 3478–3485.
- Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips J H.: Identify of LEU-19 (CD56) leucocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med.* 1989; 169:2233-2238.
- Lanier LL. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(4):259-268.
- Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:225–74.
- Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol.* 2008; 9: 495–502.

Leibson, PJ. Signal transduction during natural-killer-cell activation: inside the mind of a killer.

Immunity. 1997; 6(6):655-61.

Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, Duong-Van-Huyen JP, Suberbielle C, Anglicheau D, et al.

Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study.

Lancet. 2013;381 (9863):313

Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.

Immunol Today. 1990; 11 (7):237-44.

Long E O. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol*.

1999; 17:875-904.

Lopez-Vergès S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, Norris PJ, Nixon

DF, Lanier LL.: CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56^{dim}CD16⁺ NK-cells subset. *Blood*. 2010; 116(19):3865-3874.

Loupy A, Hill GS, Suberbielle C et al. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA).

Am J Transplant. 2011; 11:56-65.

Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Lefaucheur C, Anglicheau D, Zuber J, Martinez F,

Thervet E, Méjean A, Charron D, Duong van Huyen JP, Bruneval P, Legendre C, Nochy D.

Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am J Transplant*. 2009; 9(11):2561-2570.

Magil AB. Monocytes/macrophages in renal allograft rejection. *Transplant Rev (Orlando)*. 2009;

23(4):199-208.

- Maier S, Tertilt C, Chambron N, Gerauer K, Huser N, Heidecke CD, et al. Inhibition of Natural Killer cells results in acceptance of cardiac allograft in CD28^{-/-} mice. *Nat Med*. 2001; 7: 557-62.
- Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Induced recruitment of NK cells to lymphnodes provides IFN-gama for T(H)1 priming. *Nat Immunol*. 2004; 5(12):1260-1265.
- Mauviyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Tolckoff-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: 779-787.
- McNerney ME, Lee KM, Zhou P, Molinero L, Mashayekhi M, Guzior D, Sattar H, Kuppireddi S, Wang CR, Kumar V, Alegre ML. Role of Natural Killer Cell subsets in cardiac allograft rejection. *Am J Transplant*. 2006; 6(3): 503-513.
- Mengel M, Reeve J, Bunnag S, Einecke G, Jhangri GS, Sis B, et al. Scoring total inflammation is superior to the current Banff inflammation score in predicting outcome and the degree of molecular disturbance in renal allografts. *Am J Transplant*. 2009; 9 (8):1859.
- Mengel M, Sis B, Haas m, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, Solez K, Cendales L, Demetris AJ, Drachenberg CB, Farver CF, Rodriguez ER, Wallace WD, Glotz D; Banff meeting report writing committee. Banff 2011 meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2012; 123:563-570.
- Miltenburg AMM, Meijer-Paape ME, Daha MR, Paul LC. Lymphokine activated killer cells lyse human renal cancer cell lines and cultured normal kidney cells. *Immunology*. 1988; 63(4):729-731.
- Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. Minireview. *Am J Transplant*. 2005; 5: 2611-2618.

- Moretta A, Boltino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:197-223.
- Moretta A, Marcenaro E, Sivori S, Della Chiesa M, Vitale M, Moretta L. Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends Immunol.* 2005; 26(12):668-675.
- Moretta A, Vitale M, Sivori S, Morelli L, Pende D, Bottino C. Inhibitory and activating receptors for HLA class I molecules in human natural killer cells. *Chem immunol.* 1996; 64:77-87.
- Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev immunol.* 1989; 7:145-173.
- Mubarak M, Kazi JL: Pathology of Renal Transplantation, Topics in renal biopsy and pathology, Dr. Muhammed Mubarak (Ed.). 2012. ISBN: 978-953-51-0477-3.
- Neudorfer C, Mueller BJ, Blume C, Daemen K, Stevanovic-Meyer M, Keil J, Lehner F, Haller H, Falk CS. The peripheral NK cell repertoire after kidney transplantation is modulated by different immunosuppressive drugs. *Front Immunol.* 2013; 28: 4:46.
- Nickeleit 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: 242-251.
- Nowak I, Magott-Procelewska M, Kowal A, Miazga M, Wagner M, Niepiekło-Miniewska W, et al. Killer immunoglobulin –like receptor (KIR) and HLA genotypes affect the outcome of allogeneic kidney transplantation. *PLoS One.* 2012; 7(9): e44718.
- Obara H, Nagasaki K, Hsieh CL, Ogura Y, Esquivel CO, Martinez OM, Krams SM. IFN- γ , produced by NK cell that infiltrate liver allografts early after transplantation, links the innate and adaptive immune response. *Am J transplant.* 2005; 5(9):2094-103.

- Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nature Rev Immunol.* 2005; 5(3): 201–214.
- Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med.* 1969; 280(14):735-739.
- Ponticelli C. The mechanisms of acute transplant rejection revisited. *J Nephrol.* 2012; 25(2):150-8.
- 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, Nickellei 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: 708-714.
- Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad as, Marcussen N, Mihatsch MJ, Nadasdy T, Nickerson P, Olsen TS, Papadimitriou JC, Randhawa PS, Rayner DC, Roberts I, Rose S, Rush D, Salinas-Madrigal L, Salomon DR, Sund S, Taskinen E, Trpkov K, & Yamaguchi Y.: The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 1999; 55(2):713-723.
- Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood.* 1990. 76(12):2421-38.
- Rocha PN, Plumb TJ, Crowley SD, Coffman TM. Effector mechanisms in transplant rejection. *Immunol Rev.* 2003; 196:51-64.
- Russel JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:323-370.

- Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueau P, Chapman S, Craciun L, Sergeant R, Brouard S, Rovis F, Jimenez E, Ballow A, Giral M, Rebollo-Mesa I, Le Moine A, Braudeau C, Hilton R, Gerstmayer B, Bourcier K, Sharif A, Krajewska M, Lord GM, Roberts I, Goldman M, Wood KJ, Newell K, Seyfert-Margolis V, Warrens AN, Janssen U, Volk HD, Soulillou JP, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010; 120(6):1848-1861.
- Scheuher C. A review of organ transplantation: heart, lung, kidney, liver and simultaneous liver-kidney. *Crit Care Nurs Q*. 2016 Jul-Sep;39(3):199-206.
- Segerer S, Heller F, Lindenmeyer MT, Schmid H, Cohen CD, Draganovici D, Mandelbaum J, Nelson PJ, Gröne HJ, Gröne EF, Figel AM, Nössner E, Schlöndorff D. Compartment specific expression of dendritic cell markers in human glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2008; 74(1):37-46.
- Serón D, Anaya F, Marcén R, Del Moral RG, Martul EV, Alarcón A, Andrés A, Burgos D, Capdevila L, Molina MG, Jiménez C, Morales JM, Oppenheimer F, Pallardó L, Fructuoso AS. Guidelines for indicating, obtaining, processing, and evaluating kidney transplant biopsies. *Nefrologia*. 2008; 28(4):385-396.
- Shin S, Kim YH, Cho YM, et al. Interpreting CD56+ and CD163+ infiltrates in early versus late renal transplant biopsies. *Am J Nephrol*. 2015; 41: (4-5):362-69
- Shresta S, MacIvor DM, Heusel JW, Russel JH, Ley TJ. Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:5679-5683.
- Sirak J, Orosz CG, Wakely E, VanBuskirk AM. Alloreactive delayed-type hypersensitivity in graft recipients: complexity of responses and divergence from acute rejection. *Transplantation*. 1997; 63:1300-1307.

- Sis B, Campbell PM, Mueller T et al. Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. *Am J Transplant.* 2007; 7:1743-1752.
- Sis B, Halloran PF. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010; 15:42-48.
- Sis B, Jhangri GS, Bunnag S et al. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant.* 2009; 9:2312-2323.
- Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, Solez K, Baldwin WM 3rd, Bracamonte ER, Broecker V, Cosio F, Demetris AJ, Drachenberg C, Einecke G, Gloor J, Glotz D, Kraus E, Legendre C, Liapis H, Mannon RB, Nankivell BJ, Nickleleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Rodriguez ER, Seron D, Seshan S, Suthanthiran M, Wasowska BA, Zachary A, Zeevi A. Banff'09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant.* 2010; 10(3): 464-471.
- Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dammelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol.* 2005. 42(4): 501-10.
- 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, Nickleleit 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: 753-760.

- Souza PS, Machado D, Aguirre ARR, David D, Barbosa E, De Paula FJ, Nahas, David-Neto, E, Castro M CR, Pontrelli P, Rascio F, Accetturo M, Castellano G, Gigante M, Fiorentino M, Zito A, Zaza G, Stallone G, Gesualdo L, Grandaliano G. Antibody mediated graft damage. *Nephrology, Dialysis, Transplantation (Print)*. 2013; v. 28, p. i70-i70.
- Sumitran-Karuppan S, Moller E. The use of magnetic beads coated with soluble HLA class I or class II proteins in antibody screening and for specificity determinations of donor-reactive antibodies. *Transplantation*. 1996; 61(10):1539-45.
- Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. *Nat Rev Immunol* .2011; 11:645–57.
- 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; 62 (2):121-30. Suthantiran M, Strom TB. Renal Transplantation. *N Engl J Med*. 1994; 331(6): 365-376.
- 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):1033-1041.
- Tinckam KJ, Djurdjev O, Magil AB. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute allograft rejection independent of C4d status. *Kidney Int*. 2005; 68(4): 1866-1874.
- Tizard IR. *Imunologia Veterinária*/Ian R. Tizard; tradução Luciana Medina, Matheus D. Lechese. 9º edição. Rio de Janeiro: Elsevier. 2014: cap 19.
- Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody. Analysis using the Banff grading schema. *Transplantation*. 1996; 61 (11):1586-1592.

- Tuijnman WB, Wijngaard PL, Van Wichen D, Van De Winkel JG, Capel PJ, Schuurman HJ. Presence of CD16 on endothelial cells in heart transplant rejection: an immunohistochemical study. *Scand J Immunol*. 1992; 35(5):569-73.
- Vampa ML, Norman PJ, Burnapp L, Vaughan RW, Sacks SH, Wong W. Natural killer-cell activity after human renal transplantation in relation to killer immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen mismatch. *Transplantation*. 2003; 76(8):1220-8.
- Venner JM, Hidalgo LG, Famulski KS, Chang J, Halloran PF. The molecular landscape of antibody-mediated kidney transplant rejection: evidence for NK involvement through CD16a Fc receptors. *Am J Transplant*. 2015; 15(5):1336-48.
- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Uggolini S. Innate or adaptive immunity? The example of Natural Killer Cells. *Science*. 2011; 331(6013): 44-49.
- Walzer T, Dalod M, Robins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood*. 2005; 106(7): 2252-2258.
- Watson CA, Petzelbauer P, Zhou J, Pardi R, Bender JR. Contact-dependent endothelial class II HLA gene activation induced by NK cells is mediated by IFN-gamma-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol*. 1995; 154 (7):3222-33.
- Wu K, Budde K, LU H, Schimdt D, Liefeldt L, Glander P, Neumayer HH, Rudolph B. The severity of acute cellular rejection defined by Banff classification is associated with kidney allograft outcome. *Transplantation*. 2014; 97 (11):1146-1154.

- Yamanaka K, , Kakuta Y, Miyagawa S, Nakazawa S, Kato T, Abe T, Imamura R, Okumi M, Maeda A, Okuyama H, Mizuno M, Nonomura N. Depression of complement regulatory factors in rat and human renal grafts is associated with the progress of acute T-cell mediated rejection. *Plos One*. 2016; 11(2): e0148881. doi: 10.1371/journal.pone.0148881. eCollection 2016.
- Yin D, Zeng H, Ma L, Shen J, Xu H, Byrne GW, Chong AS. Cutting Edge: NK cells mediate IgG1-dependent hyperacute rejection of xenografts. *J Immunol*. 2004; 172(12): 7235-7238.
- Zhang QW, Kish DD, Fairchild RL. Absence of allograft ICAM-1 attenuates alloantigen-specific T cell priming, but not primed T cell trafficking into the graft, to mediate acute rejection. *J Immunol*. 2003; 170:5530-37.
- Zhang X, Reed EF. Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant*. 2009; 9:2459-2465.
- Zhang ZX, Wang S, Huang X, Min WP, Sun H, Liu W, Garcia B, Jevnikar AM. NK cells induce apoptosis in tubular epithelial cells and contribute to renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol*. 2008; 181(11):7489-98.
- Zhang ZX, Shek K, Wang S, Huang X, Lau A, Yin Z, Sun H, Liu W, Garcia B, Ritting S, Jevnikar AM. Osteopontin expressed in tubular epithelial cells regulates NK cell-mediated kidney ischemia reperfusion injury. *J Immunol*. 2010; 185 (2):967-733.
- Zhang ZX, Huang X, Jiang J, Lau A, Yin Z, Liu W, Haig A, Jevnikar AM. Natural killer cells mediate long-term kidney allograft injury. *Transplantation*. 2015; 99(5):916-24.
- 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):1069-1077.