

## SEMNIFICAȚIA C3d ÎN EVALUAREA BIOPSIEI GREFEI RENALE ÎN PERIOADA ÎNȚIALĂ POSTTRANSPLANT

IACOB GHEORGHITĂ<sup>1</sup>, MIHAI LUCAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamentul de Anatomie patologică

<sup>2</sup>Departamentul de Transplant Renal

Institutul Clinic de Urologie și Transplant Renal, Cluj-Napoca

### Rezumat

**Introducere.** Demonstrarea C4d în capilarele peritubulare nu este sinonimă cu rețetul acut umoral. Evaluarea C3d a fost creditată a aduce informații prognostice relevante.

**Obiectiv.** Analiza expresiei C3d și C4d în biopsia renală pentru disfuncție de grefă și a corelației cu rețetul mediat de anticorpi.

**Material și metodă.** Au fost evaluate 74 biopsii de grefă renală, din perioada ianuarie 2006 - decembrie 2012. Biopsiile pacienților cu rețet acut umoral (Gr. A.) și ale celor cu necroză tubulară acută (Gr. B.) au fost comparate din punct de vedere al expresiei C4d și C3d.

**Rezultate.** Marcajul endotelial al C3d este corelat înalt semnificativ statistic ( $p=0,0001$ ) cu marcajul C4d. Valoarea test a C3d pentru rețetul acut umoral are sensibilitate de 89,47% și specificitate de 69,09%. C3d se corelează cu prezența marginației de polimorfonucleare neutrofile și a trombozei la nivelul capilarelor peritubulare. C3d epitelial se corelează cu prezența necrozei tubulare acute.

**Concluzie.** Determinarea imunohistochimică a C3d în biopsia renală este un adjuvant important în setul de colorații utilizate pentru evaluarea biopsiei renale de transplant. Depunerea C3d în capilarele peritubulare se corelează cu prezența rețetului umoral acut, în timp ce expresia la nivelul epiteliilor tubulare se corelează cu leziunile tubulare ischemice.

**Cuvinte cheie:** biopsie grefă renală, rețet acut umoral, necroză tubulară acută, C4d, C3d.

## SIGNIFICANCE OF C3d IN THE ASSESSMENT OF THE RENAL GRAFT BIOPSY IN THE INITIAL POST TRANSPLANT PERIOD

### Abstract

**Introduction.** Demonstration of C4d deposition in peritubular capillaries is not synonymous with acute humoral rejection. Evaluation of C3d was credited to bring relevant prognostic information.

**Objective.** To analyze the C3d and C4d expression in renal biopsy for graft dysfunction and correlation with antibody mediated rejection.

**Materials and methods.** We evaluated 74 renal graft biopsies in the period: January 2006-December 2012. Biopsies of patients with acute humoral rejection (Gr. A.) and those with acute tubular necrosis (Gr. B.) were compared in terms of expression of C4d and C3d.

**Results.** Endothelial deposition of C3d was in highly significant statistic correlation ( $p=0.0001$ ) with C4d deposition. The C3d test for humoral acute rejection has 89.47% sensitivity and 69.09% specificity. C3d correlated with the presence of polymorphonuclear neutrophils and thrombosis in the peritubular capillaries. Epithelial C3d correlated with the presence of acute tubular necrosis.

**Conclusion.** Immunohistochemical assessment of C3d in renal biopsy is an

*important ancillary test in the panel used to assess transplant renal biopsy. C3d deposition in peritubular capillaries correlates with the presence of acute humoral rejection while expression in the tubular epithelium correlates with the tubular ischemic lesions.*

**Keywords:** renal graft biopsy, acute humoral rejection, acute tubular necrosis, C4d, C3d.

## INTRODUCERE

Principalul risc de pierdere a grefei renale este cel imunologic, iar în cadrul acestuia cea mai dramatică evoluție este întâlnită în cazul rejetului acut mediat de anticorpi [1]. Diagnosticul precoce și tratamentul de epurare a anticorpilor preformați permit salvarea grefei [2].

Diagnosticul rejetului mediat de anticorpi este realizat în baza demonstrării prezenței anticorpilor anti-donor specifici, a acțiunii acestora asupra grefei și a consecințelor funcționale [3].

Demonstrarea activării specifice a complementului necesită evidențierea fracțiilor complementului C1 sau C4. În practică, este larg utilizată demonstrarea depunerii endoteliale a C4d, un produs de metabolism al C4b fixat covalent tisular, cunoscută fiind corelația acestuia cu disfuncția de grefă prin anticorpi anti-donor specifici [4]. Studiile concordante realizate au condus la includerea marcatului pozitiv pentru C4d în capilarele peritubulare, între criteriile de diagnostic ale rejetului acut umoral și au permis definirea rejetului cronic mediat de anticorpi [3].

Dacă, în cazul grefelor cu disfuncție, prezența C4d endotelial în capilarele peritubulare este asociată cu o evoluție defavorabilă a grefei, prezența izolată a C4d în capilarele peritubulare are o semnificație discutabilă, așa cum a fost relevat de biopsiile realizate pe bază de protocol [5-7].

Studiile recente sugerează că activarea complementului este doar o etapă în procesul imunologic al rejetului mediat de anticorpi și că formarea complexului de atac membranar sau a receptorului antigenic pentru chemokine (DARC) sunt etape importante în producerea modificărilor morfopatologice [8].

Semnificația detecției endoteliale a altor fracții ale complementului, cum ar fi fracții ale C3, este subiect de discuție, dar detecția acestora în epiteliile tubulare renale are relevanță pentru disfuncția tubulară renală [9] care poate fi asociată rejetului.

## OBIECTIV

Analiza expresiei C3d și C4d în biopsia renală pentru disfuncție de grefă și a corelației cu rejetul mediat de anticorpi.

## MATERIAL ȘI METODĂ

### Indicația biopsiei renale

În perioada primelor 3 luni posttransplant, biopsia renală a fost indicată la pacienții cu non-funcție primară de grefă cu durată de 3 săptămâni, în absența cauzelor vasculare sau urologice, la pacienții cu diureză reluată dar fără evoluție spre normalizare a funcției renale sau la pacienții cu alterarea probelor de funcție renală după o perioadă inițială de evoluție favorabilă. La acești pacienți a fost exclusă, în prealabil, existența unor cauze vasculare, urologice sau de toxicitate la introducerea inhibitorilor de calcineurină.

### Evaluarea histopatologică

Diagnosticul morfologic a fost realizat în concordanță cu clasificarea Banff 07 de evaluare a biopsiei grefei renale [3].

Conform protocoalelor proprii, au fost prelevate două sau trei fragmente bioptice ale grefei renale în raport cu evaluarea microscopică *in situ* a prezenței și numărului de glomeruli. Toate fragmentele au fost procesate la parafină cu realizarea de secțiuni de 3 μm, colorate HE, PAS, TM, AgMet și imunohistochimic.

Aspectele morfologice pentru rejetul acut mediat de anticorpi au fost: aspectele de necroză tubulară acută, marginația de neutrofile în capilarele peritubulare, dilatarea capilarelor peritubulare, tromboza în capilarele peritubulare, glomerulita și necroza fibrinoidă vasculară. În absența modificărilor vasculare sau inflamatorii, leziunile au fost considerate, mai probabil, corespunzătoare necrozei tubulare acute. Diagnosticul diferențial a inclus microangiopatia trombotică sau sindromul hemolitic uremic, necroza tubulară acută, toxicitatea la medicația imunosupresoare, infecțiile bacteriene, virale sau fungice.

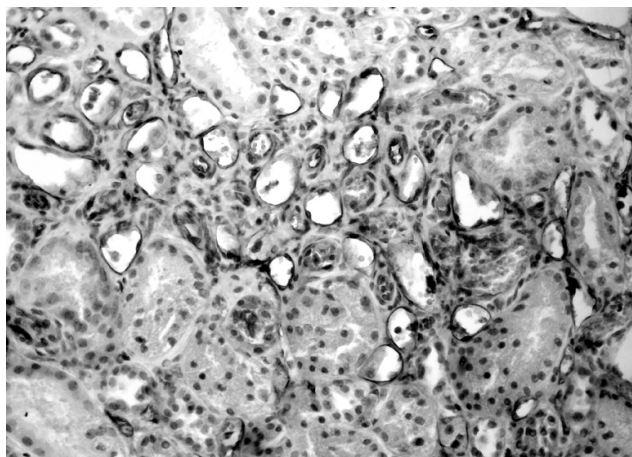
### Evaluarea imunohistochimică

Protocolul de imunohistochimie a inclus determinarea C4d, C3d. Demascarea a fost realizată la pH 6 (Vector, Nr.Cat. H-3300) pentru C4d, C3d. Au fost folosiți anticorpi policlonali de iepure de la Abcam pentru C4d (ab36075) și C3d (ab15981). Demonstrarea imunomarcajului a fost realizată folosind sistemul HRP polimer EnVision TM + Dual Link System-HRP.

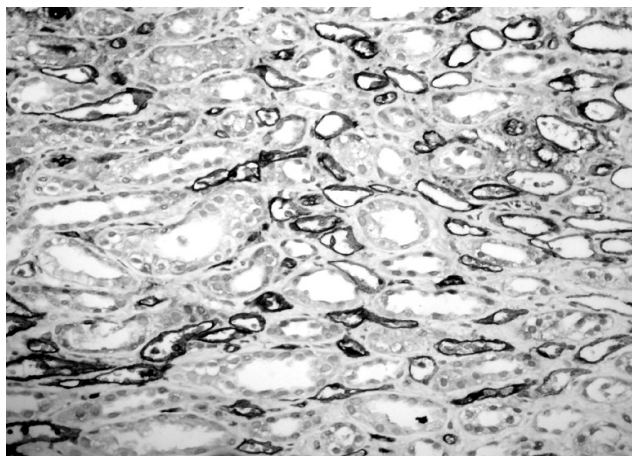
Evaluarea imunomarcajului a fost realizată pe ariile bioptice non-fibrotice, cu tubi renali non-atrofici. Marcatul pozitiv pentru rejetul mediat de anticorpi a fost considerat depunerea liniară, intensă la nivelul endoteliilor capilarelor peritubulare sau glomerulare.

Gradarea imunomarcajului a fost realizată în concordanță cu clasificarea Banff 07 [3] (tabel I). Colorația

C4d a fost considerată pozitivă dacă imunomarcajul a fost pozitiv în peste 10% din capilarele peritubulare. Interpretarea imunomarcajului C3d a fost realizată în manieră similară (Fig. 2, Tabel II). Gradarea capilaritei peritubulare, a glomerulitei, au fost realizate în acord cu clasificarea Banff 07 [3].



**Fig. 1.** Imunomarcaj liniar, intens, difuz, pentru C4d la nivelul capilarelor peritubulare, concordant cu diagnosticul de rejet acut mediat de anticorpi.



**Fig. 2.** Imunomarcaj liniar, intens, difuz, pentru C3d la nivelul capilarelor peritubulare.

**Tabel I.** Gradarea imunomarcajului pentru C4d.

Scorul colorației C4d	Descriere
0 - negativ	sub 10 capilare peritubulare afectate
1 - minim	afectarea a sub 10% din capilarele peritubulare corticale
2 - focal	afectarea a 10%-50% din capilarele peritubulare corticale
3 - difuz	afectarea a peste 50% din capilarele peritubulare corticale

**Tabel II.** Gradarea imunomarcajului pentru C3d.

Scorul colorației C3d	Descriere
0 - negativ	sub 10 capilare peritubulare afectate
1 - minim	afectarea a sub 10% din capilarele peritubulare corticale
2 - focal	afectarea a 10%-50% din capilarele peritubulare corticale
3 - difuz	afectarea a peste 50% din capilarele peritubulare corticale

### Cazuistică

Au fost reevaluate 74 de biopsii de grefă renală realizate în perioada ianuarie 2006 - decembrie 2010, indicate pentru non-funcție primară de grefă, disfuncție precoce de grefă sau funcție renală inefficientă, în primele 3 luni de la transplant.

### Metodologie

Biopsiile au fost grupate în funcție de prezența sau absența rejetului umoral acut: Gr. A. - biopsii ale pacienților cu rejet acut mediat de anticorpi și Gr. B. - biopsii ale pacienților cu necroză tubulară acută sau microangiopatie trombotică de altă cauză. Cele două loturi au fost comparate în funcție de tipul de donator, gradarea imunomarcajului pentru C4d, C3d, prezența trombilor în capilare, a capilaritei peritubulare, a glomerulitei, a necrozei fibrinoide vasculare și a marcajului C3d la nivelul tubilor renali corticali. De asemenea, a fost evaluată valoarea test a marcajului C3d și C4d pentru rejetul acut mediat de anticorpi versus necroza tubulară acută. Analiza statistică a fost realizată folosind aplicația Epi Info 7.

### REZULTATE

Rezultatele comparative în funcție de prezența sau absența rejetului acut mediat de anticorpi sunt prezentate în tabelul III. Prezența rejetului acut mediat de anticorpi este mai frecventă la pacienții care au primit grefă de la donator viu, se corelează cu prezența depunerii C3d la nivelul capilarelor peritubulare, cu prezența capilaritei peritubulare, a glomerulitei și a trombozelor capilare peritubulare sau glomerulare. În schimb, marcajul pozitiv pentru C3d la nivelul epiteliului tubular este corelat cu prezența necrozei tubulare acute (Tabel III). Toate corelațiile sunt semnificative statistic.

Marcajul C3d este corelat înalt semnificativ statistic ( $p=0,0001$ ) cu marcajul C4d, ambele determinate prin metoda imunohistochimică (Tabel IV).

Valoarea test a imunomarcajului pentru C3d este prezentată în tabelul V. Determinarea depunerii endoteliale a C3d pentru diagnosticul rejetului acut mediat de anticorpi are sensibilitate de 89,47% și specificitate de 69,09%. Valoarea predictivă pozitivă a fost de 50,00%, în timp ce valoarea predictivă negativă a fost 95,00%.

Corelarea C3d cu capilarita și trombozele capilarelor peritubulare este prezentată în tabelul VI. Pozitivitatea

**Tabel III.** Rezultatele comparative în funcție de prezența sau absența rejetului acut mediat de anticorpi.

	Gr.A.		Gr.B.		p
	N	% (CI)	N	%	
Grefă de la donator decedat	7	36,84% (16,29%-61,64%)	51	92,73% (82,41%-97,98)	< 0,001
Marcaj C4d pozitiv în capilare peritubulare (C4d2, C4d3)	18	97,74% (73,97%-99,87%)	0	0%	< 0,001
Marcaj C3d pozitiv în capilare peritubulare (C3d2, C3d3)	17	89,47% (66,86%-98,70%)	17	30,91% (19,14%-44,81%)	< 0,001
Expresie C3d la nivelul epiteliului tubular proximal	5	26,32% (9,15%-51,20%)	55	100% (100,00%-100,00%)	< 0,001
Capilarită peritubulară prezentă	14	73,68% (48,80%-90,85%)	20	36,36% (23,81%-50,44%)	0,01
Glomerulită prezentă	12	63,16% (38,36%-83,71%)	10	18,18% (9,08%-30,90%)	< 0,001
Tromboze în capilare	7	36,84% (16,29%-61,64%)	4	7,24% (2,02%-17,59%)	0,005
<b>Total</b>	19		55		

CI - Interval de confidență, p - probabilitatea statistică a ipotezei nule.

pentru C3d se corelează cu prezența marginației de polimorfonucleare neutrofile în capilarele peritubulare și a trombozelor în capilarele peritubulare, similar cu datele observate la expresia C4d. Aceste asocieri sunt semnificative statistic. Analiza comparativă față de C4d demonstrează o corelație mai mică a C4d cu inflamația în capilarele peritubulare, comparativ cu C3d (Tabel VII).

**Tabel IV.** Tabelul de corelare al expresiei C3d cu cea a C4d. Valoarea  $\chi^2 = 34,1704$ ,  $p=0,0001$ , înalt semnificativ statistic.

	C4d0	C4d1	C4d2	C4d3	Total
C3d0	35 (71,83%)	3 (42,86%)	0	0	38
C3d1	0	0	1 (12,50%)	1 (10,00%)	2
C3d2	10 (20,41%)	3 (42,86%)	3 (37,50%)	4 (40,00%)	20
C3d3	4 (8,16%)	1 (14,29%)	4 (50,00%)	5 (50,00%)	14
<b>Total</b>	49	7	8	10	74

**Tabel V.** Tabelul de corelare a C3d cu prezența rejetului acut mediat de anticorpi. Marcajul a fost considerat pozitiv în cazul prezenței la peste 10% din tubii renali.

	Gr. A.	Gr. B.	Total
C3d pozitiv	17	17	34
C3d negativ	2	38	40
<b>Total</b>	19	55	74

**Tabel VI.** Corelația între imunomarcajul C3d pozitiv (C3d2, C3d3) și prezența capilaritei peritubulare în tubii renali proximali, a glomerulitei și a trombozei capilare.

	C3d pozitiv		C3d negativ		p
	N	% (CI)	N	%	
Capilarită peritubulară prezentă	22	64,71% (46,49%-80,25%)	12	30,00% (16,56%-46,53%)	0,006
Tromboze în capilare	10	29,41% (15,10%-47,48%)	1	2,50% (0,06%-13,16%)	0,003
<b>Total</b>	34		40		

**Tabel VII.** Corelația între imunomarcajul C4d pozitiv (C4d2, C4d3) și prezența capilaritei peritubulare în tubii renali proximali, a glomerulitei și a trombozei capilare.

	C4d pozitiv		C4d negativ		p
	N	% (CI)	N	%	
Capilarită peritubulară prezentă	13	72,22% (46,52%-90,31%)	21	37,50% (24,92%-51,45%)	0,021
Tromboze în capilare	7	38,89% (17,30%-64,25%)	4	7,14% (1,98%-17,25%)	0,004
<b>Total</b>	34		40		

## DISCUȚII

În prezent, diagnosticul rejetului greței renale este eminent realizat prin evaluarea histopatologică a fragmentelor renale prelevate biptic, iar această situație nu s-a schimbat în ciuda progreselor realizate de tehnicile de laborator [10]. Chiar dacă diagnosticul rejetului mediat de anticorpi continuă să fie subiect de discuții [11,12], clasificarea Banff 07 include un set de criterii histopatologice pentru diagnosticul acestuia, un rol central jucându-l demonstrarea depunerii endoteliale difuze a C4d [3].

Semnificația depunerii liniare endoteliale la nivelul capilarelor peritubulare a C4d trebuie realizată în contextul general al activării complementului. Dintre cele trei căi de activare a complementului, activarea prin reacția specifică antigen anticorp este cea care va conduce la activarea C1, ai cărui produși de clivare vor activa C4, cu producerea C4b, care va fi degradat la C4d, compus care se va lega covalent de țesuturi. Dacă ideală este demonstrarea fixării endoteliale a anticorpilor IgG specifici, în practică această fixare este pasageră și dificil de demonstrat, cu atât mai mult a naturii imunoglobulinelor. C4d are o latență mult mai mare la nivelul țesuturilor, fiind un indicator important al producerii unei reacții specifice antigen-anticorp [13,14].

Deși asocierea depunerii difuze a C4d la nivelul endoteliilor și rejetul mediat de anticorpi a fost motivul noii

clasificări Banff, biopsiile de protocol și biopsiile grefelor în cazul transplantelor transgrup au demonstrat că expresia C4d nu este singură suficientă pentru diagnosticul rejetului [6,15].

Pentru producerea efectelor tisulare, este necesară formarea C5b-9 sau a complexului de atac membranar. Din aceste considerente, s-a studiat valoarea demonstrării activării căii comune a complementului în rejetul mediat de anticorpi. C3d a fost demonstrat în capilarele peritubulare la 39-60% din biopsiile la care C4d a fost difuz pozitiv [16]. Corelația diferă, fiind întâlnite cazuri cu C3d pozitiv - C4d negativ, probabil ca o consecință a activării complementului pe calea lectinică [17].

Spre deosebire de rejetul acut mediat de anticorpi, prezența suferinței tubulare din rejetul celular, necroza tubulară acută sau atrofia tubulară, C3 este pozitiv fie la nivelul membranelor bazale tubulare, fie al epiteliilor tubulare, în ambele situații originea acestuia fiind celula tubulară renală [18].

În studiul nostru, pozitivitatea C3d în capilarele peritubulare se corelează înalt semnificativ statistic cu prezența rejetului umoral acut și cu pozitivitatea C4d. Ca factor de prognostic defavorabil, pozitivitatea C3d este asociată cu prezența neutrofilelor în capilarele peritubulare și cu prezența trombilor. Diferențele sunt înalt semnificative statistic, corelat cu cauzele de disfuncție de grefă.

Un aspect particular observat a fost acela al expresiei C3d la nivelul epiteliului tubilor renali, corelat cu prezența aspectelor de necroză tubulară acută și mai puțin cu rejetul acut mediat de anticorpi. Corelația a fost înalt semnificativă statistic.

Corelația inflamației în capilarele peritubulare a fost mult mai intensă în cazul C3d, comparativ cu C4d, aspect care susține valoarea de factor prognostic defavorabil al colorației C3d.

## CONCLUZIE

Determinarea imunohistochimică a C3d în biopsia renală este un adjuvant important în setul de colorații utilizate pentru evaluarea biopsiei renale de transplant. Depunerea C3d în capilarele peritubulare se corelează cu prezența rejetului umoral acut, în timp ce expresia la nivelul epiteliilor tubulare se corelează cu leziunile tubulare ischemice.

## Bibliografie

1. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation*, 2000; 69(3):319-326.

2. Böhmig GA, Regele H, Exner M, et al. C4d-positive acute humoral renal allograft rejection: effective treatment by immunoadsorption. *J Am Soc Nephrol*, 2001; 12(11):2482-2489.
3. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*, 2008; 8(4):753-760.
4. Regele H, Exner M, Watschinger B, et al. Endothelial C4d deposition is associated with inferior kidney allograft outcome independently of cellular rejection. *Nephrol Dial Transplant*, 2001; 16(10):2058-2066.
5. Henderson LK, Nankivell BJ, Chapman JR. Surveillance protocol kidney transplant biopsies: their evolving role in clinical practice. *Am J Transplant*, 2011; 11(8):1570-1575.
6. Ushigome H, Okamoto M, Koshino K, et al. Findings of graft biopsy specimens within 90 days after ABO blood group incompatible living donor kidney transplantation compared with ABO-identical and non-identical transplantation. *Clin Transplant*, 2010; 24 Suppl 22:16-21.
7. Seemayer CA, Gaspert A, Nicleleit V, et al. C4d staining of renal allograft biopsies: a comparative analysis of different staining techniques. *Nephrol Dial Transplant*, 2007; 22(2):568-576.
8. Segerer S, Böhmig GA, Exner M, et al. When renal allografts turn DARC. *Transplantation*, 2003; 75(7):1030-1034.
9. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol*, 2007; 18(4):1046-1056.
10. Finkelstein FO, Siegel NJ, Bastl C, et al. Kidney transplant biopsies in the diagnosis and management of acute rejection reactions. *Kidney Int*, 1976; 10(2):171-178.
11. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant*, 2003; 3(6):708-714.
12. Platt JL. C4d and the fate of organ allografts. *J Am Soc Nephrol*, 2002; 13(9):2417-2419.
13. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*, 2001; 344(14):1058-1066.
14. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med*, 2001; 344(15):1140-1144.
15. 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(1):56-65.
16. Haas M, Rahman MH, Racusen LC, et al. C4d and C3d staining in biopsies of ABO- and HLA-incompatible renal allografts: correlation with histologic findings. *Am J Transplant*, 2006; 6(8):1829-1840.
17. Kuypers DR, Lerut E, Evenepoel P, et al. C3D deposition in peritubular capillaries indicates a variant of acute renal allograft rejection characterized by a worse clinical outcome. *Transplantation*, 2003; 76(1):102-108.
18. Varagunam M, Yaqoob MM, Döhler B, et al. C3 polymorphisms and allograft outcome in renal transplantation. *N Engl J Med*, 2009; 360(9):874-880.