

Estudo da apoptose na transplantação renal

Rui Alves^{1,4}, Maria F. Xavier da Cunha², Jorge Pratas⁴, Pedro Pessa²,
Alfredo Mota³, Mário Campos⁴

¹Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, ²Serviço de Anatomia Patológica, ³Unidade de Transplantação Renal, ⁴Serviço de Nefrologia. Hospitais da Universidade de Coimbra. COIMBRA.

RESUMO

A apoptose ou morte celular programada é um fenómeno da biologia celular implicado em mecanismos centrais da transplantação como a citotoxicidade, a regulação imune e a isquémia-reperfusão. O objectivo deste estudo consistiu em avaliar e interpretar a expressão de proteínas reguladoras da apoptose no transplante renal. Com este objectivo foram seleccionadas três grupos de biopsias de rim transplantado com o diagnóstico histopatológico de

necrose tubular aguda, rejeição aguda e de nefropatia crónica do transplante. Foi aplicada a técnica histoquímica das imunoperoxidasas (streptavidina-biotina/HRP) utilizando anticorpos das moléculas pró-apoptóticas Fas, FasL e caspase 3, e da molécula anti-apoptótica BclxL, tendo sido efectuada uma avaliação semi-quantitativa e comparativa da expressão daqueles marcadores nos glomérulos, túbulos, vasos e células intersticiais. Nos resultados das observações salienta-se: a neo-expressão de Fas nas células tubulares nos casos de necrose tubular aguda e de nefropatia crónica do transplante, sugerindo a importância da isquémia na activação daquele receptor; a neo-expressão do complexo FasL/Fas e de caspase 3 ao nível das células tubulares e intersticiais salientando a sua intervenção na rejeição aguda; a expres-

Recebido em: 30/06/2003
Aceite em: 19/01/2004

são de BclxL ao nível das células tubulares remanescentes de todos os grupos, traduzindo uma forma de defesa imanente destas células. A apoptose revela-se como um mecanismo regulador da vida celular, ora benéfico se promove a redução de células tóxicas ou disfuncionais como na necrose tubular aguda e na rejeição aguda, ora nocivo, se conduz à perda funcional do tecido e à sua progressiva substituição por colagénio como na nefropatia crónica do transplante.

Palavras-chave: apoptose, BclxL, caspase 3, Fas/FasL, transplante renal.

SUMMARY

Apoptosis in renal transplantation

Apoptosis or programmed cellular death is a cellular biology phenomenon implied in central mechanisms of transplantation such as the cytotoxicity, the immune regulation and the ischaemia-reperfusion. The aim of this study consisted of evaluating and interpreting the expression of protein regulating apoptosis in the renal transplant. With this objective three groups of kidney transplant biopsies with the histopathological diagnosis of acute tubular necrosis, acute rejection and transplant chronic nephropathy were selected. The immunohistochemistry technique with immunoperoxidases was applied (streptavidina-biotina/HRP method) using antibodies of the pro-apoptotic molecules Fas, FasL and caspase 3, and anti-apoptotic molecule BclxL. A semiquantitative and comparative evaluation of the expression of those markers was made in the glomerula, tubules, vessels and interstitial cells. In the results we underline: the neo-expression of Fas in the tubular cells in the cases of acute tubular necrosis and chronic transplant

nephropathy, suggesting the importance of ischaemia in the activation of that receptor; the neo-expression of the FasL/Fas complex and caspase 3 in tubular and interstitial cells pointing out its intervention in the acute rejection; the expression of BclxL in the remaining tubular cells of all the groups, suggesting a protective mechanism of these cells against apoptosis. Apoptosis shows as a regulating mechanism of the cellular behaviour, beneficial if it promotes the reduction of toxic or dysfunctional cells as in the acute necrosis tubular and the acute rejection, or harmful, if it leads to the functional loss of the tissue and to its gradual substitution by collagen as in the chronic transplant nephropathy.

Key-words: apoptosis, BclxL, caspase 3, Fas/FasL, kidney transplant.

INTRODUÇÃO

As novas tecnologias da biologia molecular aplicadas à investigação na área da transplantação, tanto em modelos experimentais como no ser humano, têm vindo a permitir o conhecimento cada vez mais aprofundado de muitas das alterações e transformações celulares e moleculares existentes no órgão transplantado.

A par dos avanços nos conhecimentos da imunobiologia do transplante renal, não param de continuar a surgir novas questões, novos desafios, a propósito da interpretação do complexo processo de alterações celulares e da matriz extracelular que caracterizam tanto o fenómeno “explosivo” e mais ou menos exteriorizado da disfunção aguda, bem como, da destruição lenta mas progressiva do tecido renal que caracteriza a nefropatia crónica do transplante.

A compreensão da delicada interligação daqueles fenómenos fisiopatológicos continuará certamente a aliciar os investigadores nos anos vindouros e sempre com o mesmo fascinante objectivo do século passado - a preservação do órgão transplantado.

Quando se observa um corte histológico do rim transplantado é muitas vezes difícil fazer a sua caracterização morfológica e interpretar as alterações encontradas à luz de conceitos “absolutos” de sofrimento agudo ou de sofrimento crónico. Em boa verdade, sabe-se que no momento exacto em que se terminam cirurgicamente as anastomoses vasculares do enxerto é invariavelmente accionado um “gatilho” que faz disparar uma interminável cascata de fantásticos acontecimentos biológicos cuja expressão e interpretação em intensidade e em extensão é, ainda hoje, muitas vezes dificilmente perceptível. Uma vez posta em marcha, sabe-se que esta sequência multifactorial de fenómenos com ponto de partida imunológico, não tem sempre as mesmas consequências para todos os receptores, e o seu significado ultrapassa a diversidade dos fenómenos de incompatibilidade do sistema HLA.

Estaremos pois perante questões que dizem respeito, na sua essência, ao potencial das células poderem ou não reagir aos estímulos externos e que poderão resultar na sobrevivência ou no seu desaparecimento. O significado desta asserção tem muito em comum com os mecanismos que regem o ciclo de vida das células, designadamente, no equilíbrio entre os processos de renovação/regeneração e destruição do material genético, e portanto, até com o próprio fenómeno da senescência celular (papel das telomerasas)^{1,2}. Existirá pois, e também teleologicamente radicada no genoma, uma capacidade pré-determinada para reagir às adversidades ambientais e que influencia o comportamento celular?

Ao abordar os temas da disfunção aguda do enxerto, nas suas vertentes de necrose tubular e de rejeição aguda, e da nefropatia crónica do transplante com a sua etiologia multifactorial, ressalta um elemento comum, a apoptose ou morte celular programada, e dos potenciais mecanismos implicados no seu processamento². O rim transplantado reúne neste domínio condições excepcionais para o estudo deste fenómeno, que tanto pode interferir como elemento nocivo se afectar células nobres, ou benéfico e regulador fisiológico, se porventura actuar destruindo células disfuncionais^{3,4}. Ora este balanço biológico parece estar patente, embora com tradução diversa, tanto no rim afectado por um sofrimento agudo, como no rim afectado pela patologia multifactorial que caracteriza o sofrimento crónico⁴.

A susceptibilidade de uma célula à apoptose é influenciada pelo ambiente extracelular e pela expressão e actividade de proteínas intracelulares que são reguladoras do fenómeno apoptótico⁵. As “famílias” de proteínas reguladoras da apoptose incluem os receptores de morte celular (sensores para estímulos letais) como a citocina FasL que interage com o receptor Fas (complexo FasL/Fas)⁶⁻⁹. As proteínas Bcl2, compreendendo membros pró-apoptóticos (Bax) e anti-apoptóticos como a BclxL, e as caspases como caspase 3, que são moléculas efectoras intracelulares da apoptose¹⁰⁻¹².

No presente trabalho procurámos contribuir para a compreensão do fenómeno apoptótico no rim transplantado, através de uma metodologia que não encontramos publicada até ao momento. Esta forma de abordar o tema permitiu-nos fazer algumas reflexões que traduzem a nossa visão pessoal sobre o assunto.

OBJECTIVOS

Os objectivos desta investigação consistiram em avaliar a importância e o significado do fenómeno apoptótico no transplante renal, mostrando as alterações histomorfológicas típicas de necrose tubular aguda, de rejeição aguda e da nefropatia crónica do transplante.

Com base nos referidos quadros anatómo-clínicos procedeu-se à investigação tentando dar resposta às seguintes questões:

1- Identificar as células neo-expressando moléculas envolvidas na actividade celular pró-apoptótica (Fas, FasL e caspase 3) e anti-apoptótica (Bclxl).

2- Qual a eventual relação entre a neo-expressão daquelas moléculas e as alterações estruturais encontradas no tecido renal ?

3- Interpretar o papel dos fenómenos pró-apoptótico e anti-apoptótico no contexto das alterações agudas e crónicas do transplante renal.

INDIVÍDUOS E MÉTODOS

I - Disfunção aguda do transplante

Nesta parte da investigação foram analisadas as biópsias de vinte rins transplantados (com número de glomérulos igual ou superior a 10), realizadas entre a 1ª e a 3ª semana após a transplantação e divididas em dois grupos representativos de cada diagnóstico histopatológico (Grupo A - necrose tubular aguda - 10 casos; e Grupo B - rejeição aguda, Tipo Ia segundo os critérios de Banff - 10 casos)¹³. A biópsia foi motivada por disfunção primária do enxerto no Grupo A, e o agravamento da função ou disfunção secundária no Grupo B. À data da sua realização e nos casos de necrose tubular

aguda, a creatinina sérica variou entre 2,5 mg/dl e 3,6 mg/dl ($m = 2,9 \text{ mg/dl} + 0,4 \text{ mg/dl}$) e nos casos de rejeição aguda variou entre 2,7 mg/dl e 1,9mg/dl ($m = 2,1 \text{ mg/dl} + 0,3 \text{ mg/dl}$). Não foram incluídos doentes com diabetes mellitus.

Em qualquer dos grupos (A e B) a imunossupressão inicial consistiu na associação Ciclosporina(8mg/kg) + Azatioprina (2m/kg) + Metilprednisolona (5mg/Kg) e não existiam diferenças valorizáveis no respeitante ao tempo de isquémia fria, à técnica cirúrgica utilizada, ao nº de incompatibilidades entre dador e receptor e ao tipo de medicação de suporte (hidratação parentérica, diurético, antibioterapia, antiagregante plaquetar).

II - Nefropatia crónica do transplante

Neste grupo foram seleccionadas dez biópsias de transplante renal (com número de glomérulos igual ou superior a 10), com o diagnóstico histopatológico de nefropatia crónica do transplante (Grau IIa segundo os critérios de Banff)¹³. A biópsia foi realizada entre o 12º e 22º meses ($m = 16 + 4 \text{ meses}$) após a transplantação, e a creatinina sérica nestes doentes variou entre 1,7 mg/dl e 4mg/dl ($m = 2,6 \text{ mg/dl}$). Não foram incluídos doentes com diabetes mellitus.

A imunossupressão inicial neste grupo consistiu também na associação Ciclosporina (8mg/kg) + Azatioprina (2m/kg) + Metilprednisolona (5mg/Kg), não existindo diferenças valorizáveis no respeitante ao tempo de isquémia fria, à técnica cirúrgica utilizada, ao nº de incompatibilidades entre dador e receptor, nível médio da ciclosporinémia e ao tipo de medicação de suporte (hidratação parentérica, diurético, antibioterapia, antiagregante plaquetar, anti-hipertensor).

Todas as biópsias com o diagnóstico histopatológico (através das técnicas convencionais

de microscopia óptica - H&E, PAS e tricrômico de Masson) de necrose tubular aguda, rejeição aguda e de nefropatia crónica do transplante, foram processadas também para imunohistoquímica através da técnica das imunoperoxidasas (método streptavidina-biotina/HRP). Nesta, foram utilizados como primário, os anticorpos monoclonais anti Fas (CD 95-Apo A1/Fas – DAKO, ref. M 3553), anti Fas L (CD95 L – DAKO, ref. Mb 1098-SO), o anticorpo policlinal anti-caspase 3 (cpp 32 – DAKO, ref. A 3537) e o anticorpo monoclonal BclxL (Zymed, ref. 18-0217).

Nestas observações foi efectuada uma análise qualitativa das células que evidenciavam marcação pelo anticorpo aplicado, e uma análise semiquantitativa, aplicando neste caso um “score” graduado de 0 a 4 consoante a percentagem de células marcadas (0-0%, 1-25%, 2-50%, 3-75%, 4-100%). Em cada fragmento de biópsia foram efectuadas 6 leituras, sempre no sentido cortico-medular, utilizando uma ampliação de 200x (microscópio Nikon) e abrangendo a contagem de cerca 100 túbulos e 100 células do interstício (para os casos de rejeição aguda e nefropatia crónica); nos glomérulos considerou-se o mesmo “score” 0-4, consoante o nº de glomérulos evidenciando células marcadas. As observações foram efectuadas sempre pelo mesmo observador e comparadas com a expressão em rim normal.

RESULTADOS

I - Rim Normal

Com o anticorpo anti-FasL observou-se uma marcação citoplasmática e dispersa de células do epitélio tubular proximal e distal, sem envolvimento das células do interstício, glomérulos ou vasos. Com o anticorpo anti-Fas observou-

se a ausência de qualquer marcação celular. Com o anticorpo anti-caspase-3, observou-se somente a marcação dispersa de células do epitélio tubular proximal e distal. Com o anticorpo anti-Bclxl observou-se uma marcação assinalável dos túbulos proximais e também, embora com menor intensidade dos túbulos distais, sem envolvimento das células do interstício, glomérulos ou vasos.

II - Disfunção aguda do transplante

Necrose Tubular aguda

Com o anticorpo anti-FasL observou-se uma acentuação da marcação citoplasmática das células do epitélio tubular proximal, sem envolvimento de outras estruturas. Com o anticorpo anti-Fas observou-se também uma intensa marcação citoplasmática, sobretudo justa-basal, das mesmas células. Com o anticorpo anti-caspase - 3 observou-se uma acentuação da marcação citoplasmática das células do epitélio tubular (proximal e distal), sem envolvimento de outros elementos celulares. Com o anticorpo anti-Bclxl, observou-se uma marcação variável das células dos túbulos proximais e distais, na razão inversa do grau de atrofia tubular.

Rejeição Aguda

Com o anticorpo anti-FasL observou-se a marcação de bastantes células do infiltrado celular intersticial (mononucleares) bem como das células do epitélio tubular proximal, adjacentes a estas zonas. O anticorpo anti-Fas marcou somente e de forma intensa as células do epitélio tubular proximal, sobretudo nas zonas com maior intensidade de infiltrado celular intersticial. O anticorpo anti-caspase-3 apresentou uma

marcação citoplasmática das células do epitélio tubular proximal e distal bem como uma marcação acentuada de algumas células mononucleares nos ninhos de infiltrado celular intersticial.

Com o anticorpo anti-Bclxl, observou-se uma marcação variável das células dos túbulos proximais edistais, na razão inversa do grau de lesão tubular, mas também de algumas células infiltrantes do interstício e de algumas células glomerulares (epiteliais e mesangiais).

No quadro I apresentam-se os resultados das leituras/contagens efectuadas em rim normal(RN), nos rins com necrose tubular aguda(NTA) e nos rins com rejeição aguda(RA), respectivamente, com os anticorpos anti - FasL, anti-Fas, anti-caspase-3 e anti-Bclxl.

III - Nefropatia crónica do transplante

Com o anticorpo anti-FasL observou-se a marcação das células do epitélio tubular proximal e distal nas zonas mantendo ainda integridade do tecido. O anticorpo anti-Fas marcou também, e de forma mais intensa, as células do epitélio tubular proximal nas zonas mantendo ainda integridade tecidular. O anticorpo anti-caspase-3 apresentou uma marcação citoplasmática das células do epitélio tubular proximal e distal bem como uma mar-

cação, embora discreta, tanto de células glomerulares (epiteliais e mesangiais) como de algumas células do interstício. Com o anticorpo anti-Bclxl, observou-se uma marcação variável das células dos túbulos proximais, na razão inversa do grau de lesão tubular, e a marcação de algumas células glomerulares (mesangiais e epiteliais) e do infiltrado intersticial.

No quadro II apresentam-se os resultados das leituras/contagens efectuadas em rim normal(RN) e nos rins com nefropatia crónica do transplante(NC), respectivamente, com os anticorpos anti - FasL, anti-Fas, anti-caspase-3 e anti-Bclxl.

DISCUSSÃO

Tanto quanto se sabe actualmente, na transplantação do rim como em outros tecidos, a resposta imuno-inflamatória desencadeada pelo contacto entre células com características genéticas diferentes, desencadeia uma cascata de fenómenos biológicos complexos, com uma dinâmica muito aproximada à resposta do organismo a um qualquer estímulo invasivo¹⁴.

A interacção antigénio-anticorpo provoca a activação de fenómenos em cascata multidireccional, que estimulam as principais unidades celulares integrantes do rim (endotélio; células

Quadro I

| | FasL | | Fas | | casp.3 | | Bclxl | | |
|----|------|---|-----|---|--------|---|-------|---|---|
| | T | I | T | I | T | I | T | I | G |
| N | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| NT | 2 | 0 | 4 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| RA | 3 | 2 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 |

N= rim normal ; NT= necrose tubular aguda; RA= rejeição aguda
* T- células tubulares; I - células intersticiais; G - células glomerulares (percentagem de túbulos, células intersticiais e glomérulos marcadas pelos anticorpos - 0-0%, 1-0-25%, 2-25-50%, 3-50-75%, 4-75-100%)

Quadro II

| | FasL | | Fas | | Casp 3 | | | Bclxl | | |
|----|------|---|-----|---|--------|---|---|-------|---|---|
| | T | I | T | I | T | I | G | T | I | G |
| N | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| NC | 1 | 0 | 3 | 0 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 |

N= rim normal; NC= nefropatia crónica do transplante
T- células tubulares; I células intersticiais; G - células glomerulares (percentagem de túbulos, células intersticiais e glomérulos marcados pelos anticorpos - 0-0%, 1-0-25%, 2-25-50%, 3-50-75%, 4-75-100%)

do epitélio tubular; células do glomérulo, células intersticiais), e provocam a neo-expressão de uma espantosa multiplicidade de moléculas, também com uma actividade autócrina e parácrina, que contribuem para o fenómeno potencial da rejeição^{14,15}. Neste âmbito é também de sublinhar o papel do fenómeno-isquémia do tecido renal, bem ilustrado nos estudos sobre os efeitos da hipóxia e da reperfusão no rim, e que vem adicionar à problemática da interacção antigénio-anticorpo factores patogénicos muito importantes¹⁶. Este eflúvio molecular desempenha pois um papel muito activo nas formas de destruição aguda ou mais ou menos insidiosa das células nativas do rim, originando na resposta final a produção mais ou menos activa de colagénio e de outras proteínas da matriz extracelular¹⁷⁻¹⁹.

As particularidades da disfunção aguda e crónica do enxerto assentam basicamente na natureza do estímulo dominante (rejeição e/ou isquémia) e na rapidez, na intensidade e na duração que envolve todo o processo. Actualmente também não é possível abordar a patogénese da nefropatia crónica do transplante sem referir a importância fundamental, para além dos fenómenos de rejeição crónica, dos factores comórbidos como a hipertensão arterial, a hiperfiltração glomerular, a proteinúria, a dislipidémia, a hiperglicémia, e a toxicidade de fármacos como os inibidores da calcineurina que contribuem, em conjunto, para o processo degenerativo do rim transplantado²⁰.

Em qualquer das situações (disfunção aguda ou crónica) deparamos com um maior ou menor índice de morte celular por necrose ou por apoptose traduzindo a forma inata de como o tecido sofre e “procura” o seu ponto de equilíbrio biológico face à agressão de que é alvo. Todavia, e tal como foi referido anteriormente, se este fenómeno (apoptose) pode ser benéfico quando envolve células indesejáveis,

também pode ser prejudicial, se atingir células nobres do rim. No primeiro caso inscreve-se a importância do conceito de imunotolerância, no segundo, sabe-se actualmente que é possível estabelecer também uma relação entre o desaparecimento das células e o aumento da matriz extracelular^{21,22}.

Como já referimos a susceptibilidade de uma célula à apoptose é influenciada pelo ambiente extracelular e pela expressão e actividade de proteínas intracelulares que são reguladoras do fenómeno apoptótico⁵. As “famílias” de proteínas reguladoras da apoptose incluem os receptores de morte celular (sensores para estímulos letais) tendo sido por nós estudado o complexo FasL/Fas; as Bcl2, compreendendo membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos, tendo sido aqui estudada a molécula anti-apoptótica Bclxl; e as caspases, que são moléculas efectoras intracelulares da apoptose, tendo sido por nós estudada a caspase 3.

Antes de mais torna-se indispensável referir que esta investigação envolveu a detecção da neo-expressão de algumas moléculas que desempenham um papel crucial nos principais mecanismos que conduzem à apoptose, e não na apoptose propriamente dita. Este facto condiciona basicamente a interpretação das observações efectuadas pois só podemos ficar pela presunção do “acontecimento” apoptótico, todavia, é preciso sublinhar que mesmo a técnica específica para detecção de células em apoptose (TUNEL) não é infalível, reconhecendo-se a probabilidade de muitos falsos positivos e negativos⁵.

Em seguida passamos a fazer a análise comparativa da expressão encontrada para cada uma das diferentes moléculas nos três quadros anátomo-clínicos que foram estudados neste trabalho (necrose tubular aguda, rejeição aguda e nefropatia crónica do transplante).

Complexo FasL/Fas

A molécula FasL é neo-expressa pelas células infiltrantes (monocleares) do interstício e representa, ao ligar-se ao receptor Fas expresso pelas células tubulares, um dos mecanismos clássicos mais importantes de “ignição” do processo de apoptose, desencadeando a activação sequencial intracelular da cascata das caspases⁶. A este nível também se encontra descrito um outro mecanismo de activação intracelular das caspases, que não necessita a interacção com o receptor Fas e que envolve o complexo perforina-granzyma²².

Nos quadros observados de disfunção aguda (necrose tubular aguda e rejeição aguda do transplante) observámos a expressão preponderante das moléculas FasL e Fas nas células tubulares, enquanto a molécula FasL só foi observada nas células mononucleares do interstício na rejeição aguda. Estas observações levam-nos a concluir que a morte celular por apoptose na rejeição aguda, poderá ser processada através do complexo FasL/Fas, enquanto que na necrose tubular aguda a apoptose parece ser activada também através estimulação do receptor Fas, mas de forma independente da intervenção da molécula FasL. Este facto sugere, que a hipóxia associada ao fenómeno isquémico na necrose tubular aguda, possa constituir um estímulo de indução da neo-expressão do receptor Fas nas células tubulares.

Na nefropatia crónica do transplante observou-se uma discreta expressão da molécula FasL e uma expressão marcada da molécula Fas nas células tubulares, sem participação das células intersticiais ou glomerulares. Esta observação leva-nos a presumir que a morte por apoptose neste tipo de nefropatia, seja essencialmente mediada pela hipóxia tecidual (isquémia) acompanhante de outros factores co-mórbidos que estimulam directamente

aquele receptor celular. Neste contexto torna-se provável a hipótese de existir uma relação directa entre apoptose e o aumento da matriz extracelular/fibrose intersticial que caracteriza a nefropatia crónica do transplante.

Caspase 3

De salientar a expressão espontânea e moderada no epitélio tubular proximal e distal em rim normal, tal como anteriormente descrito por outros autores e reflectindo, provavelmente, um “turn-over” fisiológico destas células²³.

Já nas formas de disfunção aguda (necrose tubular aguda e rejeição aguda) a expressão desta molécula surge somente ao nível das células tubulares na necrose tubular aguda, e simultaneamente nas células tubulares e intersticiais nos casos de rejeição aguda. Este facto poderá significar que a activação desta molécula é crucial para a apoptose das células tubulares, tanto na necrose tubular aguda como na rejeição aguda, mas assume particular importância, quando é expressa pelas células infiltrantes do interstício só nos casos de rejeição aguda. Não é fácil interpretar este fenómeno mas pensamos que poderá estar relacionado com as seguintes hipóteses: 1 - “explosão” da actividade citotóxica (com transcrição múltipla de proteínas), e portanto de agressividade celular; 2 - Poderá tratar-se de um processo de indução apoptótico directo e independente da activação do receptor Fas conforme já anteriormente descrito⁵. Se no primeiro caso este fenómeno poderia estar relacionado com a agressividade do processo de rejeição e portanto ser um factor nocivo, no segundo, poderá corresponder à regressão da actividade imuno-inflamatória com morte das células intersticiais activadas, e portanto um factor benéfico para o tecido transplantado.

Na nefropatia crónica do transplante verificámos uma expressão significativa de caspase 3 nas células tubulares proximais remanescentes, com intensidade sobreponível à encontrada na rejeição aguda e coexistente com a estimulação do receptor Fas. Nestas circunstâncias, a ausência de envolvimento de FasL, que pudemos constatar, poderá significar que a apoptose deverá ter um mecanismo independente da mediação pelas células infiltrantes do interstício e que, possivelmente, seja desencadeado pelo próprio fenómeno isquémico.

Na nefropatia crónica as células do interstício, ao invés da rejeição aguda, apresentaram uma marcação discreta de caspase 3, sublinhando a importância discreta da apoptose nestas células. Por outro lado é de referir o aparecimento de células glomerulares expressando também discretamente esta molécula o que, como referimos, na ausência de expressão da molécula Fas, poderá significar o primeiro estigma de apoptose no compartimento glomerular. Este facto poderá sugerir a hipótese de uma relação entre a apoptose das células glomerulares e o aumento da matriz mesangial, prenunciadora da esclerose glomerular.

BclxL

De salientar que foi encontrada uma expressão espontânea deste marcador nas células tubulares do rim normal, traduzindo provavelmente a capacidade de defesa iminente nestas células¹². Esta expressão aumenta em intensidade face à agressão patogénica, e só está patente ao nível das células que conservam ainda a sua integridade morfofuncional. Tratando-se de uma molécula com uma actividade fundamentalmente anti-apoptótica podemos equacionar três hipóteses: 1 - a sua intervenção poderá ser benéfica nas si-

tuções em que a apoptose se afigura prejudicial (necrose tubular aguda); 2 - a sua intervenção poderá ser nociva nos casos em que a apoptose funciona como fenómeno regulador da proliferação celular (rejeição aguda ou crónica); 3 - a sua intervenção poderá traduzir uma forma de defesa celular face à agressão (qualquer que seja o mecanismo indutor).

Nos casos de necrose tubular aguda e de rejeição aguda, reflectindo portanto um marcado sofrimento celular tubular, embora motivado por mecanismos diferentes, observou-se uma neo-expressão acrescida deste marcador, o que nos leva a supôr tratar-se de um mecanismo molecular activado pela célula face a uma agressão. A expressão discreta mas presente ao nível das células do interstício e dos glomérulos, nos casos de rejeição aguda e crónica, poderá traduzir também um mecanismo de defesa destas células naquela situação. Não nos é possível, com os resultados de que dispomos, estabelecer com rigor qualquer correlação positiva ou negativa relativamente aos resultados com outros marcadores.

Na nefropatia crónica do transplante a neo-expressão da molécula BclxL foi sobreponível à encontrada na rejeição aguda, traduzindo provavelmente o mesmo fenómeno de defesa/protecção celular. Assim sendo, a intensidade da expressão encontrada, que aparentemente varia na razão inversa do grau de lesão tubular, poderá corresponder à perda da capacidade de defesa/protecção funcional destas células.

Correlação anátomo-clínica

Com base nas observações efectuadas, e quando se cruzam os valores analíticos da função do enxerto com a maior ou menor intensidade da expressão das moléculas estudadas, consideramos ser de salientar a

impressão deixada nos seguintes casos: 1 - a expressão tubular de Fas na necrose tubular aguda (Fig.1); 2 - a expressão de caspase 3 pelas células infiltrantes do interstício na rejeição aguda(Fig.2).

CONCLUSÕES

É um facto que qualquer trabalho de investigação, e em particular nesta área, se defronta com extraordinárias dificuldades (incluindo as nossas próprias) que não permitem senão aproximarmo-nos de probabilidades. E aqui as questões primordiais continuam a colocar-se: Qual é o motivo que move a célula a “optar” morrer por apoptose ou por necrose no tecido submetido à agressão?; poderá tratar-se de um processo adquirido no genoma, ao longo de milhares de anos, no sentido da preservação do tecido a que pertence?; poderá pois tratar-se de um mecanismo regulador/modulador dos “excessos” biológicos?.

As nossas observações ajudam a consolidar a ideia de que no rim transplantado a apoptose poderá desempenhar um papel importante na

delecção de diversas células do tecido renal, nomeadamente das células do epitélio tubular, submetido a um sofrimento agudo ou crónico. A este nível, a apoptose poderá ser mediada pelas moléculas Fas e caspase 3, através do estímulo constituído pelo ambiente hipóxico do tecido isquémico na necrose tubular aguda e/ou do fenómeno inflamatório na rejeição aguda ou da etiologia multifactorial na nefropatia crónica.

Na rejeição aguda a intervenção da molécula FasL, expressa nas células infiltrantes do interstício, deverá funcionar como activador da molécula receptora Fas nas células tubulares. A expressão de caspase 3 pelas células do interstício, e sobretudo nos ninhos de infiltrado inflamatório da rejeição aguda, poderá estar relacionada com a intensidade da actividade inflamatória e proliferativa daquele processo.

A neo-expressão da molécula BclxL reflecte, provavelmente, a mobilização dos mecanismos de protecção da célula, face aos mecanismos indutores de apoptose. Com efeito encontrámo-la tanto nas formas de sofrimento agudo como crónico ao nível das células tubulares e do interstício, e uma expressão ainda que incipiente

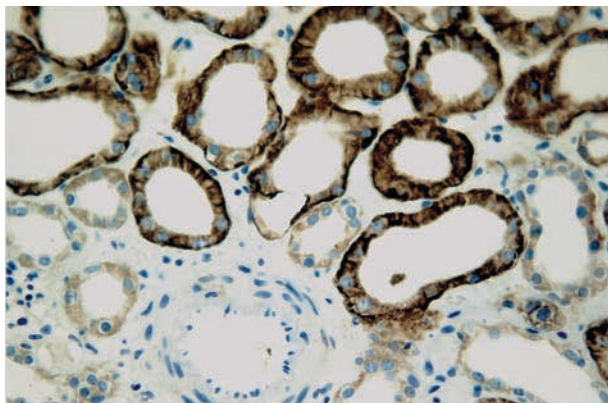


Fig. 1: Expressão de Fas (CD 95-Apo A1/Fas) ao nível das células tubulares, na necrose tubular aguda (x200).

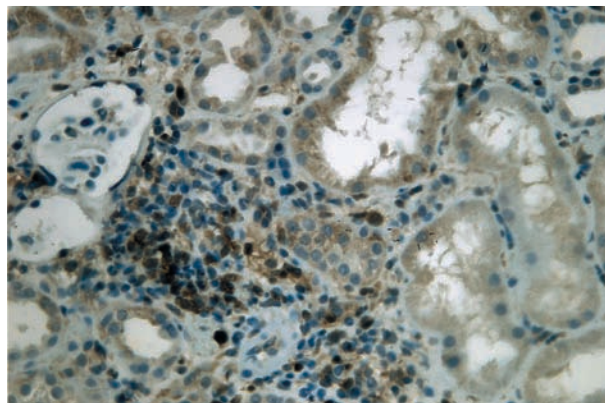


Fig. 2: Expressão de caspase 3 (cpp32) ao nível das células infiltrantes do interstício, na rejeição aguda (x200).

ao nível glomerular na nefropatia crónica, sugerindo o estigma da agressão num sector onde também só a caspase 3 havia sido identificada.

Neste estudo, não foi possível estabelecer qualquer correlação objectiva entre a expressão da BclxL (anti-apoptótica) com a maior ou menor intensidade da neo-expressão de marcadores pró-apoptóticos (FasL/Fas e caspase 3). Da mesma forma, não foi possível estabelecer qualquer relação entre a expressão de marcadores pró ou anti-apoptóticos com a maior ou menor intensidade das alterações da matriz extracelular (fibrose/esclerose) sobretudo nos casos de nefropatia crónica do transplante.

Face aos conhecimentos actuais e com base nas nossas próprias observações, o significado biológico da apoptose poderá ser equacionado em duas possíveis perspectivas, porventura complementares: poderá tratar-se de um fenómeno colectivo e de sintonia celular em cada tecido, com o "objectivo" de modular a sobrevivência das células, sempre com o objectivo da sua preservação (tecido) face a uma qualquer agressão; ou consistir num fenómeno individual e intrínseco a cada célula, capacitando-a para se autodestruir isoladamente, caso sejam ultrapassados os seus limites de adaptação ("point of no return").

Numa situação artificialmente criada pelo Homem como é o acto da transplantação, estamos certamente a contribuir para "baralhar" a Mãe Natureza, todavia, estamos convictos de que Ela vai continuar a surpreender-nos...

Trabalho subsidiado pela Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde (projecto nº 103/2001)

Referências

1. VAUX DL, KORSMEYER SJ. Cell death in development. *Cell* 1999;96:245-254.
2. SCHWARTZ LM, OSBORNE BA. Programmed cell death. Apoptosis and killer genes. *Immunol Today* 1993; 14: 582-590.
3. SAVILL J, MOONEY A, HUGHES J. Apoptosis and renal scarring. *Kidney Int* 1996; 54(suppl):14-17.
4. ITO H, KASAGI N, SHOMORI K, OSAKI K, HADACHI H. Apoptosis in the human allografted kidney. *Transplantation* 1995;60:794-798.
5. ORTIZ A. Apoptotic regulatory proteins in renal injury. *Kidney Int* 2000;58(1):467-485.
6. HETTS SW. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998; 279:300-307.
7. NAGATA S, GOLSTEIN P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267:1449-1456.
8. SUDA T, TAKAHASHI T, GOLSTEIN P, NAGATA S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand. *Cell* 1993; 1169-1178.
9. THOMAS FT, CONTRERAS JL, BILBAO G, RICORDI C, CUREL D, THOMAS JM. Anoikis, extracellular matrix, and apoptosis factors in isolated cell transplantation. *Surgery* 1999; 126: 299-304.
10. THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y. Caspases. Enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.
11. REED JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.
12. ADAMS JM, CORY S. The Bcl-2 protein family. Arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-1326.
13. The Banff 97 Working Classification of Renal Allograft Pathology
14. Why do we reject a graft? Role of indirect allorecognition in graft rejection. *Kidney Int* 1999; 56; 1967-1979
15. JANEWAY CA JR, MEDZHITOV R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
16. DAEMEN MA, DE VRIES B, BUURMAN WA. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation* 2002; 73: 1693-1700.
17. SHIMIZU A, KITAMURA H, MASUDA Y, ISHIZAKI M, SUGISAKI Y, YAMANAKA M. Apoptosis in the repair process of experimental proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1995; 47:114-121.
18. PAUL LC. Chronic allograft nephropathy: an update. *Kidney Int* 1999;56: 783-790
19. SUGIYAMA H, KASHIHARA N, MAKINO H, YAMASAKI Y, OTA A. Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1996;49:103-111.
20. FELLSTROM B. Nonimmune risk factors for chronic renal allograft dysfunction. *Transplantation* 2000; 71: 10-16.
21. DEMIRCI G, STROM BT, LI CHANG XIAN. New approaches in tolerance induction. *Cur Opin Org Transplant* 2001;6: 89-94
22. BUTTKE MTI. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 15:7-10.
23. KRAJEWSKA M, WANG H-G, KRAJEWSKI S, ZAPATA JM, SHABAIKA A, GASCOYNE R, REED JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of cyp32 (caspase 3), a cell death protease. *Cancer Res* 1997; 57: 1605-1613.