

Luís Gustavo Modelli de Andrade

Expressão dos capilares peritubulares (CD34) e do VEGF na nefropatia crônica do enxerto

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação “Fisiopatologia em Clínica Médica” – Área de concentração em nefrologia – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção do título de Mestre em Medicina.

**Orientadora: Prof. Dra. Maria Fernanda Cordeiro de
Carvalho**

**Botucatu – SP
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Andrade, Luís Gustavo Modelli de.

Expressão dos capilares peritubulares (CD34) e do VEGF na nefropatia crônica do enxerto / Luís Gustavo Modelli de Andrade. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2007.

Orientadora: Maria Fernanda Cordeiro de Carvalho

Assunto CAPES: 40101134

1. Nefrotoxicologia 2. Rins - Transplante 3. Nefrologia 4.
Rejeição de enxertos

CDD 617.461

Palavras chave: Capilares peritubulares; CD34; Nefropatia crônica do enxerto; Nefrotoxicidade; VEGF

**Este Trabalho foi financiado com recursos
de auxílio à pesquisa da Fundação de
Amparo a Pesquisa do Estado de São
Paulo (FAPESP)
2004/10945-3**

Este Trabalho é dedicado a:

Salete Conforti Modelli de Andrade, mãe que me apoio e incentivou nos momentos difíceis.

Vanessa Cristina Pelicea, esposa e companheira que sempre me incentivou e soube compreender os momentos de ausência.

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a participação e auxílio de diversas pessoas as quais expresso minha imensa gratidão:

A Prof. Dra. Maria Fernanda Cordeiro de Carvalho, orientadora desta tese, pela participação ativa, pelo convívio diário e pelo ensino incansável da arte do transplante renal.

A Prof. Dra. Rosa Marlene Viero, co-orientadora deste trabalho, pela ajuda na elaboração e execução do projeto.

A Marcos Roberto Franchi e Celene M. Carvalho Gandin, pela separação das lâminas e realização da análise de imunohistoquímica.

Ao Prof. Reinaldo José da Silva, pelo gentil empréstimo do microscópio e do analisador de imagens, tão importantes para a execução do projeto.

A Irene Aliano Ortiz, secretária do transplante renal, pela ajuda no trabalho diário e dedicação.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pela ajuda com a análise estatística.

Agradecimentos

Aos colegas de trabalho, Prof. Dr. André Luis Balbi, Prof. Dr. Luis Cuadrado Martin, Prof. Dra. Jacqueline Teixeira Caramori, Prof. Dr. Pasqual Barretti, Dra. Daniela Ponce Gabriel, Dra. Vanessa Santos Silva, Dr. João Henrique Castro e Dra. Ana Cláudia Kochi.

Aos colegas de residência, Dr. Antonio Gonçalves Rodrigues Júnior e Dr. Genivaldo Victor Nascimento.

A todos, Muito Obrigado.

Índice

Introdução.....	01
Objetivos	12
Casuística e Métodos	13
Análise de Imunohistoquímica	17
Estatística	22
Resultados	23
Características Clínicas dos grupos	23
Análise Morfométricas	26
Análise de CD34	26
Análise de VEGF	30
Correlações Clínico Morfológicas	35
Análise de Sobrevida do enxerto	38
Discussão	41
Conclusão	47
Referências	49

Lista de Abreviaturas utilizadas (ordem alfabética)

C	Grupo controle
C4d	Fração do complemento da via clássica
CD34	Marcador de imunohistoquímica para capilares
CD4	Linfócitos da sub-população CD4
CD8	Linfócitos da sub-população CD8
Flt-1	FMS-like tyrosine kinase 1
HIF-1	Hypoxia-inducible factor-1
HLA	Human leukocyte antigen
IH	Imunohistoquímica
IL-2	Interleucina 2
KDR	Kinase insert domain receptor
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
NCE	Grupo de nefropatia crônica do enxerto
NTX	Grupo de Nefrotoxicidade crônica
Tx	Transplante
TGF-β	Transforming growth factor-beta
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-1	Vascular endothelial growth factor – receptor 1
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor – receptor 2
α-SMA	Alpha smooth muscle actin

Lista das Tabelas

Tabela	Título	Pág.
1	Características clínicas dos pacientes transplantados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu nos grupos de nefropatia crônica do enxerto, nefrotoxicidade e controle	25
2	Área Total e número de capilares peritubulares que expressam CD34 nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto e nefrotoxicidade	27
3	Área Total e número de capilares peritubulares que expressam CD34 nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto grau I, II, III e nefrotoxicidade	29
4	Área Total e número de túbulos renais que expressam VEGF nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto e nefrotoxicidade	31
5	Área Total e número de túbulos renais que expressam VEGF nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto grau I, II, III e nefrotoxicidade	33

Lista das Figuras

Figura	Título	Pág.
1	Metodologia de seleção de casos para a análise e distribuição em grupos	15
2	Expressão dos marcadores CD34 e VEGF por imunohistoquímica (IH – 400), nos grupos: controle, nefropatia crônica e nefrotoxicidade.	20
3	Expressão dos marcadores CD34 e VEGF por imunohistoquímica (IH – 400), nos grupos de nefropatia crônica de Banff 1 a 3.	21
4	Área Total de expressão de CD34 nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto e nefrotoxicidade.	27
5	Área Total de expressão de CD34 nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto grau I, II e III e nefrotoxicidade.	29
6	Área Total de expressão de VEGF nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto e nefrotoxicidade.	31
7	Área Total de expressão de VEGF nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto grau I, II e III e nefrotoxicidade.	33
8	Gráfico de dispersão entre CD34 e VEGF nos grupos controle, NCE e NTX.	34
9	Gráfico de dispersão entre idade no momento do transplante com a área total de CD34 nos grupos de NCE e nefrotoxicidade.	35

Lista das Figuras

Figura	Título	Pág.
10	Associação entre área de expressão de CD34 e o número de episódios de rejeição celular aguda.	36
11	Sobrevida funcional do enxerto nos grupos de NCE e nefrotoxicidade segundo a expressão de CD34: alto e baixo.	38
12	Sobrevida funcional do enxerto pós-biópsia renal nos grupos de NCE e nefrotoxicidade segundo a expressão de VEGF: baixo, normal e alto.	40
13	Modelo teórico da hipóxia levando a redução dos capilares peritubulares, produção do fator induzido pela hipóxia (HIF), aumento da produção do VEGF e estímulo quimiotático para macrófagos. A conseqüente produção de TGF- β causa inflamação resultando em lesão renal.	46

Introdução

A nefropatia crônica do enxerto é hoje a causa mais prevalente de disfunção do enxerto na primeira década após transplante¹, contribuindo com significativa morbidade para a população de pacientes transplantados. Apesar dos avanços recentes da terapêutica imunossupressora, que culminaram com a melhor sobrevida em um ano, não houve proporcional melhora de sobrevida renal a longo prazo².

O termo nefropatia crônica do enxerto é hoje preferido à antiga denominação de rejeição crônica pelo fato de estar bem estabelecida a participação de mecanismos imunes e não imunes em sua patogênese³.

A nefropatia crônica pode ser explicada por danos ao sistema vascular, drogas nefrotóxicas, hipertensão e episódios de rejeição aguda. Várias linhas de pesquisas têm sido conduzidas na tentativa de elucidar a sua fisiopatogenia e correlação com a clínica, e também obter marcadores precoces que possam sugerir o prognóstico em fases ainda iniciais da nefropatia.

Uma linha de pesquisa, com ênfase em células tubulares, correlaciona marcadores de fibrose no interstício com pior prognóstico e explica a nefropatia pelo modelo de transdiferenciação, ou seja, a diferenciação de células epiteliais tubulares em células mesenquimais. Nesse modelo as células tubulares principalmente por estímulo de TGF- β perdem marcadores e integrinas específicas como as E-caderinas passando a expressar marcadores de células mesenquimais como α -SMA. A célula, então, perde sua aderência à membrana basal e célula a célula, passando a migrar e produzir fibrose no interstício⁴. Estudos que correlacionam a presença de células positivas para α -SMA no interstício com a disfunção crônica do enxerto, associaram a presença desse marcador com pior prognóstico⁵.

Na imunologia da nefropatia crônica a via imune celular tem sido implicada como importante mecanismo para a disfunção crônica, porém, recentemente a via imune humoral tem tido papel reconhecido. Na via celular o mecanismo de aloreconhecimento indireto, que ocorre mais tardiamente, contribui forma mais evidente do que o aloreconhecimento direto. Nessa via, células apresentadoras de antígeno do próprio receptor, são responsáveis pela expressam dos antígenos MHC de classe II e a ativação dos linfócitos T CD4+. Assim, há o recrutamento de macrófagos com produção de IL-2 que reconhecem o enxerto como não próprio, principalmente, através da

hipersensibilidade tardia⁶⁻⁷. O braço imune humoral parece contribuir com lesões repetidas ao sistema vascular do enxerto de baixa intensidade, porém, com importante contribuição cumulativa. Estudos que correlacionaram depósitos de C4d, que refletem ativação do complemento pela via clássica, no túbulo proximal associaram-se à presença de disfunção do enxerto mais importante e a danos na membrana basal tubular⁸.

A nefropatia crônica instalada na anatomia patológica é reconhecida pela presença de glomerulopatia, fibrose intersticial, atrofia tubular e fibrose da íntima das artérias. As lesões glomerulares são variadas e incluem colapso do tufo glomerular, hiper celularidade mesangio-endotelial e glomeruloesclerose focal. As lesões vasculares se caracterizam por fibrose da íntima de artérias de pequeno e médio calibre⁹.

Estudos de progressão de lesão renal têm dado importância à infiltração de leucócitos, mediadores vasoativos, citocinas, proteínas da matriz e proteases. A maioria desses estudos foca os podócitos, células mesangiais, células tubulares e fibroblastos do interstício. Pouco se sabe sobre o acometimento da microcirculação como causa de fibrose e progressão da lesão renal. Observando-se o prognóstico reservado que episódios de rejeições vasculares causam à sobrevida do enxerto renal, Van Saase et al, relacionaram o acometimento da circulação com o prognóstico futuro do enxerto¹⁰.

Vasculites, com arterite intimal e/ou necrose fibrinóide, estão associadas a impacto negativo e a episódios mais graves de rejeição celular aguda, bem como menor sobrevida do enxerto¹¹. Postulou-se que a lesão vascular poderia ser a responsável pelo evento inicial que culminaria com a nefropatia crônica. Assim, a seqüência de eventos se iniciaria com a lesão vascular que resultaria na produção de citocinas por células endoteliais e musculares lisas, responsáveis pela proliferação da parede vascular. As lesões glomerulares e tubulo-intersticiais seriam consideradas secundárias a essas lesões do sistema vascular¹².

Kang et al, observaram que a perda de capilares peritubulares precede o desenvolvimento de fibrose túbulo-intersticial e a perda de capilares glomerulares, sugerindo que o acometimento da microcirculação é a causa e não a consequência do processo de agressão renal. Nesse modelo, a perda de capilares resulta em suprimento deficiente de oxigênio para as células do túbulo e interstício levando a isquemia crônica. A hipóxia resultante, causa a proliferação de células tubulares e fibroblastos com a produção de citocinas resultando em fibrose¹³.

A densidade da microcirculação tem sido recentemente estudada em modelos de progressão da lesão renal e já previamente definida como importante fator prognóstico de disseminação neoplásica de tumores, como o

carcinoma de próstata, mama e colo uterino. Alguns estudos em densidade de microcirculação foram feitos em modelos de insuficiência renal aguda. Basile et al, em recente revisão, propôs que danos ao sistema microvascular, com perdas de sua densidade, resultaram em lesão permanente. O que sugere que alterações da microcirculação, mais do que alterações em grandes vasos guardariam correlação com o desenvolvimento da nefropatia crônica¹⁴. Assim, em um modelo de lesão isquêmica severa em ratos, a redução de 30-50% da densidade dos capilares peritubulares na medula resultou em dificuldade de concentração de urina e predisposição a fibrose pela elevação da produção de TGF- β ¹⁵.

Na nefropatia crônica do enxerto também têm surgido relatos sobre o acometimento da microcirculação. Foi observado que o número de camadas circunferenciais de membrana basal de capilares peritubulares vistas ao microscópio eletrônico tem forte correlação com a nefropatia crônica, sugerindo que episódios de rejeição de baixa intensidade poderiam lesar os capilares peritubulares¹⁶.

Não está definida, a participação da microcirculação na progressão da nefropatia sendo que a maioria dos estudos aponta para uma diminuição da densidade de capilares no glomérulo e túbulo-interstício em modelos animais e em humanos^{13,17,18}. Outros, entretanto, apontam para um aumento de sua

densidade^{19,20}. Os primeiros estudos sugerem participação central do acometimento vascular e conseqüente isquemia na progressão da nefropatia.

Alterações da microcirculação também foram relatadas em modelos de idade avançada¹⁸, rim remanescente¹³ e nefrotoxicidade crônica por ciclosporina²¹, e estes estudos correlacionaram a progressão da lesão com a diminuição da densidade dos capilares peritubulares. Foi demonstrado, em estudo recente de biópsias de nefropatia crônica do enxerto, que a lesão progressiva da microvasculatura tinha papel central no desenvolvimento de fibrose intersticial e disfunção do enxerto e poderia ser crucial na progressão da nefropatia. Este estudo demonstrou que a perda de capilares peritubulares, evidenciados pelo marcador CD34, foi mais significativo no grupo de pacientes com nefropatia crônica do enxerto do que o grupo controle (biópsias tempo zero)²². Mais estudos são necessários nessa área e principalmente em nefropatia crônica do enxerto para se definir a correlação e importância do acometimento da microcirculação renal.

Outros importantes reguladores da microcirculação renal são os fatores angiogênicos sendo de particular interesse o fator vascular de crescimento endotelial (VEGF), expresso de forma muito significativa nos rins. VEGF é um fator mitogênico e anti-apoptótico com atividade em células endoteliais²³. Esse fator é um importante regulador da angiogênese e tem papel central no

desenvolvimento embriológico do rim, proliferação tumoral e retinopatia diabética. Aplicações terapêuticas têm sido relatadas em modelos animais de isquemia coronariana e límbica²⁴. O VEGF estimula a proliferação e diferenciação de células endoteliais, aumenta a permeabilidade vascular e previne a apoptose do endotélio. No rim, sua expressão é mais acentuada nos podócitos, túbulos distais e coletores sendo de menor expressão no túbulo proximal. As suas ações ocorrem por atividade parácrina em receptores endoteliais específicos (KDR e Flt-1) resultando em diferenciação celular, angiogênese e ativação quimiotática para monócitos e células endoteliais. O receptor Flt-1, também chamado de VEGFR-1 é o responsável pelo estímulo quimiotático para macrófagos. O receptor KDR, ou VEGFR-2 leva ao estímulo mitogênico e o aumento de permeabilidade do endotélio²⁴.

A redução progressiva do VEGF tubular coincide com a perda de capilares peritubulares e o desenvolvimento de glomeruloesclerose e fibrose intersticial¹³. Assim, nos últimos anos têm se dado destaque especial para as alterações de circulação renal, usando o fator de crescimento vascular endotelial e sua provável correlação com a progressão da lesão renal. Kang et al, observaram no modelo de ablação de 5/6 da massa renal em ratos a redução de expressão de VEGF, bem como redução da expressão do RNA mensageiro em córtex e medula, ao fim de oito semanas. Estes dados sugerem que a

menor expressão do VEGF pode ser responsável por uma angiogênese deficiente e contribuir para a progressão da lesão renal¹³.

Schrijvers et al, entretanto, utilizando o anticorpo anti-VEGF em um modelo de nefrectomia subtotal em ratos observaram ao fim de seis semanas que a inibição do VEGF preveniu parcialmente o desenvolvimento de hipertrofia glomerular e impediu o aumento da excreção de albumina urinária. Os autores concluíram que o VEGF poderia ser um mediador de hipertrofia glomerular levando a glomerulosclerose progressiva e fatores que bloqueariam sua ação poderiam ser úteis na prevenção da progressão da lesão renal²⁵.

O papel da expressão do VEGF e de seus receptores, não estão bem definidos tanto no rim normal quanto em estados patológicos, sendo que vários estudos sobre esse fator têm resultados antagônicos. Diversas circunstâncias presentes na agressão renal como a hipóxia e diversos fatores como radicais livres de oxigênio, TGF- β e angiotensina II parecem estimular a sua produção. Podemos assim esperar um aumento ou diminuição do VEGF em diferentes momentos da agressão renal. A sua redistribuição tem sido descrita em diversas patologias como modelos de isquemia/reperfusão, lesão túbulo intersticial crônica, glomerulonefrite membranosa, pré-eclâmpsia, diabetes mellitus ou uropatia obstrutiva²⁶⁻²⁷.

O bloqueio do VEGF, utilizando o anticorpo monoclonal α -VEGF, em modelo animal de nefrotoxicidade por ciclosporina resultou em aumento da ação nefrotóxica quando utilizado altas doses de ciclosporina (150mg/Kg/dia) associado ao anti-VEGF em comparação ao controle que apresentou dano tubular menos severo. A conclusão do estudo é que o VEGF endógeno parece ser necessário para proteção dos túbulos do efeito deletério da ciclosporina²⁸.

Castilla et al, utilizaram células endoteliais de aorta bovina exposta a diferentes agentes tóxicos (citocalasina, peróxido de hidrogênio e ciclosporina), observaram um aumento da ação de citotoxicidade quando o anti-VEGF era adicionado junto ao agente agressor. A citocalasina e o peróxido de hidrogênio também aumentaram a expressão do RNA mensageiro do VEGF. Nesse modelo o VEGF parece exercer uma ação protetora sendo importante para manter a viabilidade do endotélio frente a condições de agressão celular²⁹.

Na nefropatia crônica do enxerto foi observado, em estudo de biópsias de 17 pacientes, o aumento da expressão do VEGF em podócitos, células mesangiais e células tubulares bem como um aumento de macrófagos no interstício renal. O marcador expressou-se mais na nefropatia crônica em comparação a rejeição aguda ou disfunção temporária do enxerto³⁰. Os autores concluíram que a expressão do VEGF estaria aumentada

principalmente no interstício ocorrendo junto com o infiltrado de macrófagos, os quais seriam, então, responsáveis pela produção de citocinas e estimulação dos miofibroblastos.

Lemos et al, em estudo genético de polimorfismo do nucleotídeo do VEGF em pacientes transplantados renais, mostraram que receptores com a base genética para maior produção de VEGF tiveram sobrevida do enxerto renal maior comparados a receptores com baixa produção de VEGF. O homozigoto para a baixa produção de VEGF teve a pior sobrevida do enxerto. Os autores concluíram que os pacientes que não expressavam nenhum alelo para VEGF teriam o pior prognóstico sendo mais vulneráveis a lesão tissular e conseqüentemente menor sobrevida do enxerto³¹.

Em resumo o VEGF parece ser estimulado por fatores como a hipóxia levando a uma quimiotaxia para monócitos e conseqüente produção de TNF- α e TGF- β . Inicialmente o VEGF parece estimular a angiogênese e ser responsável pelos efeitos protetores como demonstrados em modelos de nefrotoxicidade aguda pela ciclosporina. Cronicamente, o VEGF e o TNF- α poderiam levar a fibrose. Contribuindo com o modelo proposto, no estudo de Özdemir et al, os autores mostraram que a função renal do enxerto nos primeiros 6 meses foi melhor nos pacientes com aumento da expressão de VEGF tubular. Já em longo prazo, a expressão de VEGF esteve relacionada à

fibrose intersticial e a graus mais avançados de nefropatia crônica. A expressão de macrófagos e TNF- α correlacionaram-se com a expressão do VEGF³².

Objetivo

Nosso objetivo foi estudar os capilares peritubulares na nefropatia crônica do enxerto e na nefrotoxicidade através do marcador de imunohistoquímica CD34 e do VEGF. Também foram feitas correlações entre os fatores entre si e com parâmetros clínicos de seguimento dos pacientes.

Casuística e Métodos

O grupo de estudo foi a coorte histórica de pacientes transplantados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp no período de junho 1987 a dezembro 2004. Nesse período foram realizados 245 transplantes renais.

Do total de pacientes transplantados no Serviço foram selecionados todos os casos que evoluíram com disfunção crônica do enxerto, submetidos à biópsia renal e que consentiram no estudo (n=79). As biópsias foram indicadas no seguimento clínico desses pacientes, devido à alteração de função renal (creatinina > 1,4mg/dl) e/ou proteinúria no pós-transplante tardio (após 6 meses). O diagnóstico anátomo-patológico da nefropatia foi baseado em critérios definidos internacionalmente pela classificação de Banff³³. De acordo com a classificação de Banff, consideramos nefropatia crônica do enxerto a presença de fibrose intersticial, atrofia tubular e fibrose da íntima das artérias de pequeno e médio calibre podendo ou não haver acometimento glomerular com lesões variadas e duplicidade da membrana basal. A presença de

alterações na parede dos vasos em paciente fazendo uso de inibidores da calcineurina caracterizou nefrotoxicidade crônica pela ciclosporina.

Do total de casos de disfunção, 55 preencheram os critérios histológicos de Banff e tiveram material suficiente para a análise histológica. Todos os casos excluídos (n=24) foram devido a material insuficiente para histologia.

As biópsias realizadas no intra-operatório (tempo zero), após revascularização, foram consideradas como controle e cujo diagnóstico era de rim normal. Foram avaliadas todas as biópsias tempo zero que tinham material suficiente para a análise histológica. Do total, 26 biópsias de tempo zero e duas outras, com diagnóstico de necrose tubular aguda, foram selecionadas para o grupo controle. No total, obtivemos 28 casos de controle.

Assim, foram constituímos três grupos: um com nefropatia crônica do enxerto associado ou não a nefrotoxicidade pela ciclosporina (NCE, n=47), outro com toxicidade crônica pura pela ciclosporina (NTX, n=9) e o grupo controle (C, n=28). (Figura 1). O grupo de nefropatia crônica foi subdividido segundo a classificação de Banff em: nefropatia crônica do enxerto grau I (NCE I, n=14), nefropatia grau II (NCE II, n=24) e nefropatia grau III (NCE III, n=9).

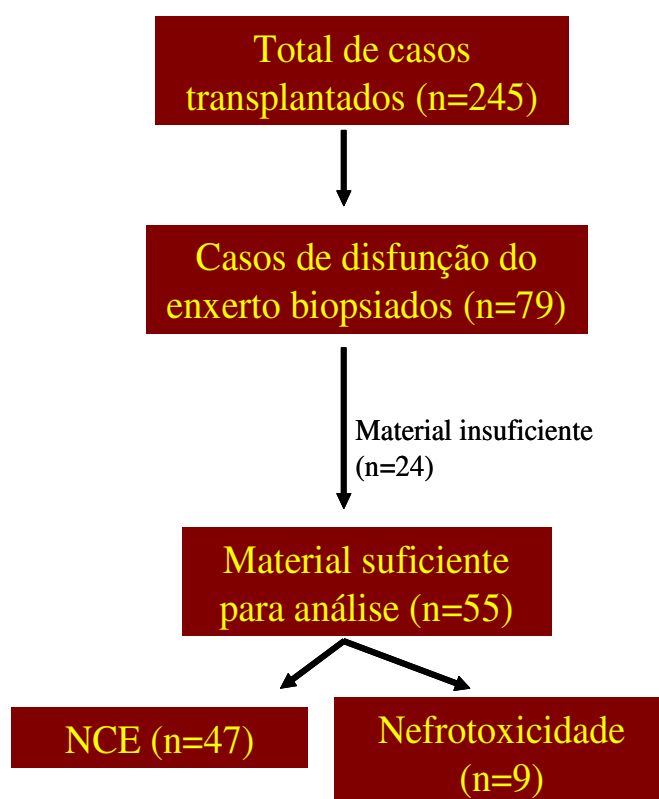


Figura 1. Metodologia de seleção de casos para a análise e distribuição em grupos

Os dados clínicos foram obtidos em protocolos gerais de seguimento. No seguimento habitual cada paciente tem no mínimo três avaliações e três coletas de exames por ano. São anotados no protocolo, desde o início do transplante, dados clínicos como creatinina, perfil lipídico, medicações e intercorrências, tais como rejeição.

Foram coletados os seguintes dados: idade no momento do transplante, sexo, doença de base, tipo de doador, creatinina ao fim de um ano, creatinina no momento da biópsia, compatibilidades (“matchs”), episódios de rejeição

celular aguda e retardo inicial da função do enxerto. Esses dados foram coletados para os grupos de nefropatia crônica e nefrotoxicidade. Para o grupo controle foi considerada apenas a creatinina inicial e a idade do doador. Definimos o retardo inicial da função do enxerto como a necessidade de diálise na primeira semana do transplante e as compatibilidades pelo número de semelhanças dos antígenos HLA das classes A, B e DR. Também foram levantados os dados de sobrevida funcional do enxerto censurando os casos de óbito.

A maior parte dos pacientes era formada por receptores de doadores vivos e o esquema de imunossupressão composto por ciclosporina, azatioprina ou micofenolato mofetil e prednisona.

Análise de Imunohistoquímica

As biópsias renais foram fixadas em Duboscq Brazil, arquivadas em bloco de parafina e cortadas com 3µm de espessura. Foram coradas pela coloração hemotoxilina-eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS), prata metenamina e tricrômico de Masson pelos métodos habituais.

A análise imunohistoquímica foi realizada com o anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo CD34 (QEnd 10; DakoCytomation), que reage com a superfície de células endoteliais e o anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo VEGF – vascular endothelial growth factor (clone VG1, codeM 7273; DakoCytomation), que reage com as seguintes isoformas do VEGF: VEGF-121, VEGF-165 e VEGF-189.

Os tecidos foram incluídos em parafina, cortados com 3µm de espessura, colocados em lâminas de vidro previamente tratadas com poly-d-lysine. As lâminas foram riscadas com diamante, cercando os cortes para a contenção dos reagentes sobre o tecido e deixadas em estufa a 56°C por uma noite. Em seguida foram desparafinadas em 3 cubas com xilol por 5 minutos e hidratadas

em 4 cubas com álcool etílico absoluto e lavadas em água. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada a 3%.

Para recuperação dos epítomos foi utilizado o método de aquecimento em tampão citrato 10mmol/L, pH 6.0 para o CD34 e calor (forno de microondas) em solução de EDTA 0,037%, pH 9.0 para o VEGF.

As lâminas foram então transferidas para bandejas especiais de imuno-histoquímica, recebendo o anticorpo primário CD34 na diluição de 1:50 e VEGF 1:100 ficando assim incubadas em sistema overnight.

Depois da retirada do anticorpo primário por meio de lavagem com PBS (solução salina tamponada) foram feitas sensibilização antigênica e incubação com o kit Dako LSAB+ system-HRP (DakoCytomation). Os tecidos assim receberam os reagentes secundários (biotinilado universal) por 30 minutos e logo após o reagente terciário (streptavidina) também por 30 minutos. A revelação foi realizada com cromógeno DAB (diaminobenzidine) por 5 minutos. A contra coloração foi realizado com hematoxilina segundo Mayer.

Para a interpretação dos resultados, foi utilizado analisador de imagem (Leica QWin Standard, ver 3.1.0/2004) e as medidas feitas por um único observador. Para cada lâmina foi feita a leitura de 10 campos consecutivos em aumento de 400x (campos de 234µm x 310µm) sem conhecimento prévio do grupo que foi posteriormente classificado (Figura 2 e 3). A quantificação foi

realizada utilizando a ferramenta de cálculo de área (interactive measurements, draw área em μm^2) de forma manual circundando as regiões coradas pelos marcadores de imuno-histoquímica. Para os capilares peritubulares foi medida a área total dos pequenos capilares corados pelo CD34, circundando de forma manual a área corada pelo marcador, sem considerar os grandes vasos e o glomérulo. O número total dos capilares por campo foi anotado. Para o marcador VEGF foi feita a medida, também de forma manual, da área dos túbulos renais que expressão o marcador, desconsiderando o glomérulo e o interstício. O número total de túbulos renais que expressam fortemente o marcador foi anotado por campo. Cada unidade de amostra para o CD34 e para o VEGF foi representada pelo somatório dos 10 campos em aumento 400x e expressos em μm^2 para a área total. O número de túbulos que expressão VEGF e o número de capilares peritubulares, também foram calculados para cada lâmina como o somatório dos 10 campos e expressos em número/ 725mm^2 .

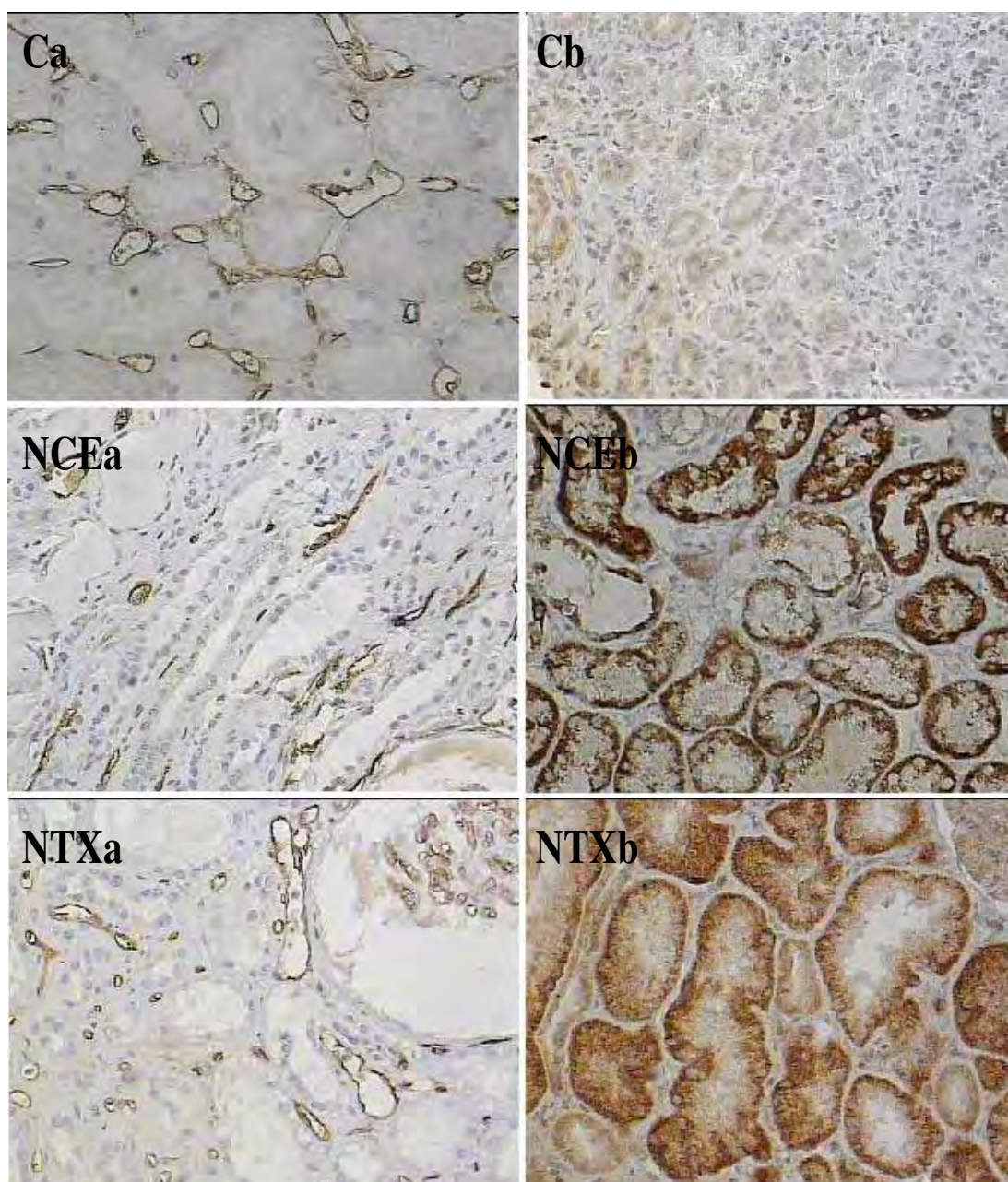


Figura 2: Expressão dos marcadores CD34 e VEGF por imunohistoquímica (IH – 400x). Do lado **a** temos a expressão do CD34 que cora em preto os capilares e do lado **b** o marcador VEGF que cora em marrom os túbulos. Notamos redução dos capilares peritubulares na NCEa e NTXa e um número mais expressivo em Ca. Os túbulos expressão mais VEGF na NCEb e NTXb e menos na Cb.

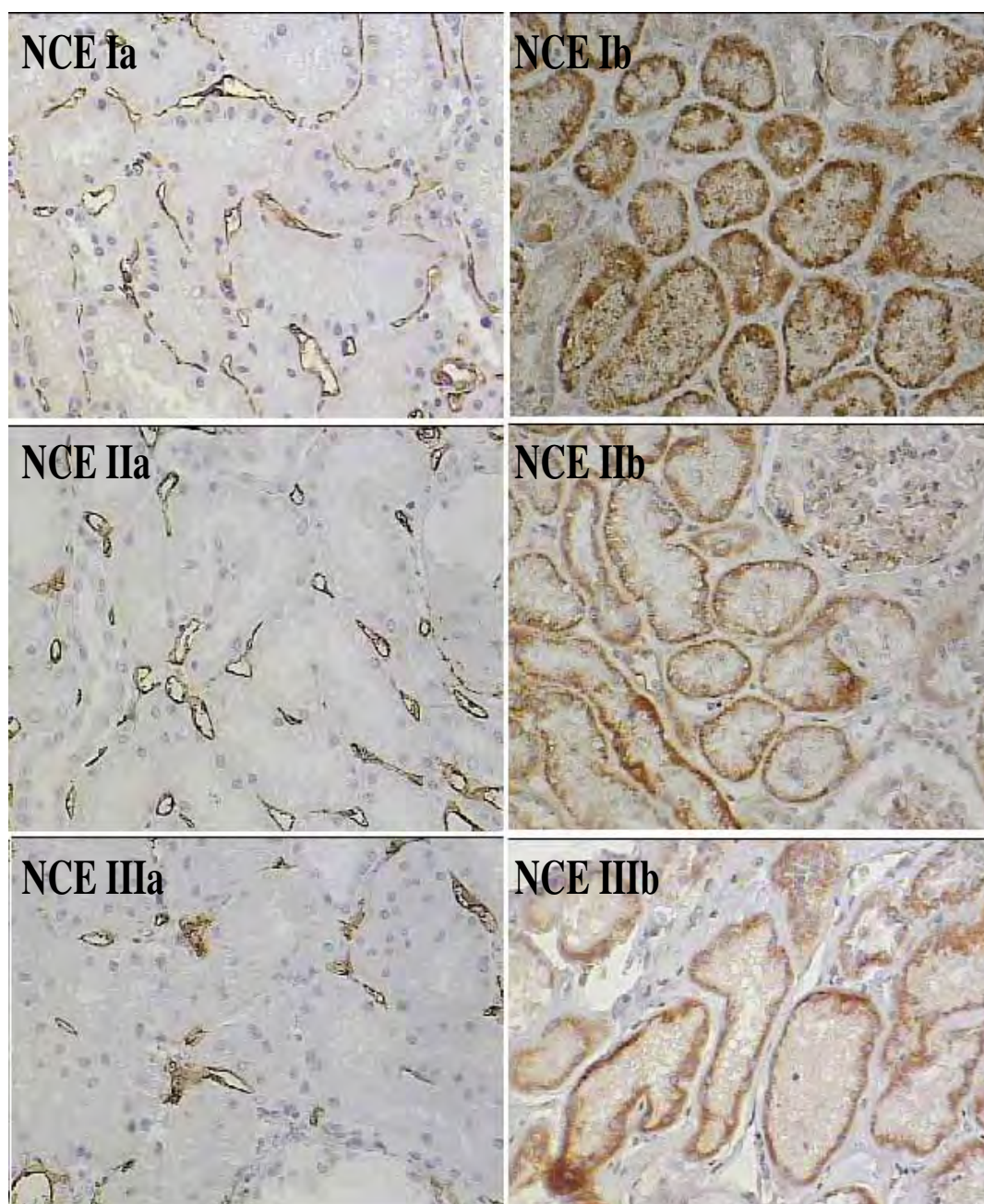


Figura 3: Expressão dos marcadores CD34 e VEGF por imunohistoquímica (IH – 400x). Do lado a temos a expressão do CD34 que cora em preto os capilares e do lado b o marcador VEGF que cora em marrom os túbulos. Notamos redução dos capilares peritubulares na NCEIIa e NCE IIIa. Os túbulos expressão menos VEGF na NCE IIb e NCE IIIb e mais intenso em NCEIb

Estatística

Para a análise estatística consideramos como significância o valor de 5% ($p < 0.05$). Para comparações de variáveis quantitativas paramétricas entre três ou mais grupos foram utilizados a análise de uma via de ANOVA com a correção de Bonferroni e os dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Para a análise de variáveis não paramétricas foi feita a análise de variância de Kruskal-Wallis com a correção de Dunn's e os dados expressos pela mediana e percentis 25 e 75%. Para correlações com as variáveis clínicas foi utilizada a correlação de Spearman Rank e consideramos os grupos de nefropatia crônica somada ao grupo de nefrotoxicidade. Para as análises de sobrevida do enxerto foi utilizado o método de Kaplan-Meier com log-rank test, e considerados os grupos de nefropatia crônica do enxerto somado ao grupo de nefrotoxicidade. Para a construção da curva de sobrevida consideramos faixas de divisão abaixo do percentil 25 do controle como baixa expressão do marcador, entre os percentis 25 e 75 como expressão normal e acima do percentil 75 como alta expressão. Foram analisadas as sobrevidas funcionais do enxerto censurado o óbito.

Resultados

Características Clínicas dos Grupos

Os pacientes do grupo de nefropatia crônica do enxerto tinham média de idade de $30,6 \pm 13,4$ anos, eram do sexo masculino em 66% do total, sendo que 64% eram doadores vivos. A doença de base foi: glomerulopatia em 53% dos casos, indeterminada em 17%, hipertensiva em 11% e outros em 19%. Apresentaram episódios de rejeição celular aguda em 36% e tiveram retardo inicial da função do enxerto em 27% do total. A creatinina média do grupo ao fim de 1 ano de transplante foi de $1,7 \pm 0,78$ mg/dl e no momento da biópsia foi de $2,71 \pm 1,68$ mg/dl. O número de compatibilidades (matches) foi de $2,9 \pm 1$. (Tabela 1).

Os pacientes do grupo de nefrotoxicidade crônica pela ciclosporina tinham média de idade de $24,8 \pm 14,9$ anos, eram do sexo masculino em 78% do total sendo que todos os casos eram de doadores vivos. A doença de base

foi: 22% glomerulopatia, 22% hipertensiva, 22% etiologia indeterminada e outras em 34% dos casos. Apresentaram episódios de rejeição celular aguda em 44% dos casos e em nenhum caso houve retardo inicial da função do enxerto. A creatinina média do grupo foi de $1,6 \pm 0,28$ mg/dl ao fim de um ano de transplante e $3,91 \pm 1,3$ mg/dl no momento da biópsia. O número de compatibilidades foi de $3 \pm 0,3$. (Tabela 1).

O grupo controle teve média de creatinina no momento da biópsia de $1,31 \pm 1,45$ mg/dl, $p < 0.05$ em relação ao NCE e NTX. (Tabela 1).

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes transplantados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu nos grupos de nefropatia crônica do enxerto, nefrotoxicidade e controle.

	NCE	Nefrotoxicidade	Controle
	(n=47)	(n=9)	(n=28)
Idade (anos)	30 ±13,4	24,8 ± 14,9	38±11
Creatinina na Biópsia (mg/dl)	2,71±1,68	3,91±13	1,37±1,45 *
Creatinina 1 ano pós Tx (mg/dl)	1,7±0,78	1,6±0,28	
Tempo da biópsia (meses)	65,69±52	43,33±49,83	
Sexo masculino (%)	66	78	
Doadores vivos (%)	64	100	
Rejeição celular aguda (%)	36	44	
Retardo inicial da função (%)	27	0	
Machts (número)	2,9±1	3±0,3	

* p<0.05 x NCE e nefrotoxicidade

Análises Morfométricas

Análise de CD34

Observamos uma diminuição na área total dos capilares peritubulares nos grupos de nefropatia crônica do enxerto (23.086,7 [15.115,4 – 33.691,3] μm^2) e nefrotoxicidade (28.598,4 [23.099,3 – 35.335,4] μm^2) em relação ao grupo controle (45.888,4 [37.562,8 – 56.317,0] μm^2). A redução observada nos grupos de nefropatia e nefrotoxicidade foi significativa, quando comparadas ao controle. (Tabela 2, Figura 4).

Resultado semelhante foi observado quando se avaliou o número total de capilares peritubulares que apresentaram redução no grupo de nefropatia crônica do enxerto ($200,1 \pm 63,1$) e na nefrotoxicidade ($221,4 \pm 55,7$) em relação ao controle ($330,1 \pm 45,8$). Essas diferenças dos grupos nefropatia e nefrotoxicidade também apresentaram significância estatística quando comparadas ao controle. (Tabela 2).

Tabela 2. Área Total e número de capilares peritubulares que expressam CD34 nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto e nefrotoxicidade.

	Área total CD34 (μm^2) ^κ	Número de capilares ^λ (capilares/725mm ²)
Controle (n=28)	45.888,4 [37.562,8 – 56.317,0]	330,1 ± 45,8
NCE (n=47)	23.086,7 [15.115,4 – 33.691,3] *	200,1 ± 63,1 *
Nefrotoxicidade (n=9)	28.598,4 [23.099,3 – 35.335,4] *	221,4 ± 55,7 *

* p<0.05 x controle. Dados expressos em: ^κ Mediana [percentil 25 e 75%]; ^λ média ± desvio padrão

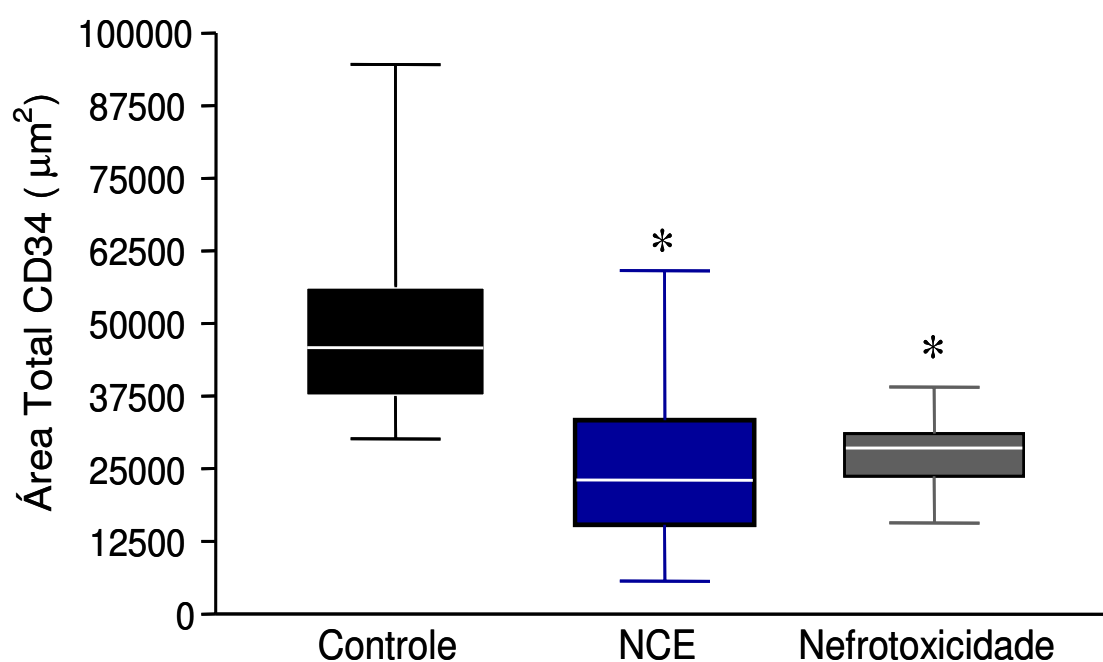


Figura 4: Área total de expressão de CD34 nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto e nefrotoxicidade. * p<0.05 x controle

Quando analisamos os subgrupos de nefropatia crônica do enxerto, observamos uma diminuição da área total de expressão de CD34 com a progressão da nefropatia crônica do enxerto: nefropatia crônica grau I ($30.282,7 [20.570,9 - 37.128,1] \mu\text{m}^2$), nefropatia crônica grau II ($24.712,3 [18.223,5 - 32.513,0] \mu\text{m}^2$) e nefropatia crônica grau III ($10.387,1 [8.325,0 - 18.569,8] \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo controle ($45.888,4 [37.562,8 - 56.317,0] \mu\text{m}^2$). Essa diferença foi significativa entre os grupos (NCE I, NCE II e NCE III) quando comparadas ao controle, e não entre si. No grupo de nefrotoxicidade ($28.598,4 [23.099,3 - 35.335,4] \mu\text{m}^2$), como já mostrado houve redução em relação ao grupo controle de modo significativo, porém não entre ou vários grupos de nefropatia. (Tabela 3, Figura 5).

Também, na análise total de capilares peritubulares, houve progressiva diminuição do seu número total nos diversos graus de nefropatia: nefropatia crônica grau I ($226,3 \pm 44,1$), nefropatia crônica grau II ($204,5 \pm 47,6$) e nefropatia crônica grau III ($147,7 \pm 94,2$) em relação ao controle ($330,1 \pm 45,8$). Houve diferença estatística entre os grupos com relação ao controle. Na nefrotoxicidade ($221,4 \pm 55,7$) houve redução, em relação ao controle e ao grupo III. No grupo de nefropatia crônica grau III houve também redução significativa em relação aos grupos I e II. (Tabela 3).

Tabela 3. Área Total e número de capilares peritubulares que expressam CD34 nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto grau I, II, III e nefrotoxicidade.

	Área total CD34 (μm^2) ^κ	Número de capilares ^λ (capilares/725mm ²)
Controle (n=28)	45.888,4 [37.562,8 – 56.317,0]	330,1 ± 45,8
NCE I (n=14)	30.282,7 [20.570,9 – 37.128,1] *	226,3 ± 44,1 *
NCE II (n=24)	24.712,3 [18.223,5 – 32.513,0] *	204,5 ± 47,6 *
NCE III (n=9)	10.387,1 [8.325,0 – 18.569,8] *	147,7 ± 94,2 * ⁺
Nefrotoxicidade (n=9)	28.598,4 [23.099,3 – 35.335,4] *	221,4 ± 55,7 *

* p<0.05 x controle, ⁺ p<0.05 x NCE I, NCE II e Nefrotoxicidade. Dados expressos em: ^κ Mediana [percentil 25 e 75%]; ^λ média ± desvio padrão

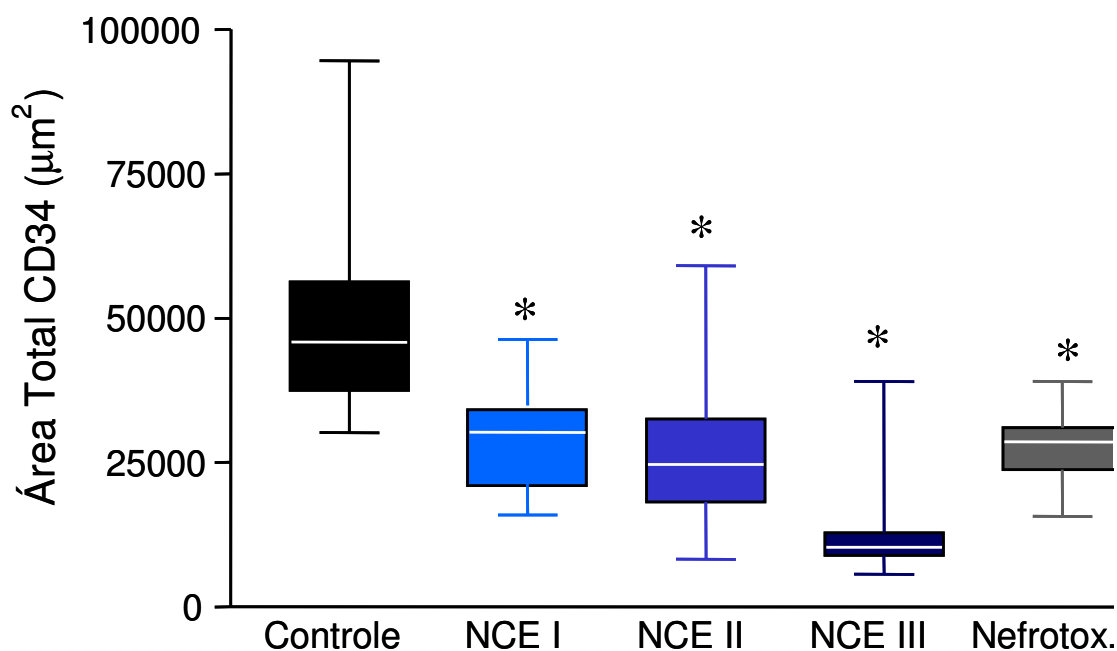


Figura 5: Área total de expressão de CD34 nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto grau I, II, III e nefrotoxicidade. * p<0.05 x controle

Análise de VEGF

A análise de VEGF mostra um aumento da área total de expressão do marcador no grupo de nefropatia crônica do enxerto (90.060,3 [46.236,6 – 121.792,7] μm^2) e no grupo de nefrotoxicidade (110.152,4 [33.284,1 – 130.287,2] μm^2) em relação ao controle (33.099,4 [18.235,9 – 47.647,4] μm^2). O aumento observado de expressão de VEGF foi significativo nesses dois grupos em relação ao controle. (Tabela 4, Figura 6).

O número total de túbulos renais que expressaram VEGF também aumentou nos grupos de nefropatia crônica (76,0 [56,0 – 100,8]) e nefrotoxicidade (92,0 [44,3 – 106,3]) em relação ao controle (44,5 [29,5 – 54,0]). Também houve diferença estatística entre esses grupos e o controle. (Tabela 4).

Tabela 4. Área Total e número de túbulos renais que expressam VEGF nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto e nefrotoxicidade.

	Área total VEGF (μm^2)	Número de túbulos (túbulos/ 725mm^2)
Controle (n=28)	33.099,4 [18.235,9 – 47.647,4]	44,5 [29,5 – 54,0]
NCE (n=47)	90.060,3 [46.236,6 – 121.792,7] *	76,0 [56,0 – 100,8] *
Nefrotoxicidade (n=9)	110.152,4 [33.284,1 – 130.287,2] *	92,0 [44,3 – 106,3] *

* $p < 0.05$ x controle. Dados expressos em Mediana [percentil 25 e 75%]

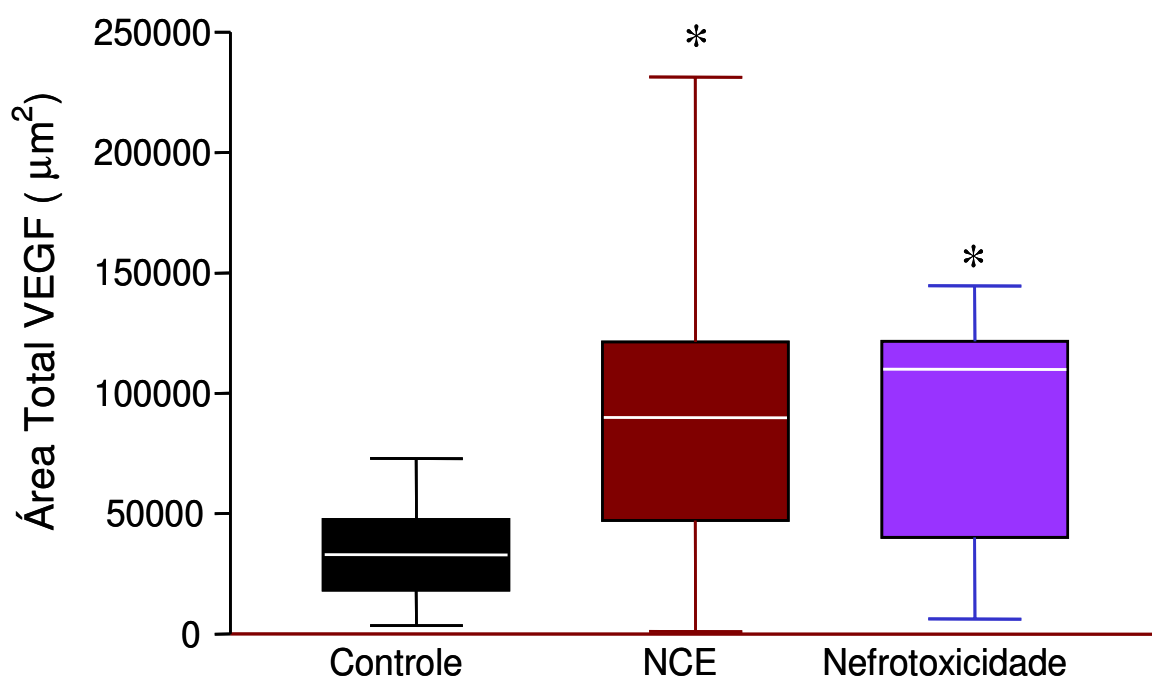


Figura 6: Área total de expressão de VEGF nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto e nefrotoxicidade. * $p < 0.05$ x controle

Quando subdividimos os grupos de nefropatia crônica do enxerto, observamos um importante aumento da área de expressão de VEGF no grupo de nefropatia crônica grau I (130.383,8 [90.060,3 – 183.621,5] μm^2) e na nefrotoxicidade (110.152,4 [33.284,1 – 130.287,2] μm^2) e um aumento menos expressivo nas demais classes: nefropatia grau II (90.312,7 [52.327,3 – 105.063,9] μm^2) e nefropatia grau III (45.265,5 [29.726,6 – 72.801,2] μm^2) em relação ao grupo controle (33.099,4 [18.235,9 – 47.647,4] μm^2). Houve diferença estatística da nefrotoxicidade e da nefropatia grau I e II em relação ao controle e o mesmo não foram observados na nefropatia crônica grau III. (Tabela 5, Figura 7).

Ao analisarmos o número de túbulos que expressam VEGF, observamos um resultado semelhante com um importante aumento da expressão no número total na nefropatia crônica grau I (103,0 [82,0 – 120,0]) e na nefrotoxicidade (92,0 [44,3 – 106,3]) com aumento menos pronunciado nas classes II (74,0 [59,0 – 93,0]) e III (56,0 [37,8 – 69,3]) em relação ao controle (44,5 [29,5 – 54,0]). Os grupos de nefropatia grau I, II e a nefrotoxicidade apresentaram diferença estatística em relação ao controle. (Tabela 5).

Tabela 5. Área Total e número de túbulos renais que expressam VEGF nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto grau I, II, III e nefrotoxicidade.

	Área total VEGF(μm^2)	Número de túbulos (túbulos/725 mm^2)
Controle (n=28)	33.099,4 [18.235,9 – 47.647,4]	44,5 [29,5 – 54,0]
NCE I (n=14)	130.383,8 [90.060,3 – 183.621,5] *	103,0 [82,0 – 120,0] *
NCE II (n=24)	90.312,7 [52.327,3 – 105.063,9] *	74,0 [59,0 – 93,0] *
NCE III (n=9)	45.265,5 [29.726,6 – 72.801,2]	56,0 [37,8 – 69,3]
Nefrotoxicidade (n=9)	110.152,4 [33.284,1 – 130.287,2] *	92,0 [44,3 – 106,3] *

* $p < 0.05$ x controle. Dados expressos em Mediana [percentil 25 e 75%]

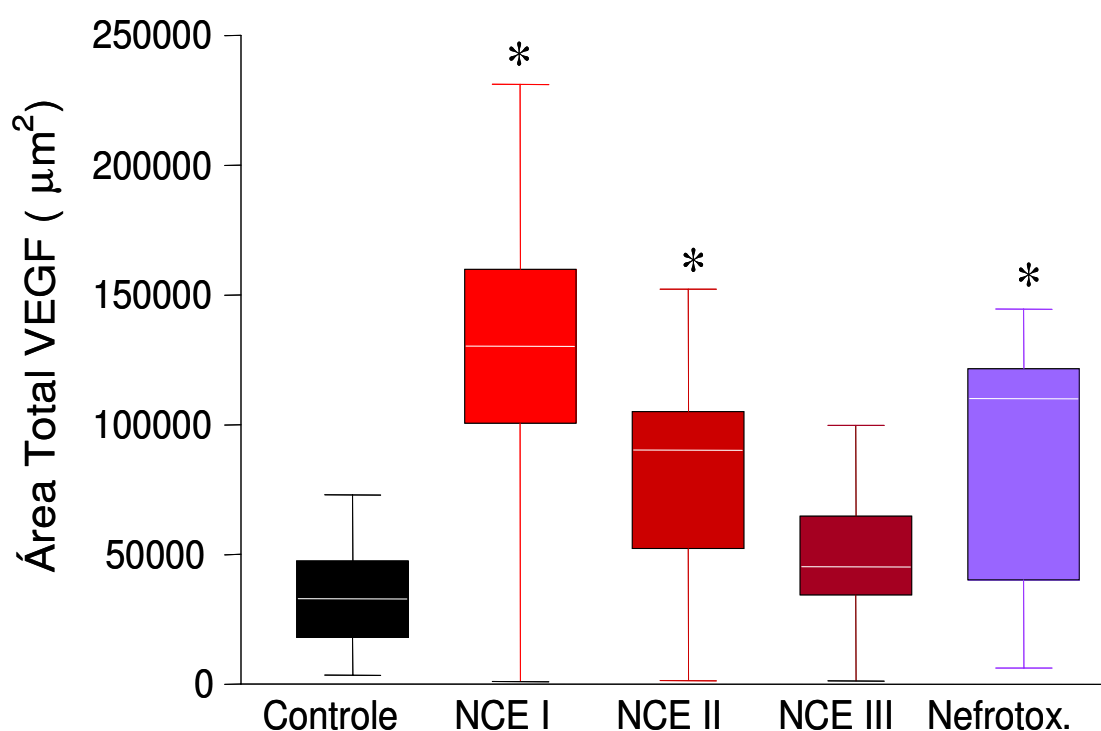


Figura 7: Área total de expressão de VEGF nos grupos controle, nefropatia crônica do enxerto grau I, II, III e nefrotoxicidade. * $p < 0.05$ x controle

Fazendo-se uma análise de correlação entre a expressão de CD34 e a do fator VEGF em todos os grupos estudados: controle, nefropatia crônica e nefrotoxicidade, observamos uma correlação negativa entre os fatores, $r = -0,41$, $p < 0.0001$. (Figura 8).

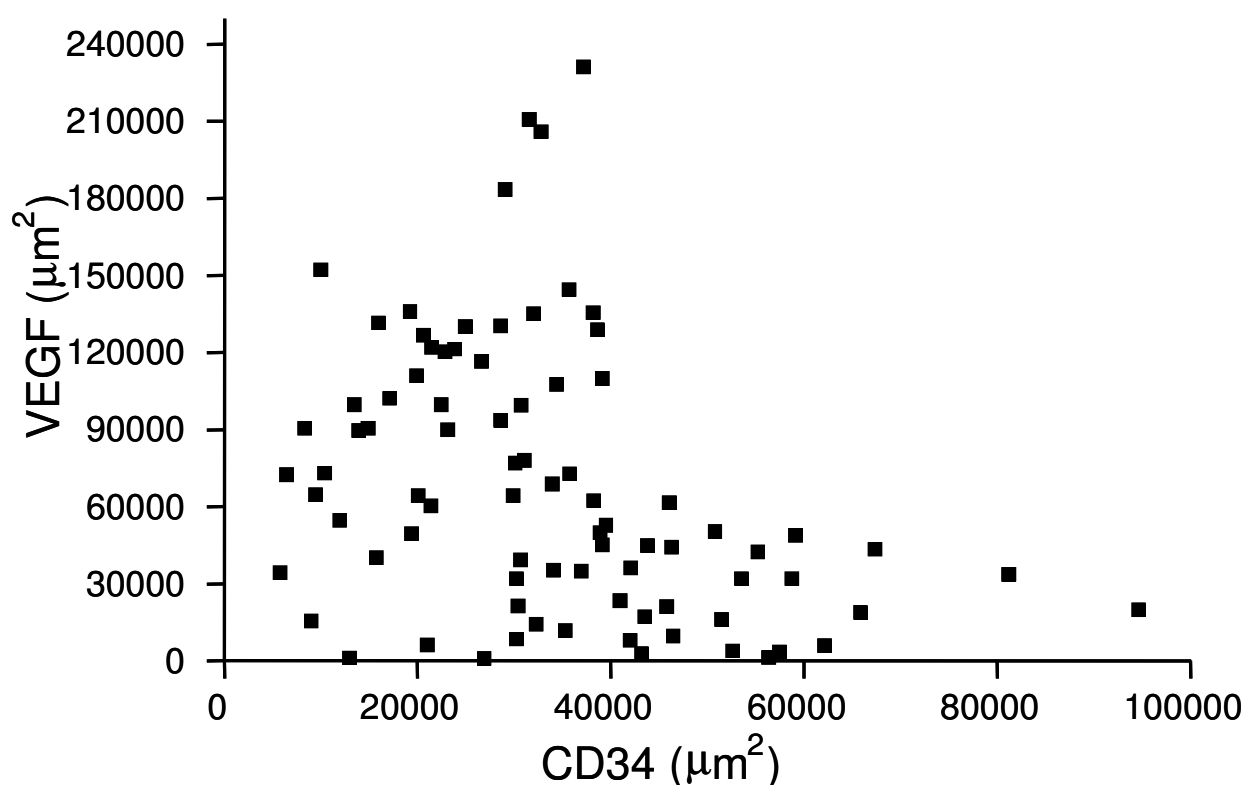


Figura 8: Gráfico de dispersão entre CD34 e VEGF nos grupos controle, NCE e NTX, $p < 0.0001$

Correlações Clínico Morfológicas

Obtivemos associações com os parâmetros clínicos, quando analisamos a expressão de CD34 nos grupos de nefropatia crônica do enxerto somado ao grupo de nefrotoxicidade.

Houve associação entre idade do receptor no momento do transplante com a expressão de CD34, mostrando uma redução progressiva da área total de CD34 com o aumento da idade ($r=-0,35$, $p=0.007$). (Figura 9).

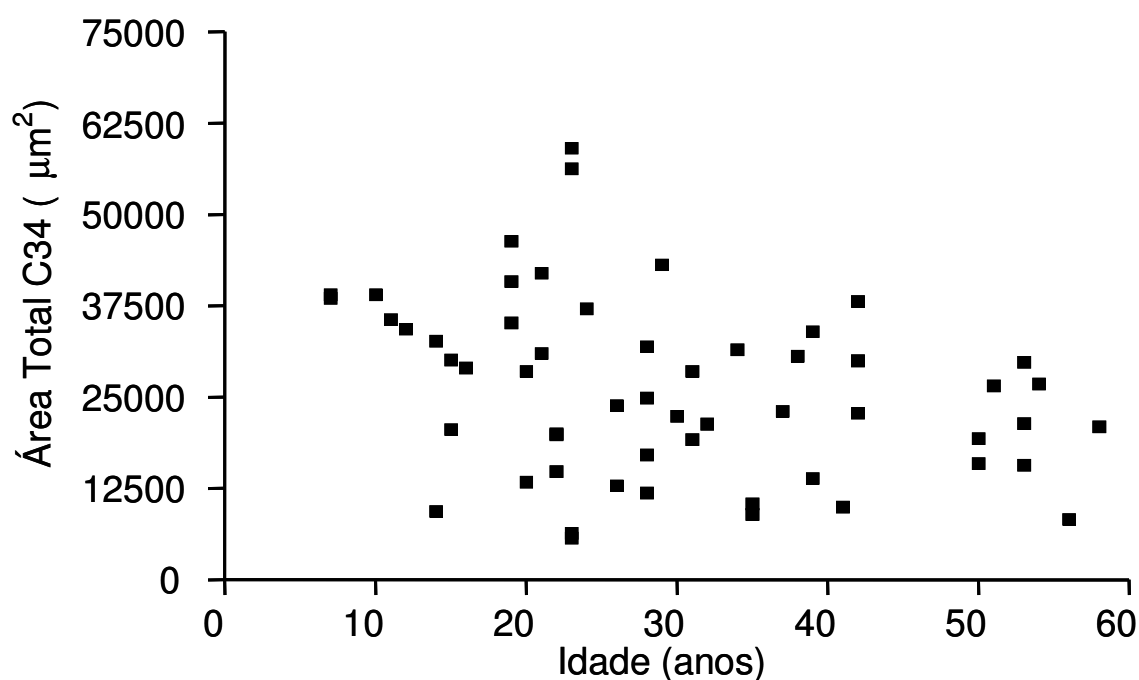


Figura 9: Gráfico de dispersão entre idade no momento do transplante com a área total de CD34 nos grupos de NCE e Nefrotoxicidade. $P<0.05$

O número de episódios de rejeição celular aguda também se associou com a área de expressão de CD34, mostrando redução da área total de CD34 com o aumento do número de episódios de rejeição celular aguda ($p=0.005$). (Figura 10).

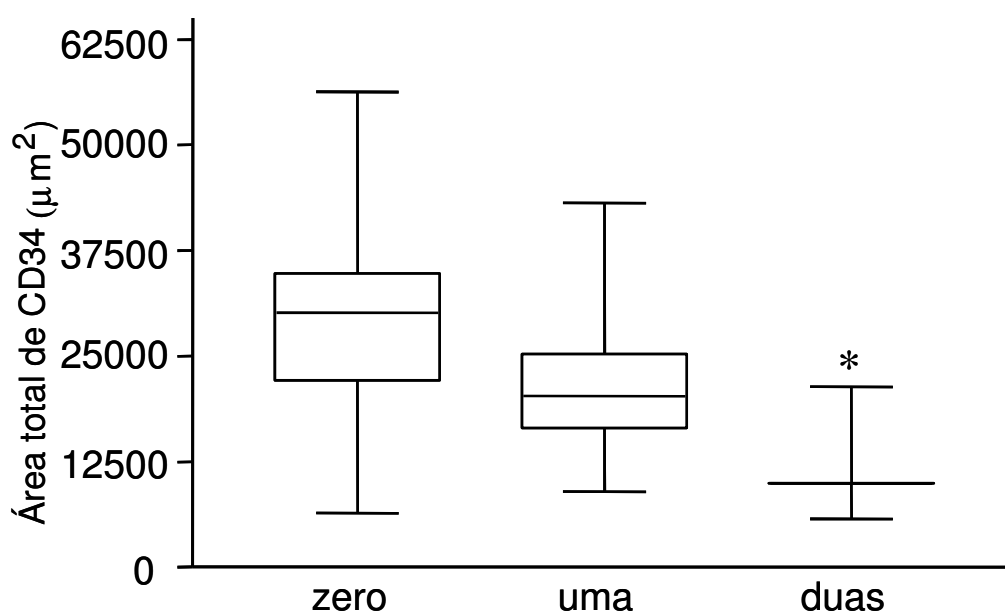


Figura 10: Associação entre área de expressão de CD34 e o número de episódios de rejeição celular aguda. * $p<0.05$ x zero.

Não houve associação entre creatinina no momento da biópsia ($r = -0,09$) e ao fim de um ano ($r = -0,226$), número de compatibilidades ($r = -0,126$), e retardo de função do enxerto ($r = -0,04$) com a expressão de CD34.

Para a associação do VEGF com parâmetros clínicos consideramos, da mesma forma que a análise anterior, os grupos de nefropatia crônica do enxerto somado ao grupo de nefrotoxicidade.

Não houve associação da expressão de VEGF com os parâmetros clínicos de idade do paciente, número de compatibilidades, número de rejeições, retardo de função do enxerto, creatinina ao fim de um ano e no momento da biópsia.

Análise de Sobrevida do enxerto

Para o marcador CD34, a expressão dentro das faixas de normalidade, quando somado os grupos de nefropatia e nefrotoxicidade, foram: CD34 baixo e CD34 normal. A curva de sobrevida funcional do enxerto para o grupo de CD34 baixo foi menor quando comparada ao controle, porém sem significância estatística entre os grupos. Sobrevida em 1 e 5 anos para os grupos CD34 baixo e normal respectivamente: 84% e 72,5%; 100% e 89%. (Figura 11).

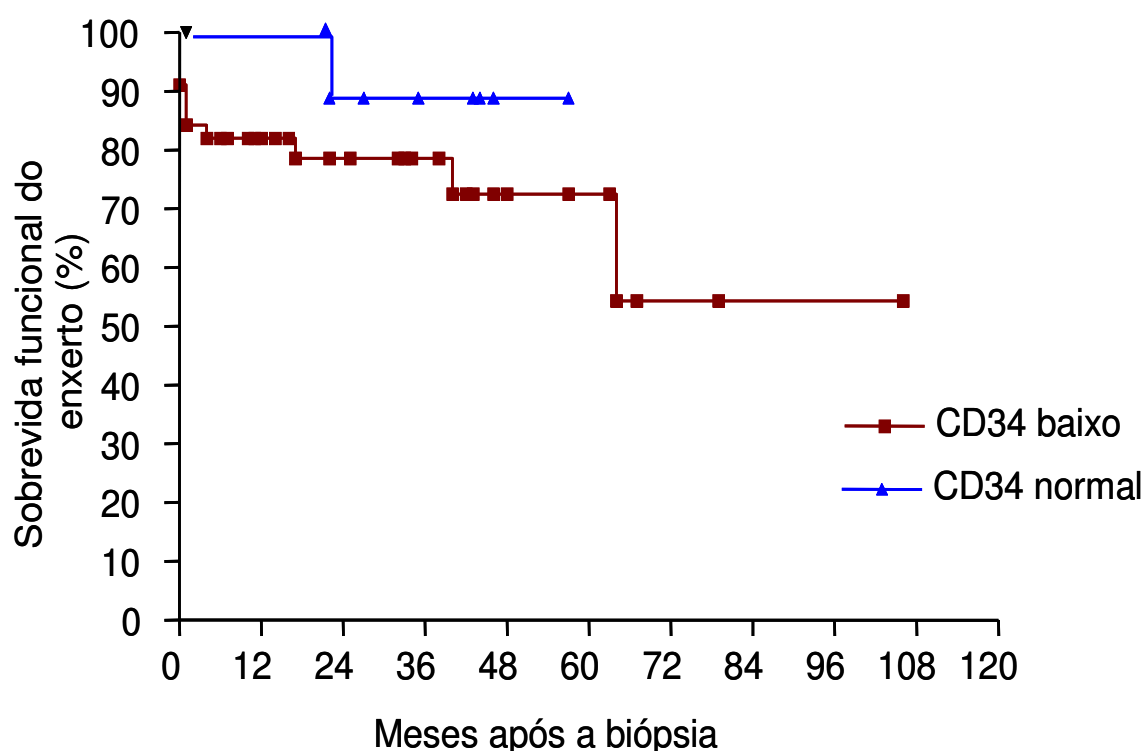


Figura 11. Sobrevida funcional do enxerto nos grupos de NCE e nefrotoxicidade segundo a expressão de CD34: alto e baixo. $p > 0.05$

Para o VEGF notamos na análise em conjunto dos grupos de nefropatia e nefrotoxicidade três divisões segundo os percentis do controle: expressão reduzida, expressão normal e expressão elevada. A análise de sobrevida mostrou que o grupo que expressou VEGF normal teve a melhor sobrevida. Já o grupo de VEGF aumentado teve sobrevida menor e o VEGF baixo a pior sobrevida. A sobrevida ao fim de um ano respectivamente para os grupos de VEGF normal, elevado e baixo: 100%, 87% e 66%. Sobrevida ao fim de 5 anos para os mesmos grupos respectivamente: 100%, 78,2% e 40%. (Figura 12).

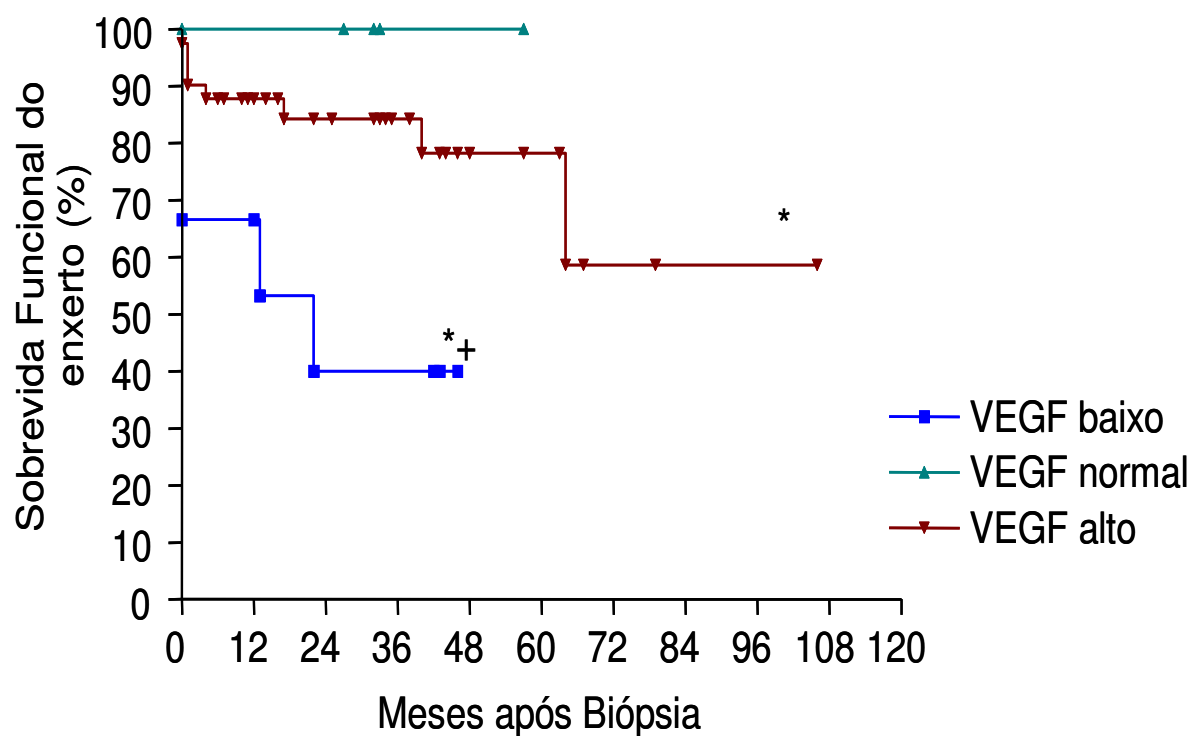


Figura 12. Sobrevida funcional do enxerto pós Biópsia renal nos grupos de NCE e nefrotoxicidade segundo expressão de VEGF: baixo, normal e alto.

* $p < 0.05$ x VEGF normal. + $p < 0.05$ x VEGF alto

Discussão

No presente estudo, notamos que na nefropatia crônica do enxerto e na nefrotoxicidade há uma redução progressiva da microcirculação renal evidenciada pela perda dos capilares peritubulares. Essa redução tem papel importante na progressão da nefropatia e se correlacionam com o grau de possíveis lesões sofridas pelo enxerto. As lesões foram analisadas pela idade do receptor e por episódios de rejeição celular aguda que mostraram correlações negativas com a área de expressão do marcador CD34. A idade do receptor pode agregar comorbidades como hipertensão arterial e diabetes e ser responsável pela redução da microcirculação. Já, os episódios de rejeição poderiam levar a destruição de áreas do túbulo e interstício com perdas nos capilares peritubulares.

Assim com a progressão da nefropatia, presença de nefrotoxicidade, episódios de rejeição e idade avançada resultaram em redução na microcirculação renal. A curva de Kaplan-Meier aponta para uma melhor sobrevida dos pacientes que apresentaram expressão normal de CD34, apesar

de não atingir significância estatística devido ao pequeno número de pacientes na faixa de CD34 normal.

Nos estudos de nefropatia crônica do enxerto, a redução dos capilares peritubulares foi observada em diversos modelos. Nesses estudos, a redução dos capilares foi evidenciada por diversos métodos: através de microscopia eletrônica¹⁶, por imunohistoquímica com o marcador CD34²² e através da coloração de Masson³⁴. Em outras nefropatias também foram observadas as reduções dos capilares peritubulares¹⁹⁻²⁰.

Os capilares peritubulares têm papel fundamental no suprimento de oxigênio para as células do túbulo e interstício e sua redução estimula a produção de fibroblastos, matriz e citocinas levando a fibrose, contribuindo para a progressão da lesão renal¹³⁻¹⁵. Assim a sua diminuição resulta em hipóxia e leva a produção dos fatores estimulantes da fibrogênese através dos fatores induzidos pela hipóxia (HIF-1)³⁵.

O fator HIF-1, também estimula a produção de TGF- β , inibidores de metaloproteinases e transdiferenciação epitélio mesenquimal com conseqüente progressão da lesão renal. O mecanismo de estímulo de produção de citocinas pelo HIF-1 não está completamente elucidado e sabe-se que o HIF-1 também estimula a produção de VEGF e eritropoetina dentre outros³⁵⁻³⁷.

O VEGF está associado a macrófagos e produção de TGF- β nos tecidos de enxertos renais^{30,32}. Postulamos uma associação entre a redução de capilares peritubulares levando a hipóxia e conseqüente produção do fator induzido pela hipóxia (HIF-1). Como resultado ocorreria a produção de VEGF que leva ao acúmulo de macrófagos, produção de TGF- β e conseqüente fibrose. A relação da hipóxia com o fator VEGF pode ser demonstrada pelo aumento da expressão do VEGF no epitélio dos túbulos em pacientes com lesões renais vasculares de hipofluxo como rejeição vascular, nefroesclerose ou nefropatia diabética³⁸.

No presente estudo, observamos um aumento da expressão do VEGF nos grupos de nefropatia crônica e nefrotoxicidade. O resultado encontrado está de acordo com trabalhos em nefropatia crônica do enxerto que sugerem aumento da expressão do marcador na nefropatia^{30,32}. Em modelos animais de nefropatia crônica também foi observado aumento da expressão de VEGF com a redução da massa renal³⁹. Assim, o aumento da produção do VEGF poderia ocorrer como resultado da redução dos capilares peritubulares com conseqüente hipóxia através do HIF-1.

Condizente com essa hipótese, no modelo de nefropatia por adriamicina em camundongos BALB/c houve um aumento da expressão do fator HIF-1 com a progressão da lesão renal em 7, 14 e 28 dias coincidente com a redução

dos capilares peritubulares, analisados pelo CD34. A expressão de HIF-1 foi associada à presença de macrófagos e linfócitos CD4 e CD8. Nesse modelo, entretanto, não houve aumento da expressão do VEGF possivelmente pelo aumento mais significativo da expressão de HIF-1 apenas no fim do estudo (28º dia)⁴⁰.

No presente estudo, quando analisamos os subgrupos de nefropatia crônica do enxerto, a expressão de VEGF, apresentou um comportamento bimodal com nítido aumento no início da agressão (nefropatia grau I) e progressiva diminuição com o avanço da lesão renal.

Esse resultado sugere uma heterogeneidade de resposta do VEGF o que leva a uma expressão diferenciada em diversos graus de agressão e estágios da nefropatia. No estudo de Özdemir et al, a função do enxerto nos primeiros 6 meses foi melhor nos pacientes com aumento de expressão de VEGF tubular o que a longo prazo e se correlacionou com fibrose³². Muitos estudos apontam para um efeito deletério do bloqueio do VEGF frente a um agressor em modelos de nefrotoxicidade por ciclosporina ou toxicidade celular²⁸⁻²⁹. A redução observada do VEGF na nefropatia crônica Banff III também poderia ser decorrente da extensa destruição tubular e da fibrose presente nesse estágio da nefropatia.

No presente estudo, a curva de Kaplan-Meier, mostrou uma redução da sobrevida do enxerto nas biópsias dos pacientes com VEGF elevado, sendo a melhor sobrevida a observada nas faixas de expressão normal de VEGF. O grupo de pior sobrevida foi o que apresentou redução da expressão do fator. Esse resultado pode sugerir que sua ausência também é deletéria.

Obtivemos uma correlação negativa entre CD34 e o VEGF de tal forma que com a redução da área de expressão de CD34 ocorre um aumento da expressão do VEGF. Assim, no início da lesão renal, ocorre a redução dos capilares peritubulares e conseqüente aumento da produção do VEGF provavelmente em resposta a agressão sofrida. O aumento da expressão do VEGF se traduz clinicamente como a piora da sobrevida renal. Com a progressão da agressão ocorre então, uma redução do VEGF. Essa redução se traduz como piora adicional da sobrevida do enxerto. Assim, acreditamos que o aumento do VEGF, em fases iniciais da nefropatia contribui de forma muito mais importante como estímulo pró-inflamatório do que como fator de angiogênese. A via provável de sua ação seria pela ativação dos receptores VEGFR-1 promovendo o recrutamento de macrófagos, produção de TGF- β e fibrose. (Figura 13).

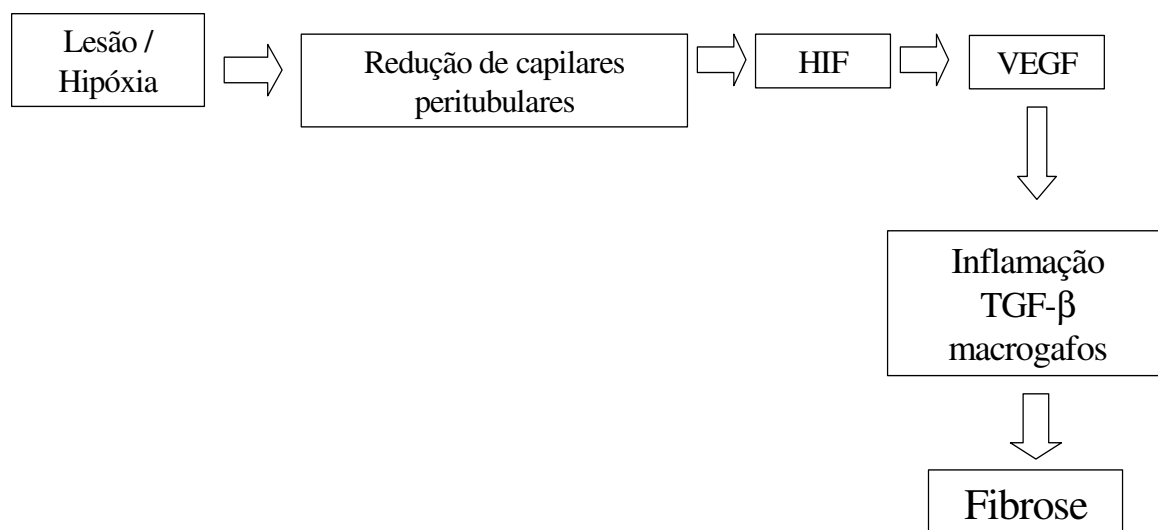


Figura 13. Modelo teórico da hipóxia levando a redução dos capilares peritubulares, produção do fator induzido pela hipóxia (HIF), aumento da produção do VEGF e estímulo quimiotático para macrófagos. A conseqüente produção de TGF- β causa inflamação resultando em lesão renal

Conclusão

Com a progressão da nefropatia crônica do enxerto e nefrotoxicidade ocorre uma progressiva redução dos capilares peritubulares que se correlacionam com a idade do receptor e a presença de episódios de rejeição celular aguda. O VEGF tem comportamento bimodal com aumento de expressão em fases iniciais e menor expressão na nefropatia grau III.

Com a agressão renal ocorre a redução dos capilares peritubulares e aumento da expressão do VEGF, que pode ser demonstrado pela correlação negativa entre os fatores. Nessa fase com o aumento da expressão do VEGF ocorre redução da sobrevida renal. Com o avanço da lesão ocorre uma redução acentuada dos capilares e diminuição da expressão do VEGF. A sobrevida renal é ainda mais reduzida.

Assim sugerimos que o VEGF é produzido em resposta a hipóxia causada pela redução da microcirculação e sua principal ação é pró-inflamatória mais do que angiogênica. O VEGF é um forte estímulo para a produção de TGF- β o que resulta em fibrose.

Há uma provável interação entre capilares peritubulares, hipóxia e produção de VEGF e os mediadores envolvidos bem como os eventos iniciais que lesam a microcirculação são assunto de futuros estudos.

Bibliografia

- 1- Paul LC. Chronic renal Transplant loss. *Kidney Int* 1995; 47:1491-1499.
- 2- Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342:65.
- 3- Tilney NL, Paul LC. Antigen-independent events leading to chronic allograft dysfunction, in *Transplantation Biology: Cellular and Molecular Aspects*, edited by Tilney NL, Strom TB, Paul LC, Philadelphia, New York, Lippincott-Raven 1996: p629.
- 4- Youhua L. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:1-12.
- 5- Badid C, Desmouliere A, Badici D, Hadj-Aissa A, McGregor B: Interstitial expression of alpha-SMA: A early marker of chronic renal allograft dysfunction. *Nephrol Dial Transplantation* 2002; 17:1993-1998.

- 6- Sayegh MH. Why do we reject a graft ? Role of indirect allorecognition in graft rejection. *Kidney Int* 1999; 56:1967-79.
- 7- James AS, Joren CM. Recent Adevances in the immunology of chronic rejection. *Curr Opin in Nephrol and Hypertens* 2002; 11:315-321.
- 8- Heinz R. Capillary Deposition of Complement Split Product C4d in Renal Allografts is Associated with Basement Membrane Injury in Peritubular and Glomerular Capillaries: A comtribution of Humoral Immunity to Chronic Allograft Rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:2371-2380.
- 9- Morris PJ. Pathology of Kidney Transplantation. In Mauiyyedi S, Colvin RB (eds). *Kidney Transplantation*. W.B Saunders 2000: p351-353
- 10- Van Saase JLCM, Van der Woude FJ, Thorogood J, Hollander AAMJ, van Es LA, Weening JJ et al: The relation between acute vascular and interstitial renal allograft rejection and subsequent chronic rejection. *Transplantation* 1995; 59:1280-1285.
- 11- Schoroeder TJ, Weiss MA, Smith RD, Stephens GW, First MR: The efficacy of OKT3 in vascular rejection. *Transplantation* 1991; 51:312-315.
- 12- Paul LC. Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney Int* 1999; 56: 783-793.

- 13- Kang DH, Joly AH, Oh SW, et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model (I): Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. J Am Soc Nephrol 2001; 12:1434-1447.
- 14- Basile DP. Rarefaction of peritubular capillaries following ischemic acute renal failure: a potential factor to progressive nephropathy. Curr Opin in Nephrol and Hypertens 2004; 13:1-7.
- 15- Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL: Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. Am J of Physiol 2001; 281:887-99.
- 16- Ivanyi B, Fahmy H, Brown H, Szenohradszky P, Halloran PF, Solez K: Peritubular capillaries in chronic allograft rejection: a quantitative ultrastructural study. Hum Pathol 2000; 31:1129-38.
- 17- Bohle A, Mackensen-Haen S, Wehrmann M. Significance of post-glomerular capillaries in the pathogenesis of chronic renal failure. Kidney Blood Press Res 1996; 19:191-195.
- 18- Kang DH, Anderson S, Kim YG, et al. Impaired angiogenesis in the angiotensin II-injured kidney: potential role of VEGF and TSP-1 in renal disease. Am J Kidney Dis 2001; 37:601-611.

- 19- Pillebout E, Burtin M, Yuan HT, et al. Proliferation and remodeling of the peritubular microcirculation after nephron reduction. Association with the progression of renal lesions. *Am J Pathol* 2001; 159:547-560.
- 20- Konda R, Sato H, Sakai K, et al. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and its potential role in up-regulation of angiogenesis in scarred kidneys secondary to urinary tract diseases. *Am J Pathol* 1999; 155:1587-1597.
- 21- Kang DH, Kim YG, Andoh TF, et al. Post-cyclosporine-mediated hypertension and nephropathy: amelioration by vascular endothelial growth factor. *Am J Renal Physiol* 2001; 280:727-736.
- 22- Ishii Y, Swada T, Kubota K, Fuchinke S, Teraoka S, Shimizu A Injury and progressive loss of peritubular capillaries in the development of chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2005; 67:321:332.
- 23- Kang DH, Johnson RJ. Vascular endothelial growth factor: a new player in the pathogenesis of renal fibrosis. *Curr Opin in Nephrol and Hypertens* 2003; 12:43-49.
- 24- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 1999; 56:794-814.

- 25- Schrijvers BF, Flyvbjerg A, Tilton RG, Rasch R, Lameire NH, De Vriese AS. Pathophysiological Role of Vascular endothelial growth factor in the remnant kidney. *Nephron Exp Nephrol*. 2005; 27:101.
- 26- Caramelo C, Alvarez-Arroyo V, Yague S, Suzuki Y, Castilla MA, Velasco L, Gonzalez-Pacheco R et al. Cyclosporin A toxicity, and more: vascular endothelial growth factor (VEGF) steps forward. *Nephrol Dial Transp* 2004; 19:285-288.
- 27- Schrijvers BF, Flyvbjerg A, Vriese ANS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney int*. 2004; 65:2003-2017.
- 28- Alvarez-Arroyo MV, Suzuki Y, Yague S et al. Role of endogenous vascular endothelial growth factor in tubular cell protection against acute cyclosporin toxicity. *Transplantation* 2002; 74:1618-1624.
- 29- Castilla MA, Caramelo C, Gazapo RM, Martin O, González-Pacheco FR et al. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in endothelial cell protection against cytotoxic agents. *Life Sci*. 2000; 67:1003-1013.
- 30- Pilmore HL, Eris JM, Painter DM, Bishop GA, McCaughan GW. Vascular endothelial growth factor expression in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1999; 67:929-933.

- 31- Lemos FB, Mol WM, Roodnat JJ, Uitterlinden A, Ijzermans JN, Weimar W et al. The beneficial effects of recipient-derived vascular endothelial growth factor on graft survival after kidney transplantation. *Transplantation* 2005; 79:1221-5.
- 32- Özdemir BH, Özdemir FN, Haderal N, Emiroglu R, Demirhan B, Haberal M. Vascular endothelial Growth Factor Expression and Cyclosporine Toxicity in Renal Allograft Rejection. *Am J of Transplant* 2005; 5:766-774.
- 33- Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib ST, Castro MC. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55:713-723.
- 34- Nishi S, Imai N, Alchi B, Iguchi S, Ueno M, Fukase S et al. The morphological compensatory change of peritubular capillary network in chronic allograft rejection. *Clin Transplant* 2005; 19(S14):7-11.
- 35- Eckardt KU, Bernhardt WM, Weidemann A, Warnecke C, Rosenberg C, Wiesener MS et al. Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Kidney Int* 2005; 68:46-51.
- 36- Rosenberger C, Mandriota S, Jurgensen JS, Wiesener MS, Horstrup JH, Frei U et al. Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and 2 α in Hypoxic and Ischemic Rat Kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:1721-1732.

- 37- Manothan K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Miyata T, Inagi R et al. Evidence of Tubular Hypoxia in the Early Phase in the Remnant Kidney Model. J Am Soc Nephrol 2004; 15:1277-88.
- 38- Grone HJ, Siomon M, Grone EF. Expression of vascular endothelial growth factor in renal vascular disease and renal allografts. J Pathol 1995; 117:259-67.
- 39- Wilasrusmee C, Botash R, Silvia M, Shah G, Siddiqui J, Bruch D. Initial Angiogenic response in reduced renal mass after transplantation. J of Surigial Research 2003; 115:63-68.
- 40- Kairatis LK, Wang Y, Gassmann M, Tay YC, Harris DCH. HIF-1 α expression follows microvascular loss in advanced murine adriamycin nephrosis. Am J Physiol Renal Physiol 2005; 288:198-206.