

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ANÁLISES BIOQUÍMICAS, BIOMÉTRICAS, HISTOLÓGICAS E  
IMUNOLÓGICAS EM RATOS COM NEFROPATIA INDUZIDA PELA  
DOXORRUBICINA

Wagner de Fátima Pereira

Belo Horizonte  
2013

Wagner de Fátima Pereira

ANÁLISES BIOQUÍMICAS, BIOMÉTRICAS, HISTOLÓGICAS E  
IMUNOLÓGICAS EM RATOS COM NEFROPATIA INDUZIDA PELA  
DOXORRUBICINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cristina Simões e Silva  
Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Eustáquio B. A. de Melo

Belo Horizonte  
2013

P436a      Pereira, Wagner de Fátima.  
Análises bioquímicas, biométricas, histológicas e imunológicas em ratos com nefropatia induzida pela doxorrubicina [manuscrito]. / Wagner de Fátima Pereira. -- Belo Horizonte: 2013.  
164f.: il.  
Orientadora: Ana Cristina Simões e Silva.  
Co-Orientador: Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo.  
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.  
1. Síndrome Nefrótica. 2. Sistema Imunológico/fisiopatologia. 3. Reações Bioquímicas. 4. Doxorrubicina. 5. Ratos. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Silva, Ana Cristina Simões e. II. Melo, Gustavo Eustáquio Brito Alvim de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WJ 340



**FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
[www.medicina.ufmg.br](http://www.medicina.ufmg.br)



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **WAGNER DE FÁTIMA PEREIRA** nº de registro 2009711542. Às quatorze horas, do dia **vinte de março de dois mil e treze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"ANÁLISES BIOQUÍMICAS, BIOMÉTRICAS, HISTOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS EM RATOS COM SÍNDROME NEFRÓTICA INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA"**, requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profª. Ana Cristina Simões e Silva, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profª. Ana Cristina Simões e Silva – Orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo - Cooreintador	Instituição: UFVJM	Indicação: <u>aprovado</u>
Profª. Kátia Daniela da Silveira	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>
Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>
Profª. Etel Rocha Vieira	Instituição: UFVJM	Indicação: <u>aprovado</u>
Profª. Cláudia Martins Carneiro	Instituição: UFOP	Indicação: <u>aprovado</u>

Pelas indicações o candidato foi considerado APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 20 de março de 2013.

Profª. Ana Cristina Simões e Silva – Orientadora [Assinatura]

Prof. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo - Cooreintador [Assinatura]

Profª. Kátia Daniela da Silveira [Assinatura]

Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro [Assinatura]

Profª. Etel Rocha Vieira [Assinatura]

Profª. Cláudia Martins Carneiro [Assinatura]

Profª. Ana Cristina Simões e Silva / Coordenadora [Assinatura]

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

**CONFERE COM ORIGINAL**  
Centro de Pós-Graduação  
Faculdade de Medicina - UFMG

Profª. Ana Cristina Simões e Silva  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente  
Faculdade de Medicina/UFMG



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640  
[cpq@medicina.ufmg.br](mailto:cpq@medicina.ufmg.br)



**DECLARAÇÃO**

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores Ana Cristina Simões e Silva, Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo, Kátia Daniela da Silveira, Sérgio Veloso Brant Pinheiro, Etel Rocha Vieira e Cláudia Martins Carneiro aprovou a tese de doutorado intitulada: "CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE CRIANÇAS RESPIRADORAS ORAIS EM ATENÇÃO BÁSICA DE SAÚDE" apresentada pelo Doutorando **WAGNER DE FÁTIMA PEREIRA** para obtenção do título de doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 01 de março de 2013.

Profª. Ana Cristina Simões e Silva  
Orientadora

Prof. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo

Profª. Kátia Daniela da Silveira

Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro

Profª. Etel Rocha Vieira

Profª. Cláudia Martins Carneiro

Em tempo onde se Lê: "...CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE CRIANÇAS RESPIRADORAS ORAIS EM ATENÇÃO BÁSICA DE SAÚDE..." leia-se: "...ANÁLISES BIOQUÍMICAS, BIOMÉTRICAS, HISTOLÓGICAS E IMUNOLÓGICAS EM RATOS COM SÍNDROME NEFRÓTICA INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA ..."

Profª. Ana Cristina Simões e Silva  
Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e do Laboratório de Saúde da Criança e do Adolescente - UFMG

A todos aqueles que, direta ou indiretamente,  
acompanharam minha caminhada e contribuíram  
para a realização de mais este sonho;

Aos animais utilizados neste experimento, os quais  
tornaram tudo isso possível.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por se mostrar onipresente nos meus momentos de solidão, onipotente nos meus momentos de fraqueza e, acima de tudo, onisciente na minha busca pelo saber. Obrigado por me aceitar incondicionalmente, como seu filho e protegido;

Aos professores da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), por disponibilizarem o espaço de seus laboratórios para nossos experimentos;

A Bioclin-Quibasa (Belo Horizonte-MG), pela gentil doação dos kits reagentes utilizados neste experimento, para todas as análises bioquímicas;

Ao Sr. Emílio Avelar que, com enorme presteza e boa vontade, disponibilizou seu laboratório para as análises bioquímicas deste trabalho. Aos funcionários Serafim, Hugo e Ana Paula Avelar, pela contribuição com as referidas análises e aos demais funcionários, pela cortesia com que sempre me receberam;

Ao Sr. Leonardo Monteiro, técnico em Patologia da UFVJM, pela importante ajuda na confecção das lâminas histológicas deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Imunologia (Labimuno/UFVJM), professores, técnicos e alunos, pelas parcerias, colaborações e constante amizade, durante a execução desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia do Exercício (BIOEX/UFVJM), pelo convívio do dia a dia e pelas experiências trocadas ao longo deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto (LIMP/UFOP), em especial à professora Claudia Carneiro, pela colaboração nas colorações histológicas, aquisição e análise das imagens e, acima de tudo, pela amizade e disponibilidade que sempre demonstrou nas vezes que me recebeu em seu laboratório;

À doutoranda Valéria Gomes de Almeida (Labimuno/UFVJM), pela enorme colaboração na confecção das figuras dos artigos e animações gráficas da apresentação desta tese;

À professora Dr.<sup>a</sup> Etel Rocha Vieira, pela contribuição com a citometria de fluxo, pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos dentro do Laboratório de Imunologia/UFVJM e, acima de tudo, pela amizade que conseguimos cultivar;

À pesquisadora Dr.<sup>a</sup> Kátia Daniela da Silveira, pelas orientações iniciais sobre o modelo de estudo e pela disponibilidade com que sempre me atendeu quando foi requisitada;

À Geralda Luci Oliveira pela correção ortográfica e formatação desse trabalho;

Aos colegas de trabalho da UFVJM grandes colaboradores e testemunhas ocultas da minha trajetória profissional nesta instituição;

À minha mãe, Helena, por ser um grande exemplo de mãe: amiga, protetora, carinhosa e, sobretudo, extremamente presente na vida de cada um de seus filhos;

Ao meu pai, Germano, que nos deixou tão cedo, mas se tornou uma forte luz no caminho da nossa família;

Aos meus irmãos, Diney, Fiinho, Helaine, Leco e Maninho, pelo apoio, paciência e compreensão;

À minha esposa, Gilmara, pelo apoio, paciência, companheirismo, compreensão, cumplicidade e presença constante nos momentos mais importantes da minha vida;

Aos meus filhos, Thayane e Mateus Felipe, essência maior da minha existência;

Aos familiares e amigos, por me apoiarem e compreenderem os momentos de ausência;

Ao professor Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo, não somente um coorientador, mas, acima de tudo, um grande amigo, por todas as vezes em que me fez acreditar que tudo daria certo... Especialmente nos momentos mais difíceis;

À professora Dr.<sup>a</sup> Ana Cristina Simões e Silva, pela orientação neste trabalho, pelos inúmeros conhecimentos partilhados e pela amizade, que certamente expandiu-se juntamente com os conhecimentos adquiridos;

À professora Dr.<sup>a</sup> Patrícia Furtado Gonçalves, coordenadora local do programa DINTER, que brilhantemente conduziu as questões administrativas deste programa;

À CAPES pelo auxílio financeiro na execução deste trabalho, por intermédio do edital 005/2008 – Ação Novas Fronteiras - Doutorado Interinstitucional – DINTER.

“Se no final da caminhada seus resultados te frustrarem ou a ciência não te compreender, saiba que ainda assim terá valido a pena, pelas amizades que conseguistes cultivar ao longo da sua jornada científica e, especialmente, ao longo de sua jornada de vida!”



**REITOR**

Professor Clélio Campolina Diniz

**VICE-REITORA**

Professora Rocksane de Carvalho Norton

**PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Professor Ricardo Santiago Gomez

**PRÓ-REITOR DE PESQUISA**

Professor Renato de Lima dos Santos

**DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA**

Professor Francisco José Penna

**VICE-DIRETOR**

Professor Tarcizo Afonso Nunes

**COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Professor Manoel Otávio da Costa Rocha

**SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Professora Teresa Cristina de Abreu Ferrari

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA**

Professora Benigna Maria de Oliveira

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE - SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

Professora Ana Cristina Simões e Silva

**SUBCOORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE - SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

Professor Eduardo Araújo Oliveira

**COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
- SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

Professora Ana Cristina Simões e Silva

Professor Cássio da Cunha Ibiapina

Professor Eduardo Araújo de Oliveira

Professor Francisco José Penna

Professor Jorge Andrade Pinto

Professora Ivani Novato Silva

Professor Marcos José Burle de Aguiar

Professora Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana

Representante discente: Maria de Lourdes Melo Baeta

## RESUMO

PEREIRA, Wagner de Fátima. Análises bioquímicas, biométricas, histológicas e imunológicas em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina [Tese - Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2013.

A Síndrome Nefrótica (SN) caracteriza-se por proteinúria, hipoalbuminemia, dislipidemia e edema. Diversas investigações associaram a SN às alterações na resposta imunológica. Esta investigação teve como objetivos avaliar o perfil do leucograma e investigar o estado de ativação/migração celular, através da expressão das moléculas CD80 e CD18, além de avaliar as alterações biométricas, bioquímicas e histológicas, bem como o *status redox* do tecido renal de ratos com SN induzida pela doxorrubicina. Utilizaram-se sessenta e quatro ratos Wistar, machos, com idade entre 6 e 8 semanas e peso médio de 300 gramas, obtidos do Centro de Bioterismo – Cebio - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG – Brasil). Os ratos foram divididos em dois grupos: DOX (n=32), que recebeu dose endovenosa única da doxorrubicina (7,5mg/kg) e CON (n=32), que recebeu injeção endovenosa de solução salina. Animais de cada grupo foram avaliados e sacrificados 7, 14, 21 e 28 dias após a injeção. Amostras urinárias de 24 horas foram coletadas nesses dias e amostras sanguíneas foram obtidas por punção cardíaca, sob anestesia. Após a anestesia e coleta do sangue os animais foram perfundidos com solução salina; tiveram os órgãos internos removidos, pesados em balanças eletrônicas semianalíticas e os rins fixados e processados de acordo com as diferentes técnicas histológicas e imuno-histoquímica empregadas. A leucometria total foi realizada em contador automático de células e a diferencial, pela análise do esfregaço sanguíneo, corado com Giemsa e May-Grunwald. A avaliação da ativação/migração dos leucócitos circulantes foi realizada por citometria de fluxo, com o uso de anticorpo monoclonal conjugados com fluorocromos. O *status redox* foi avaliado pela produção de TBARS e pela atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase, em amostras de tecido renal. Animais do grupo DOX desenvolveram proteinúria, dislipidemia, alterações biométricas com significativo edema renal, infiltrado inflamatório túbulo intersticial crônico e fibrose renal. Mostraram, ainda, alterações na contagem total e diferencial dos leucócitos e aumento significativo na expressão de CD80 em monócitos e de CD18 em linfócitos T citotóxicos, células NK e monócitos do sangue periférico. Ocorreu aumento na peroxidação lipídica no tecido renal e correlação positiva com a expressão de CD80 em monócitos e com os níveis plasmáticos de creatinina. As alterações bioquímicas, nesse

modelo animal surgem precocemente e servem como biomarcadores inespecíficos para a SN; as lesões histológicas tornam-se mais intensas a partir do 21º dia após a injeção do fármaco. As células citotóxicas e fagocíticas parecem ser preferencialmente recrutadas do sangue periférico para o foco da lesão. Estudos adicionais devem analisar os efeitos do bloqueio das integrinas e moléculas coestimulatórias, bem como a participação dos neutrófilos e das citocinas no mecanismo de ativação/migração celular. Devem analisar, ainda, a importância do edema renal na evolução da lesão renal, no modelo de SN induzida pela doxorrubicina.

**Palavras-chave:** Síndrome nefrótica. Modelo animal. Doxorrubicina. Fibrose renal. Alterações bioquímicas. Alterações biométricas. CD18. CD80. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

PEREIRA, Wagner de Fátima. Biochemical, biometrics, histological and immunological analysis in rats with nephrotic syndrome induced by doxorubicin [Thesis - Doctorate in Child and Adolescent Health]. Belo Horizonte (MG): Federal University of Minas Gerais; 2013.

The nephrotic syndrome (NS) is characterized by proteinuria, hypoalbuminemia, dyslipidemia and edema. Studies have associated the NS with changes in the immune response. This study investigated the leukocyte count, the state of activation/migration by expression of CD80 and CD18 molecules in peripheral blood leukocytes and evaluated the biochemical, histological and biometric changes as well as the *status redox* of the renal tissue in rats with doxorubicin induced NS. Sixty-four Wistar rats, 6-8 weeks old and average weight 300 g., obtained from the Bioterism Center – at Federal University of Minas Gerais, Brazil, were used in this study. The animals were divided into two groups: DOX (n=32) which received a single dose, in the tail vein of Doxorubicin hydrochloride (7.5 mg / kg) and group CON (n=32) which received saline. Animals from each groups were evaluated and sacrificed at days 7, 14, 21 and 28 after injection. A 24h-urine sample was collected in this same times and blood samples were obtained by cardiac puncture under anesthesia. After blood collection, animals were perfused with saline and the internal organs removed, weighed on semi-analytical electronic balance and kidneys fixed, paraffin-embedded and processed according to the different histological and immunohistochemical techniques employed. Total leukocyte counts were performed on automated cell counter and differential leukocyte counts by analysis of blood smears stained with May-Grunwald Giemsa. Immunophenotyping of circulating leukocytes was performed by flow cytometry using fluorochrome-conjugated monoclonal antibody. *Status Redox* was evaluated by TBARS production and activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase in renal tissue samples. Animals from DOX group developed proteinuria, dyslipidemia, biometric changes, and histological changes consistent with significant renal edema, tubule interstitial chronic inflammatory infiltrates and renal fibrosis. Also showed changes in total and differential count of leukocytes and a significant increase in expression of CD80 on monocytes and CD18 on cytotoxic T lymphocytes, NK cells and peripheral blood monocytes. There was an increase in lipid peroxidation in kidney tissue and a positive correlation with the expression of CD80 on monocytes and serum levels of creatinine. The DOX animals group showed a significant increase in cytotoxic T lymphocytes, NK cells and monocytes CD18 expression, and the CD80 expression by peripheral blood monocytes. The

increased production of reactive oxygen species in renal tissue of DOX group animals was positively correlated with the CD80 expression by monocytes and serum levels of creatinine. The biochemical changes in this animal model arise early and serve as nonspecific biomarkers for NS; histological lesions become intense from day 21 after the doxorubicin injection. The phenotypic analyzes suggest that phagocytic and cytotoxic cells could be preferentially recruited from peripheral blood to the focus of injury and contribute to renal injury. The continued characterization of doxorubicin induced NS animal models may contribute to better understanding of the NS natural history. Additional studies should examine the effects of blocking the integrin and costimulatory molecules, as well as the participation of neutrophils and cytokines in the mechanism of cell activation/ migration. Must consider also The importance of renal edema in the evolution of renal injury in this animal model of NS induced by doxorubicin.

**Keywords:** Nephrotic syndrome. Animal model. Doxorubicin. Renal fibrosis. Biochemical changes. Biometric changes. CD18. CD80. Oxidative stress.

## SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE TABELAS	20
LISTA DE FIGURAS	21
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	22
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	22
REFERENCIAS	24
<b>2. ARTIGOS DE REVISÃO</b>	27
<b>2.1 Modelo de SN induzida pela doxorubicina em roedores: uma revisão</b>	27
Resumo	28
Abstract	29
Introdução	30
Modelos experimentais para o estudo da SN	31
<i>Qual animal utilizar: rato ou camundongo?</i>	32
As Antraciclinas	33
<i>Indução da SN com uso de Antraciclinas</i>	36
<i>Vias de administração e dosagens</i>	37
<i>Técnicas de injeção</i>	38
Avaliações bioquímicas e corporais em roedores com SN induzida pela doxorubicina	40
<i>Alterações bioquímicas</i>	40
<i>Alterações corporais</i>	41
Avaliações histológicas renais em roedores com SN induzida pela doxorubicina	41
<i>Colorações e técnicas empregadas</i>	41
<i>Alterações Histológicas</i>	42
Efeitos colaterais pelo uso da doxorubicina em roedores	46
Considerações finais	48
Referências	48

<b>2.2 Investigações imunológicas na Síndrome Nefrótica Idiopática</b>	59
Resumo	60
Abstract	61
Introdução	62
Papel do sistema imune na síndrome nefrótica	62
<i>Aspectos históricos</i>	62
<i>O Infiltrado inflamatório renal na patogênese da SNI</i>	63
<i>Participação dos linfócitos T na patogênese da SNI</i>	64
<i>Participação dos linfócitos B e sistema do complemento na patogênese da SNI</i>	70
<i>Participação de citocinas e quimiocinas na patogênese da SNI</i>	71
Padrão de resposta imune na síndrome nefrótica	75
Classificação dos Linfócitos T-helper segundo o padrão de citocinas	74
Respostas de padrão Th1/ Th2 na SNI	76
Considerações finais e perspectivas	78
Referencias	79
<b>3. OBJETIVOS</b>	89
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b>	89
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	89
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	90
<b>4.1 AMOSTRA</b>	90
<b>4.2 DELINEAMENTO</b>	90
4.2.1 Protocolo experimental	90
4.2.1.1 Indução da Nefropatia	90
4.2.1.2 Avaliação da função renal e Eutanásia	92
4.2.1.3 Remoção e preparo dos órgãos	92
4.2.1.4 Análises biométricas	94
4.2.1.5 Análises bioquímicas	94
4.2.1.6 Análises histológicas e morfométricas	95
4.2.1.7 Análises imuno-histoquímicas	97
4.2.1.8 Contagem global e diferencial de leucócitos do sangue periférico	98

4.2.1.9	Análise de marcadores de superfície em leucócitos circulantes, por citometria de fluxo	99
4.2.2.0	Status Redox	102
<b>4.3</b>	<b>METODOLOGIA DA REVISÃO DE LITERATURA</b>	102
<b>4.4</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	103
<b>4.5</b>	<b>ASPECTOS ÉTICOS</b>	103
<b>4.6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	104
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	105
<b>5.1</b>	<b>ARTIGO ORIGINAL</b>	105
	<b>Alterações morfométricas, histológicas e bioquímicas em ratos com nefropatia induzida pela doxorrubicina</b>	105
	Resumo	106
	Abstract	107
	Introdução	108
	Metodologia	108
	<i>Animais</i>	108
	<i>Desenho Experimental</i>	109
	<i>Avaliação da função renal e Eutanásia</i>	109
	<i>Remoção e preparo dos órgãos</i>	109
	<i>Análises biométricas</i>	110
	<i>Análises bioquímicas</i>	110
	<i>Análises histológicas e morfométricas</i>	110
	<i>Imuno-histoquímica</i>	112
	<i>Análises estatísticas</i>	113
	Resultados	113
	Alterações bioquímicas e disfunção renal, induzidas pela doxorrubicina	114
	Alterações biométricas induzidas pela doxorrubicina	115
	Esclerose renal induzida pela doxorrubicina	115
	Correlação entre a proteinúria, a dislipidemia e massa renal	116
	Discussão	116
	Conclusão	124
	Referências	125

<b>5.2 ARTIGO ORIGINAL</b>	128
<b>Aumento na expressão de CD18 e CD80 em leucócitos do sangue periférico: potencial ligação entre a maior ativação leucocitária e a lesão renal em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina</b>	128
Resumo	129
Abstract	130
Introdução	131
Metodologia	132
<i>Animais</i>	132
<i>Indução da nefropatia</i>	132
<i>Avaliação da função renal e Eutanásia</i>	133
<i>Contagem global e diferencial de leucócitos do sangue periférico</i>	133
<i>Análise de marcadores de superfície em leucócitos circulantes, por citometria de fluxo</i>	133
<i>Status Redox</i>	135
<i>Análise Estatística</i>	135
Resultados	136
<i>Disfunção renal</i>	136
<i>Alterações no percentual de leucócitos do sangue periférico</i>	136
<i>Alterações fenotípicas em leucócitos do sangue periférico</i>	139
<i>Aumento da Peroxidação Lipídica no tecido renal</i>	140
Discussão	145
Conclusão	150
Referências	151
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	156
REFERENCIAS	160
<b>7. PROPOSTAS PARA INVESTIGAÇÕES FUTURAS</b>	163
<b>ANEXO 1</b>	164

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Vantagens e Desvantagens no uso de ratos e camundongos como modelos de doença renal	35
Tabela 2	Estudos com modelo animal de síndrome nefrótica pela doxorrubicina	36
Tabela 1	Resultados de avaliações imunológicas em pacientes com síndrome nefrótica idiopática	68
Tabela 2	Resultados de avaliações imunológicas em modelo animal de síndrome nefrótica	69
Tabela 3	Citocinas e quimiocinas relacionadas à síndrome nefrótica idiopática	74
Tabela 1	Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados na análise específica de moléculas de superfície em subpopulações leucocitárias	100
Tabela 1	Condição inicial (pré-tratamento) dos animais utilizados no experimento	114
Tabela 2	Resultados das análises bioquímicas, biométricas e histológicas em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina	120
Tabela 3	Resultados das análises biométricas e histológicas em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina	121
Tabela 4	Resultados das análises biométricas em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina, 28 dias após a injeção	121
Tabela 5	Correlações entre proteinúria, concentração sérica de lipídeos e massa renal, em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina	122
Tabela 1	Relação dos anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos utilizados na análise específica de moléculas de superfície em subpopulações leucocitárias	134
Tabela 2	Resultados das análises bioquímicas, imunológicas e do status redox de ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina	138
Tabela 3	Correlação entre <i>status redox</i> do tecido renal, parâmetro de função renal e a resposta imune em ratos com síndrome nefrótica 28 dias após a injeção da doxorrubicina	139

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição corporal da doxorubicina em ratos - 3 e 48 horas após a injeção endovenosa	37
Figura 2	Recipientes para aquecimento e contenção de ratos ou camundongos	40
Figura 3	Alterações histológicas renais em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina	45
Figura 4	Representação esquemática do diafragma da fenda podocitária dos glomérulos	47
Figura 5	Lesões na cauda de ratos provocadas por extravasamento da doxorubicina	48
Figura 1	Função supressora das células T reguladoras	66
Figura 2	Funções efetoras de linfócitos Th1 e Th2	76
Figura 1	Desenho esquemático do protocolo experimental	91
Figura 2	Desenho esquemático do protocolo experimental – grupo 28 dias	91
Figura 3	Rins de rato com síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina	93
Figura 4	Fotos Ilustrativas da delimitação da área glomerular e do tufo capilar glomerular pelo programa Image J	95
Figura 5	Foto ilustrativa da estratégia de quantificação glomerular pelo programa Image J	96
Figura 6	Fotos Ilustrativas da estratégia de análise da celularidade tubulointersticial e glomerular pelo <i>software</i> Leica QwinV3	97
Figura 7	Fotos Ilustrativas da estratégia de análise da deposição tecidual de colágeno no tecido renal, pelo <i>software</i> Leica QwinV3	97
Figura 8	Foto ilustrativa da estratégia de análise do colágeno tipo I por imunofluorescência	99
Figura 9	Estratégia de análise das subpopulações leucocitárias do sangue periférico	101
Figura 10	Estratégia de análise da expressão de CD18 e CD80 em leucócitos do sangue periférico	101
Gráfico 1	Albuminúria em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina	115

Figura 1	Alterações histológicas renais em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina - microscopia de luz	118
Figura 2	Alterações histológicas renais em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina - microscopia de luz	119
Gráfico 1	Leucometria Global de ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina	137
Gráfico 2	Expressão de CD18 na superfície de linfócitos TCD8 <sup>+</sup> do sangue periférico.	141
Gráfico 3	Expressão de CD18 na superfície de células NK do sangue periférico	142
Gráfico 4	Expressão de CD18 e CD80 na superfície de monócitos do sangue periférico.	143
Gráfico 5	Expressão de CD18 na superfície de neutrófilos do sangue periférico	144

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – Célula apresentadora de antígeno  
 ANOVA – Análise de variância  
 CCR1 – Receptor de Quimiocina C-C do tipo 1  
 CD – Grupamento de diferenciação (*Cluster of differentiation*)  
 CD2AP – Proteína associada a CD2  
 CINC-1 – Fator neutrofílico quimioatraente induzido por citocinas  
 ECA – Enzima conversora da angiotensina  
 FITC – Isotiocianato de fluoresceína  
 FSC – Forward Scatter  
 GEFS – Glomerulosclerose focal e segmentar  
 HE – Hematoxilina e Eosina  
 ICAM – Molécula de adesão intracelular  
 IFN-gama – Interferon - gama  
 IgA – Imunoglobulina A  
 IgG – Imunoglobulina G  
 IgM – Imunoglobulina M  
 IL – Interleucina  
 LAMB2 – Laminina beta 2  
 LTCD4<sup>+</sup> - Linfócitos T CD4 positivos  
 LTCD8<sup>+</sup> - Linfócitos T CD8 positivos  
 MCP-1(CCL2) – Proteína quimiotática para monócitos – tipo 1  
 MDA – Malondialdeído  
 MHC-II – Complexo de histocompatibilidade principal – tipo I  
 MIP-1alfa (CCL3) – Proteína inflamatória de macrófagos – tipo 1 alfa  
 NF-κB – Fator nuclear-κB  
 NK – Natural Killer  
 PAS – Ácido Periódico de Schiff  
 PBS – Salina tamponada em fosfato (phosphate-buffered saline)  
 PE – Ficoeritrina  
 RANTES (CCL5) – Citocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais  
 SN – Síndrome nefrótica  
 SNCD – Síndrome nefrótica córtico-dependente  
 SNCR – Síndrome nefrótica córtico-resistente  
 SNCS – Síndrome nefrótica córtico-sensível  
 SNLM – Síndrome nefrótica por lesões mínimas  
 SNI – Síndrome nefrótica idiopática  
 SOD – Superóxido Dismutase  
 SSC – Side Scatter  
 TBARs – Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico,  
 TGF-β – Fator de transformação do crescimento – beta  
 TM – Tricrômico de Masson  
 TNF-alfa – Fator de necrose tumoral alfa  
 TRPC6 – Receptor transitório de canal potencial catiônico-6  
 ZO-1 – Proteína ZO-1

## 1. INTRODUÇÃO

A síndrome nefrótica (SN) caracteriza-se por proteinúria intensa, hipoalbuminemia, edema generalizado e dislipidemia (Schachter, 2004). Conforme sua etiologia pode ser secundária a doenças autoimunes, quadros pós-infecciosos, vasculites, uso de fármacos, entre outros. Denomina-se síndrome nefrótica idiopática (SNI) o distúrbio provocado por lesão renal primária. Quanto à histopatologia, observam-se mais frequentemente na SNI as lesões glomerulares mínimas (SNLM) caracterizadas por fusão dos processos podais dos podócitos seguida pela glomeruloesclerose focal e segmentar (GEFS) (Schachter, 2004; Souto *et al.*, 2008; D`Agati *et al.*, 2011). Devido à importância clínica da resposta dos pacientes ao tratamento com esteroides, a SNI também pode ser classificada em síndrome nefrótica córtico-sensível (SNCS), síndrome nefrótica córtico-dependente (SNCD) e síndrome nefrótica córtico-resistente (SNCR) (Schachter, 2004).

A SNI é uma glomerulopatia bastante comum em crianças e adultos, apesar de sua fisiopatologia permanecer ainda desconhecida (Abrantes *et al.*, 2004; D`Agati *et al.*, 2011). Diversos estudos mostraram o envolvimento do sistema imune na SNI, tais como alterações na resposta mediada por células TCD8<sup>+</sup> (Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001b e TCD4<sup>+</sup> (Araya *et al.*, 2009; Le Berre *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2001), na expressão de citocinas/quimiocinas tais como IL2, IL10 (Araya *et al.*, 2009), IL4 (Valanciuté *et al.*, 2004) e IL8 (Kanai *et al.*, 2009, Souto *et al.*, 2008b, no sistema do complemento (Lenderink *et al.*, 2007), bem como a participação de macrófagos (Wang *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2010; Benz *et al.*, 2010), células NK (Musial *et al.*, 2010) e de espécies livres de oxigênio (Ghodake *et al.*, 2010; Takiue *et al.*, 2012) no mecanismo de lesão renal.

As integrinas dos leucócitos e as moléculas de adesão intercelular desempenham papel essencial na fixação leucocitária às células-alvo e à matriz extracelular (Springer, 1994; Gahmberg, 1997). Após estímulos lesivos, sinais quimiotáticos advindos do sítio inflamatório ativam as integrinas e induzem a fixação e rolamento dos leucócitos na parede vascular (Penberthy *et al.*, 1997). As integrinas são glicoproteínas transmembranas do tipo ligante-específicas, amplamente distribuídas na superfície celular e que possuem afinidade por proteínas da matriz extracelular, ligantes solúveis e contrarreceptores nas células endoteliais (Karim e Tommy, 2000; Diamond e Hynes, 1992; Ruoslahti, 1991). No mecanismo de ativação das células T, são necessários dois tipos de sinais, a ligação entre o receptor das

células T (TCR) com o antígeno apresentado pelo complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e, em seguida, o sinal denominado coestimulatório, entre a molécula CD28 presente na superfície das células T e a molécula CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2) na superfície das células apresentadoras de antígeno (Engel *et al.*, 1994; Sayegh e Turka, 1995; Fleischer *et al.*, 1996).

Modelos experimentais têm contribuído para a compreensão da fisiopatologia da SN (Eddy *et al.*, 2012), entre eles, ressalta-se o modelo de indução da SN pelo quimioterápico doxorrubicina. Em roedores, este fármaco induz lesões renais semelhantes às observadas em pacientes com SN (Lee e Harris, 2011; Wang *et al.*, 2000).

Tendo em vista a participação das células fagocíticas no desenvolvimento da lesão renal na SNI (Benz *et al.*, 2010; Lama *et al.*, 2002; Musial *et al.*, 2010) e devido a capacidade dos macrófagos em produzir radicais livres (Berens *et al.*, 1998; Akyoul *et al.*, 2007), é provável que alterações no comportamento migratório e nos eventos relacionados à ativação celular possam influenciar o curso dessa doença. Neste contexto insere-se a presente investigação, que avaliou a expressão da integrina CD18 e da molécula coestimulatória CD80 em leucócitos do sangue periférico, bem como o dano oxidativo renal e as alterações bioquímicas, biométricas e histológicas em ratos com SN induzida pela doxorrubicina.

Esta tese foi organizada em quatro artigos científicos, de acordo com o parágrafo único do Art. 1º da Resolução 03/2010, que regulamenta o formato das teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina/UFMG. Os dois primeiros artigos são revisões da literatura que abordam, respectivamente, diversos aspectos sobre o modelo animal de SN e as evidências clínicas e experimentais da participação da resposta imune na fisiopatogenia da SNI. Nos dois últimos artigos são descritos os resultados obtidos neste trabalho, com o modelo experimental de SN induzida pela doxorrubicina. Os resultados foram divididos entre o terceiro e o quarto artigo da seguinte forma: descrição e discussão dos resultados bioquímicos, biométricos e histológicos e descrição e discussão dos resultados imunológicos, respectivamente.

As referências bibliográficas estão dispostas ao final de cada artigo ou seção, conforme as normas de Vancouver (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication - [www.ICMJE.org](http://www.ICMJE.org)).

## REFERÊNCIAS

- Abrantes MM, Oliveira EA, Lamounier JA, Diniz JSS, Cardoso LSB and Gonçalves RJV 2004. Síndrome Nefrótica em Crianças: uma revisão histórica do século XX. *J Bras Nefrol*; 26: 153-64.
- Akyol T, Bulucu F, Sener O, Yamanel L, Aydin A, Inal V, Bozoglu E, Demirkaya E, Eken A and Musabak U 2007. Functions and Oxidative Stress Status of Leukocytes in Patients with Nephrotic Syndrome. *Biol Trace Elem Res*; 116:237–247.
- Araya C, Diaz L, Wasserfall C, Atkinson M, Mu W and Johnson R 2009. T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*; 24:1691-1698.
- Benz K, Büttner M, Dittrich K, Campean V, Dötsch J and Amann K 2010. Characterization of renal immune cell infiltrates in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*; 25:1291-1298.
- Berens KL, Verani RR and Luke DR 1998. Role of neutrophils and macrophages in experimental nephrosis of the rat. *Ren Fail*; 20:53-63.
- Bertelli R, Trivelli A, Magnasco A, Cioni M, Bodria M, Carrea A, Montobbio G, Barbano G and Ghiggeri GM 2010. Failure of regulation results in an amplified oxidation burst by neutrophils in children with primary nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol*; 161: 151-158.
- Cao Q, Wang Y, Zheng D, Sun Y, Wang YA, Lee VWS, Zheng G, Tan TK, Ince J, Alexander SI and Harris DCH 2010. IL-10/TGF- $\beta$ -Modified Macrophages Induce Regulatory T Cells and Protect against Adriamycin Nephrosis. *J Am Soc Nephrol*; 21:933-942.
- D'Agati VD, Kaskel FJ and Falk, RJ 2011. Focal Segmental Glomerulosclerosis. *N Engl J Med*; 365:2398-2411.
- Diamond MS and Springer TA 1994. The Dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol*; 4:506-17.
- Eddy AA, López-Guisa JM, Okamura DM and Yamaguchi I 2012. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatr Nephrol*; 27:1233–1247.
- Fleischer J, Soeth E, Reiling N, Grage-Griebenow E, Flad H-D and Ernst M 1997. Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunol*; 89:592-598.
- Gahmberg CG 1997. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*; 9:643-650.
- Ghodake SR, Suryakar AN, Ankush RD, Shaikh K and Katta AV 2010. Role of reactive oxygen species in pathogenesis of nephrotic syndrome. *Indian J Clin Biochem*; 25: 82–85.
- Hynes RO 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*; 69:11-25.

- Kanai T, Yamagata T and Momoi MY 2009. Macrophage inflammatory protein-1b and interleukin-8 associated with idiopathic steroid sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr Int*; 51:443-447.
- Karim D and Tommy A 2005. Beta-2 integrin signaling in leukocytes. *Front Biosci*; 5:438-451.
- Lama G, Luongo I, Tirino G, Borriello A, Carangio C and Salsano ME 2002. T-lymphocyte populations and cytokines in childhood nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis*; 39:958-965.
- Le Berre L, Bruneau S, Naulet J, Renaudin K, Buzelin F, Usal C, Smit H, Condamine T, Soulillou J-P and Dantal J 2009. Induction of T regulatory cells attenuates idiopathic nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*; 20: 57-67.
- Lee VWS and Harris DCH 2011. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology*; 16:30–38.
- Lenderink AM, Liegel K, Ljubanovic D, Colemar KE, Gilkeson GS, Holers VM and Thurman JM 2007. The alternative pathway of complement is activated in the glomeruli and tubulointerstitium of mice with Adriamycin nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*; 293:555-564.
- Musial K, Ciszak L, Kosmaczewska A, Szteblich A, Frydecka I and Zwoliński D 2010. Zeta chain expression in T and NK cells in peripheral blood of children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*; 25:119–12.
- Penberthy TW, Jiang Y and Graves DT 1997. Leukocyte adhesion molecules. *Crit Rev Oral Biol Med (J Dent Res)*; 8 (4):380-388.
- Ruoslahti E 1991. Integrins. *J Clin Invest*; 87:1-5.
- Sayegh MH and Turka LA 1995. T cell costimulatory pathways: promising novel targets for immunosuppression and tolerance induction. *J Am Soc Nephrol*; 6:1143-1150.
- Schachter AD 2004. The pediatric nephrotic syndrome spectrum: clinical homogeneity and molecular heterogeneity. *Pediatr Transplant*; 8: 344-348.
- Souto MFO, Teixeira AL, Russo RC, Penido M-GMG, Silveira KD, Teixeira MM and Simões e Silva AC 2008-b. Immune Mediators in Idiopathic Nephrotic Syndrome: Evidence for a Relation Between Interleukin 8 and Proteinuria. *Pediatr Res*; 64:637–642.
- Souto MFO, Teixeira MM, Penido M-GMG and Simões e Silva AC 2008. Fisiopatologia da Síndrome Nefrótica em crianças e adolescentes. *Arch Latin Nefr Ped*; 8:1-10.
- Springer TA 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*; 76:301-314.
- Takiue K, Sugiyama H, Inoue T, Morinaga H, Kikumoto Y, Kitagawa M, Kitamura S, Maeshima Y, Wang DH, Masuoka N, Ogino K and Makino H 2012. Acatlasemic mice are mildly susceptible to Adriamycin nephropathy and exhibit increased albuminuria and

glomerulosclerosis. *BMC Nephrology*; 13/14:01–10.

Valanciuté A, Le GS, Solhonne B, Pawlak A, Grimbert P, Lyonnet L, Hue S, Lang P, Remy P, Salomon R, Bensman A, Guellaen G and Sahali D 2004. NF-Kappa-B p65 antagonizes IL-4 induction by c-maf in minimal change nephrotic syndrome. *J Immunol*; 172:688-698.

Wang Y, Feng X, Bao S, Yi S, Kairaitis L, Tay YC, Rangan GK and Harris DCH 2001. Depletion of CD4 T cells aggravates glomerular and interstitial injury in murine Adriamycin nephropathy. *Kidney Int*; 59:975-984.

Wang Y, Wang YP, Tay Y-C and Harris DCH 2000. Progressive Adriamycin nephropathy in mice: Sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int*; 58:1797–1804.

Wang Y, Wang YP, Tay Y-C and Harris DCH 2001-b. Role of CD8 cells in the progression of murine Adriamycin nephropathy. *Kidney Int*; 59:941-949.

Wang Y, Wang YP, Zheng G, Lee VWS, Ouyang L, Chang DHH, Mahajan D, Coombs J, Wang YM, Alexander SI and Harris DCH 2007. Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney Int*; 72:290-299.

## **2. ARTIGO DE REVISÃO**

### **2.1 Modelo de síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina em roedores: uma revisão**

Wagner de Fátima Pereira<sup>1</sup>, Gustavo Eustáquio Alvim Brito-Melo<sup>1</sup>, Thiago Guimarães R. Carvalho<sup>2</sup> e Ana Cristina Simões e Silva <sup>2,a</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de imunologia, Centro Integrado de Pesquisa em Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório Interdisciplinar de Investigações Médicas Unidade de Nefrologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>a</sup> Endereço corrente – Laboratório Interdisciplinar de Investigações Médicas – Faculdade de Medicina – Avenida Alfredo Balena, 190, 2º andar, sala 281, Bairro Santa Efigênia, Belo Horizonte, Minas Gerais. Brasil. Cep: 30130-100

Autor correspondente: Ana Cristina Simões e Silva. E-mail: [acssilva@hotmail.com](mailto:acssilva@hotmail.com)

## **Resumo**

A Síndrome Nefrótica (SN) caracteriza-se por proteinúria, hipoalbuminemia, edema generalizado e hiperlipidemia. Inicia-se por alterações na barreira de filtração glomerular, com aumento da permeabilidade às proteínas plasmáticas. Acomete qualquer faixa etária e pode progredir para doença renal crônica (DRC) em estágio final com necessidade de terapia de substituição renal. A SN pode estar associada à lesão renal primária ou manifestar-se como consequência de outras alterações sistêmicas, contudo muito ainda se tem a descobrir sobre a fisiopatologia desta doença. Modelos animais representam uma boa alternativa para as investigações científicas de diversas doenças. Dentre os diferentes modelos experimentais propostos na literatura para as investigações sobre a SN, o modelo de indução da doença pela doxorrubicina tem sido útil ao propósito de diversos estudos. O objetivo deste artigo de revisão é descrever o modelo animal de SN induzida pelo uso da doxorrubicina em roedores, com ênfase no comportamento do fármaco, indução da lesão renal, bem como nas alterações bioquímicas, histológicas e corporais obtidas no modelo.

**Descritores:** Síndrome nefrótica, modelo animal, roedores, doxorrubicina, glomerulosclerose segmentar e focal, revisão.

**Abstract**

The nephrotic syndrome (NS) is characterized by proteinuria, hypoalbuminemia, generalized edema and hyperlipidemia. It begins by changes in the glomerular filtration barrier, with increased permeability to plasma proteins. It can affect all age groups and progress to the end stage of chronic kidney disease (CKD) requiring renal replacement therapy. The NS may be associated with primary renal injury or resulted as a consequence of other systemic changes, but still has much to discover about the pathophysiology of this disease. Among the different experimental models proposed in the literature, the model of NS induced by the chemotherapy Doxorubicin has served the purpose of several studies. The aim of this article was to review the mainly characteristics of this animal model of NS emphasizing the drug behavior and subsequent renal injury, as well as the biochemical, histological and body changes obtained in this model of CKD.

**Keywords:** Nephrotic syndrome. Animal model. Rodents. Doxorubicin. Glomerulosclerosis focal segmental. Review.

## Introdução

A Síndrome nefrótica (SN) é um distúrbio renal bastante comum em crianças e adultos, contudo muito ainda se tem a descobrir sobre a fisiopatologia desta doença. Diferentes doenças glomerulares podem manifestar-se como Síndrome Nefrótica (SN), com proteinúria intensa, hipoalbuminemia, edema generalizado e hiperlipidemia. A SN pode ocorrer em qualquer faixa etária e progredir para doença renal crônica (DRC) em estágio final com necessidade de terapia de substituição renal (Hogg *et al.*, 2007). Apesar de ser a glomerulopatia mais comum em crianças sua fisiopatologia ainda não está bem definida, podendo estar associada à lesão renal primária, especialmente em crianças, ou manifestar-se como consequência de outras doenças sistêmicas (Souto *et al.*, 2008). Alguns modelos experimentais para as investigações sobre a SN foram propostos na literatura, contribuindo assim para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e novas propostas terapêuticas para esta doença (Eddy *et al.*, 2012). O modelo de indução da SN com o uso do quimioterápico doxorrubicina tem servido bem ao propósito de diversos estudos. Em ratos e camundongos a doxorrubicina induz lesões renais semelhantes às observadas nos pacientes com SN. Nesse artigo de revisão serão abordados alguns modelos animais disponíveis para as investigações sobre a SN, com ênfase no modelo de indução química pela doxorrubicina, incluindo o comportamento do fármaco, metodologias de trabalho, mecanismos de indução da lesão renal bem como as alterações histológicas, bioquímicas e corporais obtidas nesse modelo de DRC.

## Modelos experimentais para o estudo da SN

Modelos animais representam boa estratégia para superar as dificuldades éticas e metodológicas da obtenção de material humano para diversas investigações científicas (Pippin *et al.*, 2009; Da Matta, 2011). Ratos e camundongos têm sido utilizados em vários estudos sobre a SN (Pasi *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000; Eddy *et al.*, 2012). A preferência pelo uso destes roedores é justificada pelo menor custo de manutenção, rápido ciclo de reprodução, boa reprodutibilidade da doença humana e a possibilidade de manipulações genéticas (Pippin *et al.*, 2009). Além disso, é possível obter rápida indução da doença renal em roedores e há disponibilidade de reagentes para diferentes ensaios (Chen *et al.*, 1998)

A SN em modelo animal pode ser induzida pelo uso de sulfato de protamina (Seiler *et al.*, 1977; Messina *et al.*, 1989), sobrecarga proteica (Davies *et al.*, 1985; Weening *et al.*, 1987; Pedraza-Chaverri, 2006), antígenos bacterianos (Pasi *et al.*, 1997; Reiser *et al.*, 2004), injeções de células tronco CD4<sup>+</sup> (Sellier-Leclerc *et al.*, 2007), fosfato de sódio dibásico (Tsuchiya *et al.*, 2009), imunoglobulinas anti podocitária (Bao *et al.*, 2009), e por superexpressão da Interleucina 13 (Lai *et al.*, 2007). A SN pode também ser induzida quimicamente pela administração do Aminonucleosídeo de Puromicina (PAN) (Vogt *et al.*, 2002; Sampaio-Maia *et al.*, 2006; Tojo *et al.*, 2008) ou pelo quimioterápico doxorrubicina, também conhecido como *Adriamicina*® (Abassi *et al.*, 1992; Buranakarl *et al.*, 2008).

As alterações genéticas são responsáveis por parte dos casos de SN em humanos (Antignac, 2002; Zenker *et al.*, 2009; D'Agati *et al.*, 2011), assim, alguns animais modificados geneticamente também foram propostos para as pesquisas sobre essa doença (Abramowsky *et al.*, 1984; Shih *et al.*, 1999; Heikkila *et al.*, 2010; Clement *et al.*, 2011). Além de todos estes modelos, obtidos por intervenções experimentais, existe ainda a linhagem de ratos *Buffalo/Mna*, que desenvolve a SN espontaneamente aos três meses de idade (Antignac, 2002; Le Berre *et al.*, 2002).

Embora existam diferentes modelos animais para as investigações acerca da SN, a indução da doença pela administração da doxorrubicina tem sido frequentemente utilizada (Yesair *et al.*, 1972; Okuda *et al.*, 1986; Bricio *et al.*, 1992; Buranakarl *et al.*, 2008; Lee e Harris, 2011). Isto se deve ao baixo custo do fármaco, menor complexidade de manejo e boa reprodutibilidade do modelo (Pippin *et al.*, 2009), além da possibilidade de se induzir a lesão

renal com dose única da doxorubicina (Bertani *et al.*, 1982; Abassi *et al.*, 1992; Rangan *et al.*, 1999).

Qual animal utilizar: Rato ou Camundongo?

De maneira geral são utilizados ratos e camundongos para as investigações das glomerulopatias. Existem vantagens e desvantagens para ambos os animais de experimentação, conforme mostrado na tabela 1. A linhagem de ratos mais utilizada na maioria dos estudos é a *Sprague-Dawley* (Sternberg, 1970; Sakemi *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2011) seguida pela linhagem *Wistar* (Weening e Rennke, 1983; Fogo *et al.*, 1988; Abassi *et al.*, 1992). Nos experimentos com camundongos é utilizada, quase que exclusivamente, a linhagem BALB/c (Chen *et al.*, 1995; Hahn *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2005; Shui *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Lenderink *et al.*, 2007; Jeansson *et al.*, 2009; Takiue *et al.*, 2012). Camundongos da linhagem *129/SvJ* também desenvolvem a SN após a administração da doxorubicina (Zheng *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2006, Pippin *et al.*, 2009) mas tem sido menos utilizados.

Independentemente do modelo de escolha a grande maioria dos estudos é realizada em animais machos e adulto-jovens (TAB. 2). Alguns trabalhos realçaram as interferências dos hormônios ovarianos sobre o desenvolvimento da lesão renal no modelo de SN induzida pela doxorubicina (Sakemi *et al.*, 1996, Montilla *et al.* 2000). Após a castração ratos machos ficaram menos susceptíveis à lesão renal induzida pelo fármaco (Sakemi *et al.*, 1996). Ainda assim, alguns estudos utilizaram fêmeas e obtiveram sucesso na indução da SN (Weening e Rennke, 1983; Chen *et al.*, 1995; Hahn *et al.*, 2004; Jeansson *et al.*, 2009).

Em relação à idade dos animais, em geral são utilizados camundongos com 6 a 8 semanas e peso entre 20 e 25 gramas (Vielhauer *et al.*, 2004; Shui *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007) ou ratos com idade média de 8 semanas (Okuda *et al.*, 1986; Sakemi *et al.*, 1996) e peso entre 150 e 350 gramas (Rangan *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2011). Alguns experimentos foram realizados em animais mais jovens (Weening e Rennke, 1983) ou mais velhos (Hahn *et al.*, 2004) conforme objetivos dos estudos.

Hahn e colaboradores (2004) investigaram o efeito da idade sobre a indução da lesão renal pela doxorubicina em camundongos de 5 e 12 semanas de idade e verificaram que a lesão foi mais intensa nos animais mais velhos. Esta diferença de toxicidade pode estar relacionada aos maiores picos plasmáticos e teciduais do fármaco e à menor velocidade de

excreção urinária nos animais mais velhos (Colombo *et al.*, 1989). Na tabela 2 foram descritos os resumos metodológicos de diversos estudos que utilizaram roedores como modelo animal de SN induzida pela doxorubicina.

Na escolha da modelo animal a ser utilizado deve-se considerar as vantagens e desvantagens de cada modelo e também o fato de que algumas linhagens de roedores são resistentes à indução da SN pela doxorubicina tais como C57BL/6J (Wang *et al.*, 2000; Pippin *et al.*, 2009; Lee e Harris, 2011); B6, FVB, CAST (Zheng *et al.*, 2005; Pippin *et al.*, 2009); AKR/J, C3H/HeJ, CBA/J, C57BL/10J, LP/J, SWR/J, SJL/J e 129S6/SvEvTac (Zheng *et al.*, 2006). Esta resistência é uma característica autossômica recessiva de herança mendeliana e pode estar relacionada à maior atividade da proteína arginina metil-transferase-7 (Prmt7) que inativa a doxorubicina (Zheng *et al.*, 2005). Apesar de resistentes à ação deste fármaco, camundongos da linhagem C57BL/6 podem desenvolver a SN após receberem doses maiores do que as usuais (Jeansson *et al.*; 2009; Heikkila *et al.*, 2010).

### **As Antraciclinas**

As antraciclinas são antibióticos glicosídicos obtidos a partir do *Streptomyces peucetius var. caesius* (Chabner, 1996; Adriamycin, 2012). A doxorubicina é um pó cristalino vermelho-alaranjado, solúvel em água e pouco solúvel em álcool (Adriamycin, 2012), empregada no tratamento de tumores sólidos. A Daunorrubicina, outra antraciclina, é empregada na leucemia mieloide aguda (Muggia e Green, 1991; Gewirtz, 1999). Desenvolvidas em 1960, representam as duas primeiras antraciclinas, sendo que a doxorubicina diferencia da Daunorrubicina apenas pela ligação de um grupo hidroxila (Weiss, 1992).

Os mecanismos de ação propostos para as antraciclinas são a interposição entre pares de bases com inibição da síntese de DNA e RNA (Chabner, 1996; Gewirtz, 1999); alquilação do DNA; interferências na separação das fitas de DNA; efeitos diretos sobre as membranas; inibição da topoisomerase II (Gewirtz, 1999); indução de apoptose celular (Gewirtz, 1999; Park *et al.*, 2005) e formação de radicais livres (Akyol *et al.*, 2007; Ghodake *et al.*, 2010; Lebrecht *et al.*, 2004; Takiue *et al.*, 2012).

TABELA 1

Vantagens e Desvantagens no uso de ratos e camundongos como modelos de doença renal

(modificada de Pippin *et al.*, 2009)

<b>Ratos</b>		<b>Camundongos</b>	
<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Maior quantidade de tecido renal possibilita diversas análises	Menor disponibilidade de animais modificados geneticamente	Maior disponibilidade de animais geneticamente modificados	Existência de linhagens resistentes à doxorrubicina
Modelos de lesão podocitária bem definidos	Existência de linhagens resistentes à doxorrubicina	Menor período gestacional	Limitada ativação do complemento glomerular
Fácil isolamento de glomérulos livres de fragmentos tubulares que fornecem muito RNAm e proteínas	Menor disponibilidade de reagentes e marcadores para estudos imunológicos	Menor custo de aquisição e manutenção	Difícil isolamento de glomérulos livres de fragmentos tubulares
Maior volume urinário disponível para análises		Maior disponibilidade de reagentes e marcadores para estudos imunológicos	Menor volume urinário disponível para análises
Maior volume sanguíneo disponível para análises			Menor volume sanguíneo disponível para análises
			O uso de anticorpos monoclonais de camundongos aumentam as marcações de fundo
Animais maiores facilitam procedimentos cirúrgicos			Requerem maiores habilidades cirúrgicas
			Requerem maiores habilidades para injeção endovenosa
			Poucos modelos de lesão podocitária

TABELA 2

Metodologias de estudos que utilizaram roedores como modelo de SN induzida pela doxorubicina

<b>Estudos em Camundongos</b>									
<b>Autores</b>	<b>Espécie Animal</b>	<b>Doses</b>	<b>Via administração</b>	<b>Nº</b>	<b>Intervalos</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade ou Peso</b>	<b>Duração</b>	
Lee <i>et al.</i> , 2006	BALB/c (SCID)	7,0	i.v (cauda)	01	----	M	6- 8 s	42	
Wu <i>et al.</i> , 2007	BALB/c	9,5	i.v (?)	01	----	M	8 s	42	
Chen <i>et al.</i> , 1998; Zheng <i>et al.</i> , 2005; Shui <i>et al.</i> , 2006	BALB/c	10,0	i.v (cauda)	01	----	F e M	6 a 8 s	18/ 15/ 20	
Wang <i>et al.</i> , 2000; Lenderink <i>et al.</i> , 2007	BALB/c	11,0	i.v (cauda/ cauda/ ?)	01	----	M	20-25 g	42/35	
Vielhauer <i>et al.</i> , 2004; Heikkila <i>et al.</i> , 2010	BALB/c / C57BL/6	13,0	i.v (cauda)	02/ 01	14 dias / ----	M	22/25 g	42/ 6	
Takiue <i>et al.</i> , 2012	(C3H/AnLCsCs)	15,0	i.v (?)	01	----	M	8- 10 s	56	
Chen <i>et al.</i> , 1995; Hahn <i>et al.</i> , 2004	BALB/c	20,0	i.v (cauda)	02 / 01	? / ----	F	5- 12 s	4 / 12	
Jeansson <i>et al.</i> , 2009	C57BL/6	25,0	i.v (cauda)	01	----	F	?	6	
<b>Estudos em Ratos</b>									
Lebrecht <i>et al.</i> , 2009	Wistar	1,0	i.v (?)	07	Semanal	M	11 a 48 s	259	
De Boer <i>et al.</i> , 1999	Wistar e Lewis	1,5	i.v (pênis)	01	----	M	312 g	84	
Kim <i>et al.</i> , 2011; Fogo <i>et al.</i> , 1988; Okuda <i>et al.</i> , 1986; Sakemi <i>et al.</i> , 1996	Wistar/ Lewis/ SD	2,0	i.p / i.v (? / ? / ?)	06/ 02	Semanal / 20 dias	M e F	150-300 g	35/ 217/ 196/ 140	
Rangan <i>et al.</i> , 1998; Mandelbaum <i>et al.</i> , 1999	Wistar	3,5	* i.v (cauda/ femoral)	01	----	M e F	186-320 g	35/ 35	
Sternberg, 1970	SD	5,0 a 20,0	i.v - (?)	01	----	M	200-400 g	28	
Abassi <i>et al.</i> , 1992; Zima <i>et al.</i> , 1998; Wang <i>et al.</i> , 2010	Wistar e SD	5,0	i.v (cauda/ cauda/ femoral/ cauda)	01	----	M e F	80 a 350 g	21/ 21/ 42	
Muñoz <i>et al.</i> , 2011	SD	6,0	i.v (cauda)	01	----	M	180 a 250 g	28	
Rangan <i>et al.</i> , 1999	Wistar	7,0	?	01	----	M	222-296 g	28	
Buranakarl <i>et al.</i> , 2008; Weening e Rennke, 1983	SD e Wistar	7,5	i.v (? / ?)	01	----	M/ F	150 a 350 g	14/ 55	
Bricio <i>et al.</i> , 1992; Bertani <i>et al.</i> , 1982	SD	7,5	i.v (cauda)	01	----	M	180 a 350 g	21 a 30	
Bertani <i>et al.</i> , 1986	SD	7,5	** i.v - (?)	01	----	M	280-300 g	60	
Van Goor <i>et al.</i> , 1993	Wistar	8,0	i.v - (?)	01	----	M	12 s	8	

i.v = intravenosa; i.p = intraperitoneal; fem= femoral; ? – não informada; nº = quantidade de injeções; intervalo= tempo entre as injeções; m = macho; f = fêmea; idade (em semanas) ou peso (em gramas); duração = duração total do experimento em dias; SD = sprague-dawley; \* injeção i.v associada à nefrectomia unilateral; \*\* injeção i.v associada à clipagem renal unilateral.

Em ratos e camundongos após a injeção a doxorubicina é rapidamente removida do plasma e depositada nos tecidos, sendo excretada principalmente na bile e moderadamente na urina (Yesair *et al.*, 1972; Tavoloni e Guarino, 1980). A doxorubicina, menos metabolizada, acumula-se nos rins, fígado, coração e intestino liso com maior intensidade que a Daunorrubicina, sendo que os níveis plasmáticos permanecem constantes e baixos após 20 minutos (Yesair *et al.*, 1972). Em doses intravenosas de 5 a 20 mg/Kg, aproximadamente 34% é excretada na bile e 6-8% na urina em um período de 10 horas (Tavoloni e Guarino, 1980). O acúmulo renal pode ser o responsável pela maior nefrotoxicidade da doxorubicina em relação à Daunorrubicina (Lee e Harris, 2011). A distribuição da doxorubicina após injeção endovenosa em ratos está demonstrada na Figura 1.

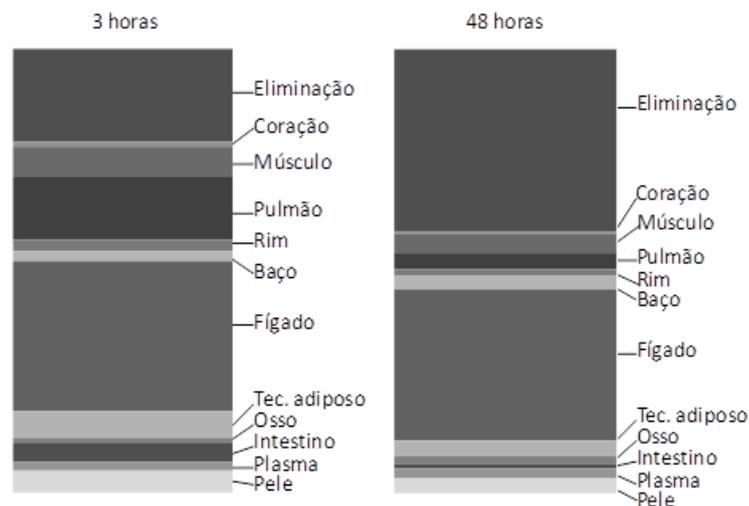


FIGURA 1 – Distribuição corporal da doxorubicina em ratos com 3 horas e 48 horas após a injeção endovenosa. (Modificado de Wilkinson e Mawer, 1974).

### Indução da SN com o uso de Antraciclinas

Semelhante à doença em humanos, no modelo animal a lesão renal inicial ocorre durante a indução da SN, que pode ser provocada pela formação de imunocomplexos com antígenos renais ou pela ação de toxinas (D'Agati *et al.*, 2011) e drogas, como no caso da doxorubicina (Pippin *et al.*, 2009). Muitas substâncias nefrotóxicas apresentam um efeito agudo que pode provocar necrose tubular, no entanto, a doxorubicina apresenta somente discreto efeito agudo, mas importantes efeitos crônicos, que induzem a nefropatia (Okuda *et al.*, 1986).

Em 1970 Sternberg evidenciou alterações estruturais em glomérulos de ratos após a injeção de Daunorrubicina. Posteriormente, alguns estudos foram pioneiros na utilização da doxorrubicina para indução de lesão renal em ratos (Bucciarelli *et al.*, 1976; Bertani *et al.*, 1982 e 1986; O'Donnell *et al.*, 1985) e em camundongos (Chen *et al.*, 1995 e 1998; Wang *et al.*, 2000 ). Ainda na década de 70, foi descrito um caso clínico de lesão renal em humano após quimioterapia com doxorrubicina (Burke *et al.*, 1977).

A principal característica funcional da SN, tanto em humanos quanto no modelo animal, é a perda precoce de proteínas na urina, em especial a albumina. A doxorrubicina induz lesões renais em roedores semelhantes às descritas em pacientes com SN (Okuda *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006). A ausência de imunoglobulinas e de elementos do sistema do complemento no tecido renal dos animais na fase inicial da lesão indica um efeito tóxico direto do fármaco sobre o tecido renal (Weening e Rennke, 1983; Bertani *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1998). Além disso, a obstrução mecânica do fluxo sanguíneo em um dos rins imediatamente antes e alguns minutos após a injeção protege este rim da lesão, confirmando assim o efeito agudo e local da doxorrubicina (Bertani *et al.*, 1986; De Boer *et al.*, 1999).

Em geral, nos estudos com indução da SN em roedores, os animais do grupo controle recebem injeções do veículo da doxorrubicina, normalmente a salina (Zheng *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007; Pippin *et al.*, 2009 ).

#### Vias de administração e dosagens

O cloridrato de doxorrubicina deve ser utilizado por via endovenosa com cuidado, pois o extravasamento no momento da injeção pode provocar lesões teciduais (Adriamycin, 2012) inviabilizando assim o modelo experimental. Em roedores a veia da cauda é preferencial para a injeção (Hahn *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010). Outras vias têm sido utilizadas com menor frequência, tais como, veia femoral (Mandelbaum *et al.*, 1999), intraperitoneal (Kim *et al.*, 2011); intracardíaca (Rangan *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005) e veia peniana (De Boer *et al.*, 1999) (TAB. 2).

A via intraperitoneal apresenta maior facilidade de administração, mas a injeção intravenosa provê disponibilidade direta e elimina a dependência da absorção pela membrana peritoneal (Pippin *et al.*, 2009). A total biodisponibilidade da doxorrubicina injetada é um fator importante na indução da SN, uma vez que diferenças de apenas 0,5 mg/Kg na dose

injetada pode provocar falhas no experimento, especialmente em camundongos (Lee e Harris, 2011).

Em um dos primeiros trabalhos utilizando a doxorrubicina para induzir SN em ratos, foi empregada injeção endovenosa única de 7,5 mg/Kg peso corporal (Bertani *et al.*, 1982). nos estudos posteriores, em geral as dosagens utilizadas em ratos variaram entre 5,0 e 7,5 mg/kg, contudo também já foram utilizadas doses desde 1,5 mg/kg (De Boer *et al.*, 1999) até 8,0 mg/Kg (Van Goor *et al.*, 1993) (TAB. 2). Em camundongos as doses empregadas para induzir a SN variaram, em média, entre 10,0 e 11,0 mg/Kg peso corporal, mas também já foram utilizadas doses desde 5,2 mg/Kg em camundongos BALBc (SCID), linhagem naturalmente imuno-deprimida (Mahajan *et al.*, 2006) até 25 mg/Kg, em camundongos C57BL/6, linhagem resistente a ação da doxorrubicina (Jeansson *et al.*, 2009).

Percebe-se uma tendência para as injeções em dose única da doxorrubicina, contudo, dosagens mais baixas ou fracionadas parecem ser preferíveis em estudos de longo prazo (Okuda *et al.*, 1986; Sakemi *et al.*, 1996; Lebrecht *et al.*, 2004) (TAB. 2). Segundo Bertani e colaboradores, para a indução da SN em ratos, tanto as dosagens de 7,5 mg/Kg quanto de 3,0 ou 5,0 mg/Kg induzem proteinúria, que persiste por vários meses, contudo, doses menores provocam lesões renais menos acentuadas (Bertani *et al.*, 1986). No estudo realizado por Vielhauer e colaboradores, para induzir a SN em camundongos utilizou-se duas injeções de 13,0 mg/Kg, cada, com intervalo de 14 dias entre as injeções. Segundo estes autores, em camundongos injeções de 11,0 mg/Kg de doxorrubicina induzem proteinúria transitória com duração de 4 a 6 semanas (Vielhauer *et al.*, 2004)

#### Técnicas de injeção

A contenção do animal facilita o procedimento de injeção. Para melhor localização da veia na cauda em ratos e especialmente em camundongos, pode-se promover a vasodilatação prévia por meio de caixas de aquecimento (Lee e Harris, 2011). Nossa experiência tem demonstrado que, a permanência do animal por 10 a 15 minutos em caixa previamente aquecida a aproximadamente 38° C é suficiente para promover dilatação venosa adequada (FIG. 2). Em geral a injeção endovenosa é realizada com o animal acordado (Bertani *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 2006; Lee e Harris, 2011), contudo alguns autores preferem anestésiar os animais previamente (Mandelbaum *et al.*, 1999; Buranakarl *et al.*, 2008; Jeansson *et al.*, 2009).

Uma opção para reduzir a dose de doxorubicina injetada e consequentemente os efeitos colaterais é a utilização de técnicas que potencializam o efeito do fármaco. Neste sentido, De Boer e colaboradores (1999) obstruíram o fluxo sanguíneo em um dos rins (clipagem da artéria renal) durante a injeção, utilizando a dose de 1,5 mg/Kg, em ratos. A técnica de obstrução do fluxo sanguíneo para o rim contralateral também foi utilizada, juntamente com injeções de 3,5 mg/Kg (Rangan *et al.*, 1998) e de 7,5 mg/Kg (Bertani *et al.*, 1986) de doxorubicina, no denominado modelo acelerado de lesão glomerular em ratos.

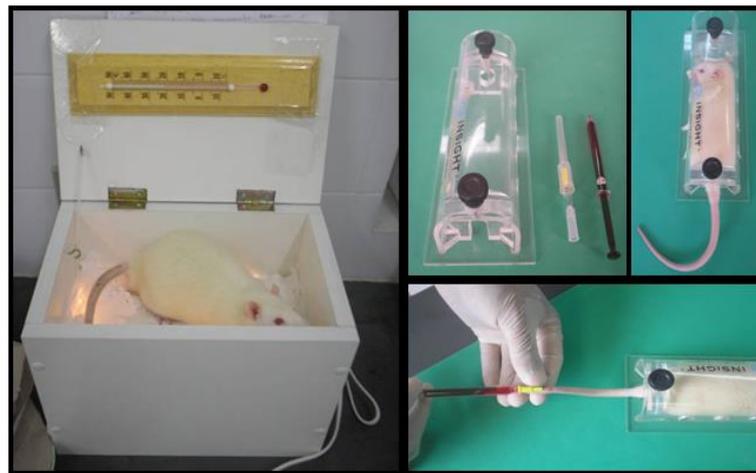


FIGURA 2 – Recipientes para aquecimento e contenção de ratos ou camundongos para a aplicação de injeção endovenosa (Arquivo próprio).

Devido às dificuldades técnicas da injeção endovenosa em roedores, uma das vantagens de trabalhar com a doxorubicina é a possibilidade de induzir lesão renal progressiva, com apenas uma injeção do fármaco (Chen *et al.*, 1998; Rangan *et al.*, 1999; Pipinn *et al.*, 2009), embora alguns pesquisadores prefiram as doses fracionadas (Lebrecht *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011). Contudo, múltiplas doses de doxorubicina foram associadas à cardiomiopatia e insuficiência cardíaca em ratos (Li *et al.*, 2000). Como proposta para superar as dificuldades técnicas da injeção endovenosa Rangan e colaboradores (2001) sugeriram a técnica de injeção intracardíaca, em animais previamente anestesiados. Ainda assim, as veias periféricas representam a principal via de acesso para a injeção da doxorubicina (TAB. 2).

Por causa do estreito índice terapêutico da doxorubicina, pequenas diferenças na dose injetada podem provocar grandes variações na intensidade da lesão renal, no modelo animal de SN (Lee e Harris, 2011). Portanto, para utilizar o modelo experimental de SN

induzida por medicamentos que contenham o Cloridrato de doxorubicina, é importante um estudo piloto para determinar a dose do medicamento e confirmar seus efeitos renais (Pippin *et al.*, 2009).

Por se tratar de quimioterápico de uso hospitalar controlado, são necessários certos cuidados de biossegurança na manipulação desta substância, como a utilização de luvas e máscaras descartáveis, óculos de proteção e roupas adequadas. A solução deve ser manipulada com cuidado e em caso de contato com a pele ou mucosa, a região deverá ser lavada com água e sabão abundantemente (Adriamycin, 2012).

### **Avaliações bioquímicas e corporais em roedores com SN induzida pela doxorubicina**

#### Alterações bioquímicas

A proteinúria constitui a alteração bioquímica característica da SN e serve para confirmar a eficácia do modelo animal. Ocorre presença de albumina na urina entre 5 e 7 dias após a injeção da doxorubicina (Bertani *et al.*, 1982; Wang *et al.*, 2000; Pippin *et al.*, 2009) ou um pouco antes, podendo ocorrer também perda de imunoglobulinas, especialmente IgG (Chen *et al.*, 1995; 1998). Além da proteinúria, há hipoalbuminemia, hipercreatinemia (Wang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006), hematúria, redução no clearance de creatinina (Chen *et al.*, 1998) e aumento na razão albumina/creatinina na urina (Chen *et al.*, 1995; Jeansson *et al.*, 2009). Alguns autores não encontraram alterações significativas nos níveis de albumina plasmática (Okuda *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1998) ou de creatinina urinária e plasmática (Bertani *et al.*, 1982; Okuda *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1995).

Animais com SN induzida pela doxorubicina desenvolvem dislipidemia, com aumento nos níveis séricos de colesterol (Buranakarl *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2011), apolipoproteínas e triglicérides (Van Goor *et al.*, 1993; Shearer *et al.*, 2005). Alguns estudos destacaram a participação da dislipidemia na patogênese da SN nesse modelo animal (Van Goor *et al.*, 1993; De Boer, *et al.*, 1999; Shearer *et al.*, 2005). Foi demonstrada correlação positiva entre o aumento no colesterol plasmático e a perda de albumina na urina (Shearer *et al.*, 2005). Além disso, o índice de esclerose glomerular apresentou maior correlação com os níveis de colesterol plasmático do que com a proteinúria (De Boer *et al.*, 1999).

## Alterações corporais

Em geral há relatos de perda de peso nesse modelo animal de SN já nas primeiras semanas após a injeção da doxorubicina (Okuda *et al.*, 1986; Rangan *et al.*, 1998; Boonsanit *et al.*, 2006; Jeansson *et al.*, 2009). Posteriormente ocorre ganho de peso nos animais com SN, mas de forma bem mais lenta que no grupo controle (Wang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2011). Segundo Mihailovic-Stanojevic e colaboradores (2009) a perda de peso pode estar relacionada à dose do fármaco e à linhagem animal utilizada, não sendo, portanto, um achado constante. A perda de peso pode estar relacionada aos efeitos colaterais do fármaco, conforme será discutido posteriormente neste artigo.

Em relação aos órgãos internos, embora ocorra relato de redução progressiva no peso renal de animais injetados com a doxorubicina (Lee *et al.*, 2006), de forma geral os estudos demonstram aumento no peso deste órgão (Okuda *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2000; Boonsanit *et al.*, 2006). Outros órgãos internos como coração pulmão e fígado têm sido pouco investigados nesse modelo. Segundo Zheng e colaboradores (2005), estes órgãos não são afetados nas doses de doxorubicina usualmente utilizadas para induzir SN em camundongos, por um período de até 15 dias. Demais alterações relatadas nesse modelo animal de SN foram: ascite (Bertani *et al.*, 1982; Nakhoul *et al.*, 2005), congestão pulmonar, efusão pleural (Nakhoul *et al.*, 2005) e hipertensão arterial (Okuda *et al.*, 1986; Mandelbaum *et al.*, 1999).

## **Avaliações histológicas renais em roedores com SN induzida pela doxorubicina**

### Colorações e técnicas empregadas

Colorações de rotina são utilizadas para verificação das alterações histológicas renais, como Hematoxilina e Eosina (HE), Àcido Periódico de Shift (PAS) (Bertani *et al.*, 1982; Okuda *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001), Tricrômico de Masson (Bertani *et al.*, 1982; Wang *et al.*, 2000) e impregnações pela Prata (Bertani *et al.*, 1986; Vielhauer *et al.*, 2004). A microscopia eletrônica é útil para análises dos podócitos e demais estruturas da barreira de filtração glomerular (Weening e Rennke, 1983; Chen *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2006) e a imuno-histoquímica para evidenciação de linfócitos, macrófagos (Wang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2011), fibras colágenas, podocina, (Nakhoul *et al.*, 2005;

Heikkila *et al.*, 2010), tenacina (Hahn *et al.*, 2004), beta-catenina (Heikkila *et al.*, 2010) e moléculas de adesão tipo ICAM-1 (Muñoz *et al.*, 2011).

Para avaliar e quantificar a lesão renal são utilizados sistemas eletrônicos, com auxílio de softwares de análises (Vielhauer *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006). Para as lâminas coradas por HE e PAS têm sido proposta avaliação de no mínimo, 20 glomérulos (Wang *et al.*, 2000; Vielhauer *et al.*, 2004) ou túbulos, ou 10 regiões aleatórias em cada lamina histológica (Wu *et al.*, 2007), em aumento de 400 vezes (Wang *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007). Forma de avaliação semelhante é empregada para as técnicas de imuno-histoquímica ou imunofluorescência de estruturas glomerulares (Chen *et al.*, 1998; Rangan *et al.*, 1999; Muñoz *et al.*, 2011) ou de áreas corticais (Rangan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2006).

A esclerose glomerular pode ser avaliada por análise semi-quantitativa, com pontuação entre 0 e 4, representando respectivamente de 0 a 100% de esclerose nos glomérulos avaliados (Okuda *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1998). Para este cálculo considera-se o percentual de aumento na área de matriz mesangial (PAS-positiva) dentro do glomérulo, dividida pela área capilar glomerular total (Wang *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007). Pode-se ainda analisar 100 glomérulos por lâmina e verificar o percentual destes glomérulos que apresenta mais de 30% da sua área corada pelo PAS, o que correspondeu à esclerose significativa (Wu *et al.*, 2007).

### Alterações Histológicas

No modelo animal de SN induzida pela doxorubicina as lesões túbulo-intersticiais são mínimas no 7º dia, moderadas no 14º dia e acentuadas entre o 21º e 28º dia após a injeção do fármaco (Rangan *et al.*, 1999). O aspecto histológico destas lesões se assemelha àquelas observadas nos pacientes com SN (Lee *et al.*, 2006; Pippin *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

Devido a proteinúria, a lesão renal inicia-se com a formação de cristais intratubulares (Bertani *et al.*, 1986). Com a evolução da doença, percebe-se redução da celularidade, atrofia e colapso do tufo glomerular além de expansão mesangial (Chen *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000). Na fase tardia ocorre esclerose e vacuolização glomerular, fibrose intersticial acentuada (Okuda *et al.*, 1986) e atrofia tubular (Wang *et al.*, 2000; Lee *et al.*,

2006), com redução no tamanho das células tubulares, perda da borda em escova e vacuolização celular (Chen *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000). Na figura 3 é possível observar as alterações histológicas presentes no tecido renal de animais injetados com a doxorubicina.

A resposta inflamatória contribui com a lesão renal, pois a proteinúria persistente promove estímulo contínuo para as células tubulares, as quais secretam quimiocinas e citocinas pró-fibróticas (Abbate *et al.*, 1998). O excesso de albumina nos túbulos renais aumentou a expressão de MCP-1, citocina responsável pela quimiotaxia dos macrófagos (Wang *et al.*, 1997), entretanto, na ausência do infiltrado inflamatório a proteinúria isoladamente não foi suficiente para induzir a fibrose intersticial renal (Vielhauer *et al.*, 2004). Ainda, as alterações na distribuição das proteínas nefrina, CD2AP e ZO-1 foram associadas ao aumento na expressão podocitária de CD80 (B7-1), molécula coestimulatória geralmente presente em algumas células da resposta imunológica (Reiser *et al.*, 2004).

Na imuno-histoquímica, os rins de animais com lesão induzida pela doxorubicina, apresentam, inicialmente, acúmulo intersticial de macrófagos (Wang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006), com posterior declínio destes e aumento na quantidade de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> (Wang *et al.*, 2000). Este acúmulo de células inflamatórias ocorre somente no interstício e em geral não tem sido destacada a presença de linfócitos B (Wang *et al.*, 2000). As alterações teciduais também são caracterizadas por aumento na expressão de colágeno tipo IV, fibronectina e laminina no tufo glomerular e capsula de Bowman (Chen *et al.*, 1998).

À microscopia eletrônica é possível observar que as alterações podocitárias iniciam-se logo nas primeiras horas após a injeção da doxorubicina (Bertani *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1995), com perda parcial da arquitetura dos podócitos, já no 13º dia da doença (Bertani *et al.*, 1982). Na fase tardia da lesão ocorre fusão generalizada dos podócitos e surgimento de vesículas intracitoplasmáticas (Bertani *et al.*, 1982; Okuda *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1998). A lesão evolui para a perda total dos processos podais (Lee *et al.*, 2006) e formação de grandes vacúolos contendo fibrina (Okuda *et al.*, 1986).

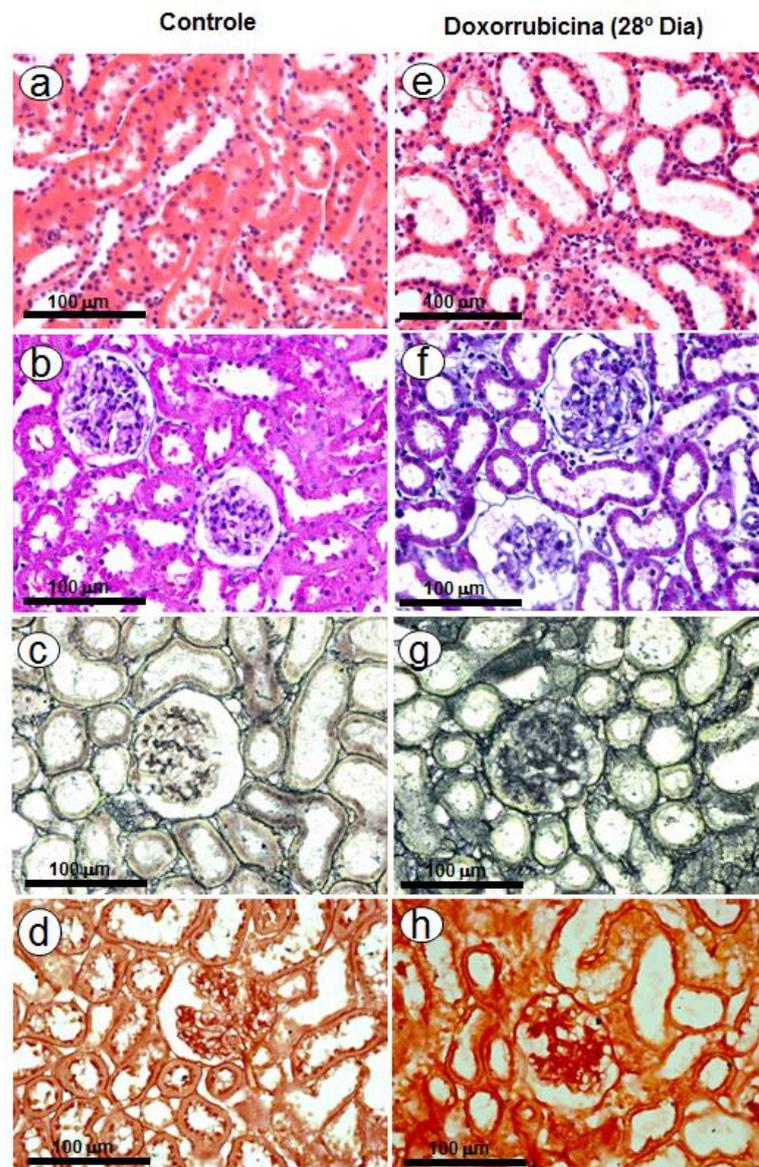


FIGURA 3 – Alterações histológicas renais em ratos com SN induzida pela doxorubicina: (a, b, c, d) aspectos de normalidade nos animais do grupo controle; (e, f, g, h) 28 dias após injeção da doxorubicina: presença de infiltrado inflamatório, fibrose, esclerose e espessamento de membrana basal (HE; Tricrômico Masson; Prata Amoniacal e PAS, respectivamente - Tamanho original x 400) – (Dados próprios).

A perda da seletividade de filtração da membrana glomerular provoca acúmulo intraglomerular de macromoléculas, com posterior deposição de matriz mesangial e consequente esclerose glomerular (Okuda *et al.*, 1986). Foi sugerido que o surgimento precoce de albumina na urina é devido à perda da seletividade elétrica da barreira de filtração glomerular, decorrente da perda das sialoproteínas nas primeiras horas após a injeção da

doxorrubicina (Bertani *et al.*, 1982). Estudos posteriores demonstraram que as alterações elétricas foram subsequentes às alterações estruturais (Weening e Rennke, 1983; Chen *et al.*, 1998). Recentemente a proteinúria foi associada à redução na espessura da camada de glicocálice do endotélio glomerular, induzindo alterações tanto na seletividade elétrica quanto na seletividade tamanho-específica da barreira de filtração glomerular (Jeansson *et al.*, 2009).

A lesão podocitária com consequente proteinúria depende da atividade da beta-catenina, proteína que fixa a P-caderina ao citoesqueleto celular, no diafragma da fenda podocitária (Heikkila *et al.*, 2010) e está relacionada à redução na expressão de nefrina e podocina, proteínas integrantes do diafragma na barreira de filtração glomerular (Lai *et al.*, 2007), principalmente da nefrina, (Nakhoul *et al.*, 2005; Blum *et al.*, 2007). Algumas estruturas componentes do diafragma da fenda podocitária dos glomérulos estão ilustradas na Figura 4.

Percebe-se certa similaridade na descrição histológica dos diferentes estudos utilizando roedores como modelo de SN induzida pela doxorrubicina. Contudo, existe uma variabilidade cronológica entre as descrições de alguns estudos, provavelmente devido às diferenças na dose de doxorrubicina utilizada para induzir a lesão renal (Lebrecht *et al.*, 2004; Boonsanit *et al.*, 2006). Em geral, a evolução da lesão renal é dose-dependente em relação à administração da doxorrubicina.

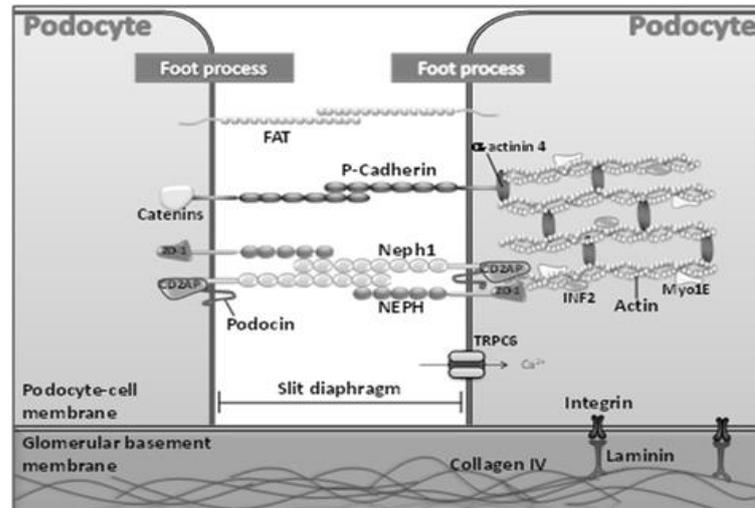


FIGURA 4 – Representação esquemática do diafragma da fenda podocitária dos glomérulos (modificada de Blum *et al.*, 2007 e D'Agati *et al.*, 2011). NEPH = Nefrina; Nep1 = Nefrina 1; ZO-1 = Proteína-1 da zônula de oclusão; LAMB2 = Laminina beta 2; TRPC6 = Canal de receptor transiente de potencial-6; FAT = Proteína de adesão, membro da superfamília das Protocaderina; Myo1E = Miosina-1E; INF2 = Formina invertida-2; CD2AP = Proteína associada ao CD2.

### Efeitos colaterais pelo uso da doxorrubicina em roedores

Um dos problemas iniciais é o risco de extravasamento da *Doxorrubicina* no momento da injeção. Por ser muito tóxica aos tecidos pode provocar necrose tecidual severa (Adriamycin, 2012) e inviabilizar o modelo ou comprometer os resultados da pesquisa (Rangan *et al.*, 2001). Na Figura 5 observa-se lesão tecidual promovida por extravasamento da doxorrubicina.

A toxicidade da doxorrubicina está associada principalmente à atividade proliferativa tecidual, sendo a medula óssea, tubo digestivo e gônadas os tecidos mais afetados (Adriamycin, 2012). Em humanos diversos estudos realçaram as alterações cardíacas induzidas pelas antraciclinas (Olson *et al.*, 1988; Gewirtz, 1999; Nascimento e Martins, 2005) e relacionadas ao metabólito Doxorrubicinol (Olson *et al.*, 1988). A insuficiência cardíaca congestiva em humanos foi relacionada à dose total de 550 mg/m<sup>2</sup> (Adriamycin, 2012), o que está bem acima daquela utilizada no modelo animal de lesão renal. Por exemplo, em ratos

adultos jovens (200 a 300 gramas) utiliza-se em média 7,5 mg/Kg de peso corporal, que corresponde a aproximadamente 105 mg/m<sup>2</sup> (Bertani *et al.*, 1982).

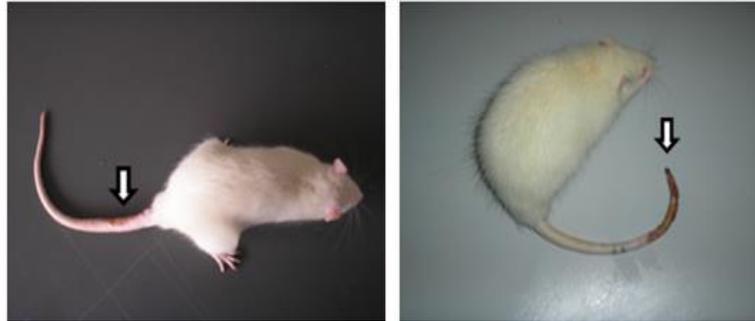


FIGURA 5 – Lesões na cauda de ratos, provocadas por extravasamento da doxorubicina durante a injeção endovenosa (Dados próprios)

Em estudos para avaliar os efeitos cardiotoxicos da doxorubicina em ratos, foi utilizada dose de 15,0 mg/Kg (tong *et al.*, 1991; li *et al.*, 2000) que induziu alterações oxidativas precoces (Li *et al.*, 2000), e insuficiência cardíaca congestiva nesses animais (Tong *et al.*, 1991). Também há relatos de alterações cardíacas em ratos, com administrações de apenas 6,0 mg/Kg do fármaco, por via endovenosa (Monti *et al.*, 1986) ou de 10 mg/Kg por via intraperitoneal (Bolaman *et al.*, 2005), as quais não foram associadas ao metabólito Doxorubicinol (Monti *et al.*, 1986). Contudo, as alterações cardíacas geralmente não tem sido foco das avaliações nos estudos sobre a SN induzida pela doxorubicina em roedores.

A doxorubicina provoca anorexia nas primeiras 24 horas após a injeção, que pode perdurar por vários dias. Existe também a possibilidade de surgimento de alterações na mucosa bucal (Adriamycin, 2012). Conforme relatado anteriormente, um efeito colateral bastante descrito em roedores é a redução do peso corporal, nas primeiras semanas após a injeção do fármaco (Bertani *et al.*, 1982; Van Goor *et al.*, 1993; Muñoz *et al.*, 2011), associada à redução no consumo alimentar (Buranakarl *et al.*, 2008; Jeansson *et al.*, 2009) ou à inibição da síntese proteica (Li *et al.*, 2000). A utilização de injeção intraperitoneal com solução de eletrólitos e glicose pode evitar a perda de peso nos animais tratados com a doxorubicina (Jeansson *et al.*, 2009).

## Considerações finais

A utilização de modelo animal tem proporcionado avanço nas pesquisas sobre doenças renais, incluindo a SN. O modelo de indução da SN pela doxorrubicina em roedores é amplamente empregado em estudos com diferentes enfoques. Para a indução da lesão renal têm sido utilizados principalmente camundongos *BALB/c* e ratos *Sprague-Dawley* ou *Wistar*, machos e adulto-jovens, sendo a doxorrubicina administrada em dose única ou fracionada. Na escolha do modelo animal, deve-se considerar a susceptibilidade da linhagem, bem como a disponibilidade comercial de reagentes e marcadores biológicos para os parâmetros avaliados.

Considerando-se a dificuldade técnica e possibilidade de erro durante a aplicação da doxorrubicina, parece existir uma tendência geral para o esquema com dose única na veia caudal. Apesar da variedade de metodologias empregadas, especialmente em relação ao período de indução da doença e dose de doxorrubicina administrada, as lesões renais e as alterações bioquímicas e corporais nesse modelo animal assemelham-se bastante às manifestações da SN em humanos, sendo, portanto, um modelo bastante viável para pesquisas nesta área.

## Referências

Abassi Z, Shurany I E, Better OS and Winaver J 1992. Effect of atrial natriuretic factor on renal cGMP production in rats with Adriamycin-induced nephrotic. *Journal of the American Society of Nephrology* 2, 1538–1544.

Abbate M, Zoja C, Corna D, Capitanio M, Bertani T and Remuzzi G 1998. In progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation. *Journal of the American Society of Nephrology* 19, 1213–1224.

Abramowsky CR, Aikawa M, Swinehart GL and Snajdar RM 1984. Spontaneous Nephrotic Syndrome in a Genetic Rat Model. *The American Journal of Pathology* 117, 400–408.

Adriamycin [database on the Internet]. Health Communication Network 2012; Disponível em: [http://www.pfizer.com.au/sites/au/Products/Leaflets/PI\\_Adriamycin\\_212.pdf](http://www.pfizer.com.au/sites/au/Products/Leaflets/PI_Adriamycin_212.pdf). Acessado

em 02 de Agosto de 2012.

Akyol T, Bulucu F, Sener O, Yamanel L, Aydin A, Inal V, Bozoglu E, Demirkaya E, Eken A and Musabak U 2007. Functions and Oxidative Stress Status of Leukocytes in Patients with Nephrotic Syndrome. *Biological Trace Element Research* 116, 237–247.

Antignac C 2002. Genetic models: clues for understanding the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* 109, 447–449.

Bao L, Haas M, Pippin J, Wang Y, Miwa T, Chang A, Minto AW, Petkova M, Qiao G, Song W-C, Alpers CE, Zhang J, Shankland SJ and Quigg RJ 2009. Focal and segmental glomerulosclerosis induced in mice lacking decay-accelerating factor in T cells. *The Journal of Clinical Investigation* 119, 1264–1274.

Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thoua Y, Mecca G, Remuzzi G and Donati MB 1982. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Laboratory Investigation* 46, 16–23.

Bertani T, Broggin M, Cutillo F, Remuzzi G and Zoja C 1986. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney International* 30, 488–496.

Blum S, Nakhoul F, Khankin E and Abassi Z 2007. Renal Slit Diaphragm – the Open Zipper and the Failing Heart. *The Israel Medical Association Journal* 9, 107–111.

Bolaman Z, Cicek C, Kadikoylu G, Barutca S, Serter M, Yenisey C and Alper G 2005. The protective effects of Amifostine on Adriamycin-induced acute cardiotoxicity in rats. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 207, 249–253.

Boonsanit D, Kanchanapangka S and Buranakarl C 2006. L-carnitine ameliorates doxorubicin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrology* 11, 313–320.

Bricio T, Molina A, Egido J, Gonzalez E and Mampaso F 1992. IL-1-like production in adriamycin-induced nephrotic syndrome in the rat. *Clinical and Experimental Immunology* 87, 117–121.

Bucciarelli E, Binazzi R, Santori P and Vespasiani G 1976. Nephrotic syndrome in rats due to adriamycin chlorhydrate. *Lavori dell'Istituto di Anatomia e Istologia Patologica Universita degli Studi di Perugia* 36, 53–69.

Buranakarl C, Kalandakanond-Thongsong S and Pondeenana S 2008. Renal catecholamine contents in doxorubicin-treated rats receiving morinda citrifolia (Noni)

Juice. *Thai Journal of Physiological Sciences* 20, 89–96.

Burke JF Jr, Laucius JF, Brodovsky HS and Soriano RZ 1977. Doxorubicin hydrochloride-associated renal failure. *Archives of Internal Medicine* 137, 385–388.

Chabner BA 1996. Antineoplastic agents. In *The pharmacological basis of therapeutics* (eds Gilman AG, Goodman LS), pp.932-933 McGraw Hil, New York.

Chen A, Wei CH, Sheu LF, Ding SL and Lee WH 1995. Induction of proteinuria by adriamycin or bovine serum albumin in the mouse. *Nephron* 69, 293–300.

Chen A, Sheu LF, Ho YS, Lin YF, Chou WY, Chou TC and Lee WH 1998. Experimental focal segmental glomerulosclerosis in mice. *Nephron* 78, 440-452.

Clement LC, Avila-Casado C, Macé C, Soria E, Bakker WW, Kersten S and Chugh SS 2011. Podocyte secreted Angiopoietin-like 4 mediates proteinuria in glucocorticoid sensitive nephrotic syndrome. *Nature Medicine* 17, 117–122.

Colombo T, Donelli MG, Urso R, Dallarda S, Bartosek I and Guitani A 1989. Doxorubicin toxicity and pharmacokinetics in old and young rats. *Experimental Gerontology* 24, 159–171.

D'Agati VD, Kaskel FJ and Falk RJ 2011. Focal Segmental Glomerulosclerosis. *The New England Journal of Medicine* 365, 2398–2411.

Da Matta, RA 2010. Modelos animais na pesquisa biomédica. *Scientia Medica* (Porto Alegre) 20, 210–211.

Davies DJ, Messina A, Thumwood CM and Ryan GB 1985. Glomerular podocytic injury in protein overload proteinuria. *Pathology* 17, 412–419.

De Boer E, Navis G, Tiebosch AT, De Jong PE and De Zeeuw D 1999. Systemic factors are involved in the pathogenesis of proteinuria-induced glomerulosclerosis in Adriamycin nephrotic rats. *Journal of the American Society of Nephrology* 10, 2359–2366.

Eddy AA, López-Guisa JM, Okamura DM and Yamaguchi I 2012. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatric Nephrology* 27, 1233–1247.

Fogo A, Yoshida Y, Glick, AD, Homma T and Ichikawa L 1988. Serial Micropuncture

Analysis of Glomerular Function in Two Rat Models of Glomerular Sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation* 82, 322–330.

Gewirtz DA 1999. A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochemical Pharmacology* 57, 727–741.

Ghodake SR, Suryakar AN, Ankush RD, Shaikh K and Katta AV 2010. Role of reactive oxygen species in pathogenesis of nephrotic syndrome. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 25, 82–85.

Hahn H, Park YS, Ha ISH, Cheong HI and Choi Y 2004. Age-related differences in Adriamycin-induced nephropathy. *Pediatric Nephrology* 19, 761–766.

Heikkila E, Juhila J, Lassila M, Messing M, Perälä N, Lehtonen E, Lehtonen S, Verbeek JS and Holthofer H 2010.  $\beta$ -Catenin mediates Adriamycin-induced albuminuria and podocyte injury in the adult mouse kidneys. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 8, 2437–46.

Hogg R, Middleton J and Vehaskari M 2007. Focal segmental glomerulosclerosis-epidemiology aspects in children and adults. *Pediatric Nephrology* 22, 183-186.

Jeansson M, Björck K, Tenstad O and Haraldsson B 2009 Adriamycin Alters Glomerular Endothelium to Induce Proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology* 20, 114–122

kim SY, Lim AY, Jeon SK, Lee IS and Choue R 2011. Effects of Dietary Protein and Fat contents on renal function and Inflammatory cytokines in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome. *Mediators of Inflammation*, doi:10.1155/2011/945123, Published online by Hindawi Publishing Corporation.

Lai KW, Wei ChL, Tan LK, Tan PH, Chiang GSC, Lee CGL, Jordan SC and Yap HK 2007. Overexpression of interleukin 13 induces minimal-change-like nephropathy in rats. *Journal of the American Society of Nephrology* 18, 1476–1485.

Le Berre L, Godfrin Y, Günther E, Buzelin F, Perretto S, Smit H, Kerjaschki D, Usal C, Cuturi C, Soulillou J-P and Dantal D 2002. Extrarenal effects on the pathogenesis and relapse of idiopathic nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats. *The Journal of Clinical Investigation* 109, 491–498.

Lebrecht D, Setzer B, Rohrbach R and Walker UA 2004. Mitochondrial DNA and its respiratory chain products are defective in doxorubicin nephrosis. *Nephrology, Dialysis,*

*Transplantation* 19, 329–336.

Lee VWS and Harris DCH 2011. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology* 16, 30–38.

Lee VWS, Wang Y, Qin X, Wang Y, Zheng G, Mahajan D, Coombes J, Rangan G, Alexander SI and Harris DCH 2006. Adriamycin nephropathy in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 21, 3293–3298.

Lenderink AM, Liegel K, Ljubanovic D, Coleman KE, Gilkeson GS, Holers VM and Thurman JM 2007. The alternative pathway of complement is activated in the glomeruli and tubulointerstitium of mice with adriamycin nephropathy. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 293, 555–564.

Li T and Singal PK 2000. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation* 102, 2105–2110.

Mandelbaum A, Podjarny E, Bernheim J, Green J and Rathaus M 1999. Role of thromboxane in the altered vascular reactivity of pregnant rats with adriamycin nephropathy. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 14, 1124–1128.

Messina A, Davies DJ and Ryan GB 1989. Protamine sulphate-induced proteinuria: the roles of glomerular injury and depletion of polyanion. *The Journal of Pathology* 158, 147–156.

Mihailovic-STanojevic N, Jovovic D, Miloradovic Z, Grujic-Milanovic J, Jerkic M and Markovic-Lipkovski J 2009. Reduced progression of adriamycin nephropathy in spontaneously hypertensive rats treated by losartan. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 24, 1142–1150.

Monti E, Piccinini F, Villani F and Favalli L 1986. Myocardial contractility and heart pharmacokinetics of Adriamycin following a single administration in rat. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 18, 289–291.

Montilla P, Túnez I, Muñoz MC, Delgado MJ and Salcedo M 2000. Hyperlipidemic Nephropathy Induced by Adriamycin in ovariectomized rats: role of free radicals and effect of 17-beta-estradiol administration. *Nephron* 85, 65–70.

Muggia FM and Green MD 1991. New anthracycline antitumor antibiotics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 11, 43–64.

Muñoz M, Rincón J, Pedrañez A, Viera N, Hernández-Fonseca JP and Mosquera J

2011. Proinflammatory role of angiotensin II in a rat nephrosis model induced by adriamycin. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* doi: 10.1177/1470320311410092. Published online: 24 June 2011.

Nakhoul F, Ramadan R, Khankin E, Yaccob A, Kositch Z, Lewin M, Assady S and Abassi Z 2005. Glomerular abundance of nephrin and podocin in experimental nephrotic syndrome: different effects of antiproteinuric therapies. *American Journal of Physiology Renal physiology* 289, 880–890.

Nascimento MCMO and Martins AS 2005. Cardiomiopatia induzida pela adriamicina: uma revisão. *Arquivos de Ciência da Saúde* 12, 111–115.

O'donnell MP, Michels L, Kasiske B, Raij L and Keane WF 1985. Adriamycin-induced chronic proteinuria: a structural and functional study. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 106, 62–67.

Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, Onoyama K, Fujimi S and Fujishima M 1986. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney International* 29, 502–510.

Olson RD, Mushlin PS, Brenner DE, Fleischer S, Cusack BJ, Chang BK and Boucek Jr RJ 1988. Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, Doxorubicinol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 3585–3589.

Park SS, Eom YW and Choi KS 2005. Cdc2 and Cdk2 play critical roles in low dose doxorubicin-induced cell death through mitotic catastrophe but not in high dose doxorubicin-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334, 1014–1021.

Pasi A, Dendorfer U, Holthofer H, Nelson PJ, Tazzari S, Armelloni S, Fornasieri A, D'Amico G and Schlondorff D 1997. Characterization of nephropathy induced by immunization with high molecular weight dextran. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 12, 1849-1855.

Pedraza-ChaverrI J, Murali NS, Croatt AJ, Alam J, Grande JP and Nath KA 2006. Proteinuria as a determinant of renal expression of heme oxygenase-1: studies in models of glomerular and tubular proteinuria in the rat. *American journal of physiology Renal Physiology* 290, 196–204.

Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC, Durvasula RV, Hauser PV, Kowalewska J, Krofft RD, Logar CM, Marshall CB, Ohse T and Shankland SJ 2009. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *American Journal of Physiology*

*Renal Physiology* 296, 213-229

Rangan GK, Wang Y, Yuet-Ching T, Chen L and Harris DH 1998. Mild gentamicin nephrotoxicity reduces the progression of chronic adriamycin nephrosis. *Nephrology* 4, 57–64.

Rangan GK, Harris DCH, Tay YC and Wang Y 1999. Inhibition of nuclear factor-kb activation reduces cortical tubulointerstitial injury in proteinuric rats. *Kidney International* 56, 118–134.

Rangan GK, Harris DC and Wang Y 2001. Induction of proteinuric chronic glomerular disease in the rat (*Rattus norvegicus*) by intracardiac injection of doxorubicin hydrochloride. *Contemporary Topics In Laboratory Animal Science* 40, 44–49

Reiser J, Gersdorff GV, Loos M; Oh J, Asanuma K, Giardino L, Rastaldi MP, Calvaresi N, Watanabe H, Schwarz K, Faul C, Kretzler M, Davidson A, Sugimoto H, Kalluri R, Sharpe AH, Kreidberg JA and Mundel P 2004. Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* 113, 1390–1397.

Sakemi T, Ohtsuka N, Tomiyoshi Y and Morito F 1996. Sex difference in progression of adriamycin-induced nephropathy in rats. *American Journal of Nephrology* 16, 540–547.

Sampaio-Maia B, Moreira-Rodrigues M, Serrão P and Pestana M 2006. Blunted renal dopaminergic system activity in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 21, 314–323.

Seiler MW, Rennke HG, Venkatachalam MA and Cotran RS 1977. Pathogenesis of polycation-induced alterations ("fusion") of glomerular epithelium. *Laboratory Investigation* 36, 48–61.

Sellier-leclerc AL, Duval A, Riveron S, Macher MA, Deschenes G, Loirat C, Verpont M-C, Peuchmaur M, Ronco P, Monteiro, RC and Haddad E 2007. A humanized mouse model of idiopathic nephrotic syndrome suggests a pathogenic role for immature cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 18, 2732–2739.

Shearer GC, Newman JW, Hammock BD and Kaysen GA 2005. Graded Effects of Proteinuria on HDL Structure in Nephrotic Rats. *Journal of the American Society of Nephrology* 16, 1309–1319.

Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner JH and Shaw AS 1999. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 286, 312–15.

Shui HA, Ka SM, Lin JC, Lee JH, Jin JS, Lin YF, Sheu L-F and Chen A 2006. Fibronectin in blood invokes the development of focal segmental glomerulosclerosis in mouse model. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 21, 1794–1802.

Souto MFO, Teixeira MM, Penido MGMG and Simões e Silva AC 2008. Fisiopatologia da Síndrome Nefrótica em crianças e adolescentes. *Archivos Latinoamericanos de Nefrologia Pediátrica* 8, 1-10.

Sternberg SS 1970. Cross-striated fibrils and other ultrastructural alterations in glomeruli of rats with daunomycin nephrosis. *Laboratory Investigation* 23, 39–51.

Takiue K, Sugiyama H, Inoue T, Morinaga H, Kikumoto Y, Kitagawa M, Kitamura S, Maeshima Y, Wang DH, Masuoka N, Ogino K and Makino H 2012. Acatalasemic mice are mildly susceptible to adriamycin nephropathy and exhibit increased albuminuria and glomerulosclerosis. *BMC Nephrology* 13/14, 01–10.

Tavoloni N and Guarino AM 1980. Disposition and metabolism of adriamycin in the rat. *Pharmacology* 21, 244–255.

Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Kinugasa S, Fukuda S, Sakai T and Fujita T 2008. Glomerular albumin filtration through podocyte cell body in puromycin aminonucleoside nephrotic rat. *Medical Molecular Morphology* 41, 92–98.

Tong J, Ganguly PK and Singal PK 1991. Myocardial adrenergic changes at two stages of heart failure due to Adriamycin treatment in rats. *The American Journal of Physiology* 260, 909–916

Tsuchiya N, Torii M, Narama I and Matsui T 2009. Nephrotic Syndrome Induced by Dibasic Sodium Phosphate Injections for Twenty-eight Days in Rats. *Toxicologic Pathology* 37, 270–279.

Van Goor H, Van Der Horst MLC, Atmosoerodjo J, Joles JA, Van To A and Grond J 1993. Renal Apolipoproteins in Nephrotic Rats. *The American Journal of Pathology* 142, 1804-1812.

Vielhauer V, Berning E, Eis V, Kretzler M, Segerer S, Strutz F, Horuk R, Grone HJ, Schlondorff D and Anders HJ 2004. CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney*

*International* 66, 2264–2278.

Vogt B, Dick B, Marti HP, Frey FJ and Frey BM 2002. Reduced 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in experimental nephrotic syndrome. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 17, 753–758.

Wang Y, Wang YP, Tay YC and Harris DCH 2000. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney International* 58, 1797–1804.

Wang LM, Chi HJ, Wang LN, Nie L, Zou YH, Zhao TN, LI C-Y, Chen M and Huo MX 2010. Expression of interleukin 6 in rat model of doxorubicin induced nephropathy. *Chinese Journal of Contemporary Pediatric* 12, 912–913.

Weening JJ and Rennke HG 1983. Glomerular permeability and polyanion in adriamycin nephrosis in the rat. *Kidney International* 24, 152–159.

Weening JJ, Daha MR, Klar N, Van Der Wal A, Van Guldener C and Prins FA 1987. The Pathophysiology of Protein-Overload Proteinuria. *The American Journal of Pathology* 129, 64–73.

Weiss RB 1992. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Seminars in Oncology* 19, 670–86.

Wilkinson PM and Mawer GE 1974. The persistence of Adriamycin in man and rats. *British journal of clinical pharmacology* 1, 241-247.

Wu H, Wang Y, Tay YC, Zheng G, Zhang C, Alexander SI and Harris DCH 2005. DNA vaccination with naked DNA encoding MCP-1 and RANTES protects against renal injury in adriamycin nephropathy. *Kidney International* 67, 2178–2186.

Wu H, Wang YM, Wang Y, Hu M, Zhang GY, Knight JF, Harris DCH and Alexander SI 2007. Depletion of  $\gamma$ - $\delta$  T cells exacerbates murine adriamycin nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 18, 1180–1189.

Yesair DW, Schwartzbach E, Shuck D, Denine EP and Asbell MA 1972. Comparative Pharmacokinetics of Daunomycin and Adriamycin in Several Animal Species. *Cancer Research* 32, 1177–1183.

Zenker M, Machuca E and Antignac C 2009. Genetics of nephrotic syndrome: new insights into molecules acting at the glomerular filtration barrier. *Journal of Molecular*

*Medicine* 87, 849-857.

Zheng Z, Schmidt-Ott KM, Chua S, Foster KA, D'Agati VD, Frankel RZ, Pavlidis P, Barasch J, D'Agati VD and Ghavari AG 2005. A Mendelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2502–2507.

Zheng Z, Chua S, D'agati VD, Gharavi AG and Pavlidis P 2006. An ancestral haplotype defines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the laboratory mouse. *Journal of the American Society of Nephrology* 17, 1796–1800.

## 2.2 Investigações imunológicas na síndrome nefrótica idiopática

Wagner de Fátima Pereira<sup>1</sup>, Thiago Guimarães R. Carvalho<sup>2</sup>, Gustavo Eustáquio Alvim Brito-Melo<sup>1</sup>, Fábio Tadeu Lourenço Guimarães<sup>1</sup>, Ana Cristina Simões e Silva<sup>2,a</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de imunologia, Centro Integrado de Pesquisa em Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório interdisciplinar de investigações médicas Unidade de nefrologia pediátrica, Departamento de Pediatria, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>a</sup> Endereço corrente – Laboratório interdisciplinar de investigações médicas – Faculdade de Medicina – Avenida Alfredo Balena, 190, 2º andar, sala 281, Bairro Santa Efigênia, Belo Horizonte, Minas Gerais. Brasil. Cep: 30130-100

Autor correspondente: Ana Cristina Simões e Silva. E-mail: [acssilva@hotmail.com](mailto:acssilva@hotmail.com)

**Resumo**

A Síndrome Nefrótica Idiopática (SNI) é uma doença multifatorial, caracterizada por proteinúria, hipoalbuminemia, edema generalizado e hiperlipidemia. Estudos, em humanos e modelos animais associaram a SNI às alterações na resposta imunológica. O objetivo deste artigo é rever as evidências clínicas e experimentais da participação da resposta imunológica na etiopatogenia da SNI. Existe um consenso, sobre o envolvimento do sistema imunológico como indutor ou perpetuador da SNI, contudo, ainda sem um padrão bem definido de resposta. A maioria dos estudos demonstram alterações na dinâmica dos linfócitos T, especialmente das células T reguladoras, além dos relatos da participação do sistema complemento e dos linfócitos B na fisiopatologia da SN. Não existe um marcador imunológico incontestavelmente relacionado à proteinúria, apesar das evidências apontarem para a participação de algumas citocinas tais como a IL-8. Tendo em vista a complexidade fisiopatológica da SNI e a diversidade de resultados em diferentes estudos, avaliações longitudinais caracterizando o perfil evolutivo da resposta imunológica poderiam servir de base para o desenvolvimento de imunoterapias específicas e individualizadas, úteis para a melhora clínica do paciente e melhor prognóstico da doença.

**Descritores:** Síndrome nefrótica idiopática. Imunologia. Inflamação. Linfócitos. Citocinas. Revisão.

**Abstract**

Idiopathic nephrotic syndrome (INS) is a multifactorial disease, characterized by proteinuria, hypoalbuminemia, generalized edema and hyperlipidemia. Studies in humans and animals models associated INS with changes in the immune response. This article purpose is to reveal clinical and experimental evidences of the involvement of the immunological response in the pathogenesis of INS. There is a consensus on the involvement of the immune system to induce or perpetuates INS, however, still there is not a well-defined pattern of response. Most of the studies show changes in the dynamic of T lymphocytes, especially of the regulatory T cells, in addition of reports of the involvement of the complement system and B lymphocytes in the NS pathophysiology. There is no immunological marker undeniably linked to proteinuria, despite evidences suggesting the involvement of some cytokines such as IL-8. In order of the pathophysiological complexity of INS, longitudinal studies, characterizing the developmental profile of the immune response could be the bases for the development of specific and individualized immunotherapies, useful for the clinical improvement and better prognosis.

**Keywords:** Idiopathic nephrotic syndrome. Immunology. Inflammation. Lymphocytes. Cytokines. Review.

## **Introdução**

A Síndrome Nefrótica (SN) é uma glomerulopatia bastante comum em crianças e adultos [1,2], caracteriza-se por proteinúria maciça, hipoalbuminemia, edema generalizado, hiperlipidemia e pode ser provocada por lesão renal primária ou estar associada às doenças sistêmicas [1,2]. Denomina-se síndrome nefrótica idiopática (SNI) aquela provocada por lesão renal primária, que pode ser do tipo síndrome nefrótica por lesões mínimas (SNLM) ou glomeruloesclerose focal e segmentar (GEFS) [1,3]. Devido à relevância clínica da resposta ao tratamento com corticosteróides a SNI também foi classificada em síndrome nefrótica cortico-sensível (SNCS), síndrome nefrótica córtico-dependente (SNCD) e síndrome nefrótica córtico-resistente (SNCR) [1].

Algumas evidências sugerem um papel importante do sistema imune no desencadeamento ou manutenção da SNI, tais como a resposta anormal dos linfócitos T [4,5], a participação de citocinas [6], a existência de um fator de permeabilidade vascular circulante, relacionado às recidivas da doença após transplantes renal [6] e a melhora clínica observada após o tratamento com corticosteróides e imunossuppressores [7].

Apesar dos avanços nos estudos da SNI nas últimas décadas, em especial no campo da imunologia, sua fisiopatologia ainda permanece desconhecida [3]. O objetivo desse trabalho é rever os diferentes estudos, realizados em humanos e em modelo animal, caracterizando a participação da resposta imune na fisiopatologia da SNI, a fim de abrir perspectivas para novos estudos, uma vez que o melhor entendimento da fisiopatologia desta síndrome proporcionará o desenvolvimento de terapias mais eficazes e específicas.

## **Papel do Sistema Imune na Síndrome Nefrótica**

### Aspectos históricos

No ano de 1956, Gitlin e colaboradores [8] comprovaram o aumento da síntese de gamaglobulinas em crianças com SNI, provavelmente o primeiro relato de alteração imunológica em pacientes com SN. Alguns anos mais tarde, nas décadas de 70/80, diversos pesquisadores direcionaram o foco das investigações sobre a SN para as abordagens imunológicas desta doença, sobretudo as alterações dos linfócitos T e das imunoglobulinas [4,9-13]. Foram relatados aumento na concentração sérica de imunoglobulinas IgM [11] e

redução de IgG em pacientes com SN [11,12,14]. Tais descobertas foram confirmados posteriormente em modelo animal de SN induzida pelo Aminonucleosídeo de Puromicina (PAN) [15].

Em 1974 Shalboub e colaboradores [9] hipotetizaram que uma alteração primária das células T, resultaria na produção de linfocinas tóxicas circulantes, sendo responsável pela desordem conhecida como Nefrose Lipóide. Em 1976, Moorthy e colaboradores [16] demonstraram que o plasma de pacientes com Nefrose Lipóide inibia a resposta blastogênica de linfócitos ao mitógeno Fitohemaglutinina (PHA). A Nefrose Lipóide posteriormente foi denominada SNLM e a linfocina tóxica como fator de permeabilidade vascular [17,18]. Nos estudos iniciais o sobrenadante da cultura de leucócitos, de pacientes com SNI, induziu proteinúria em ratos [10,13] e a substância presente nesse sobrenadante, descrita como linfocina e denominada Fator Reativo de Pele (Skin Reactive Factor) [19], provocou redução nos sítios aniônicos da membrana basal glomerular, associada à proteinúria [13,20].

O Infiltrado inflamatório renal na patogênese da SNI:

Na SNI, observa-se precocemente infiltrado inflamatório túbulo-intersticial de células mononucleares, com predomínio de monócitos/macrófagos e linfócitos T [21-23]. A intensidade do infiltrado inflamatório está associada à redução na filtração glomerular, deposição de proteínas da matriz extracelular, formação de tecido cicatricial e posterior esclerose intersticial [21,24]. Crianças com SNI do tipo GEFS apresentaram maior quantidade de linfócitos e macrófagos no tecido renal do que aquelas com SNLM [25]. As células do epitélio tubular podem atuar como células apresentadoras de antígenos e estimular os linfócitos T, perpetuando assim o processo inflamatório [21].

Glomérulos de ratos com SN apresentaram maior expressão de B7-1 (CD80), molécula coestimulatória geralmente presente na superfície de linfócitos B e de células apresentadoras de antígenos [26]. O tecido renal de animais com SN induzida pela doxorrubicina mostrou acúmulo intersticial inicial de macrófagos [27-29], com posterior diminuição destes [28,30] e aumento na quantidade de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> [30], com predomínio das células TCD4<sup>+</sup> [31]. O infiltrado de monócitos/macrófagos no tecido renal foi relacionado ao aumento na expressão de moléculas de adesão do tipo ICAM-1 [32]. Linfócitos CD25<sup>+</sup> também foram evidenciados no interstício renal de animais com SN induzida pela doxorrubicina [29]. Embora exista relato da presença de macrófagos também

nos glomérulos de animais com SN [32], a maior parte dos estudos não tem detectado infiltração glomerular por macrófagos e nem por linfócitos [23,28,30,33].

Fatores teciduais atuam na determinação do fenótipo de monócitos/macrófagos recrutados para o tecido renal e o perfil das citocinas liberadas no tecido renal regula o processo de diferenciação das células mononucleares. Citocinas do tipo Th1 induzem diferenciação em macrófagos clássicos, denominados M-1, citotóxicos e produtores de citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, as citocinas do tipo Th2 originam macrófagos alternativos, denominados M-2, produtores de citocinas anti-inflamatórias [23, 34-36]. Macrófagos de camundongos saudáveis cultivados na presença de IL-4 e IL-13 ou de lipopolissacarídeos (LPS) induziram fenótipos M-2 e M-1, respectivamente. Em seguida, as células M-2 injetadas em camundongos com SN reduziram a quantidade de macrófagos renais nativos (M-1), bem como as alterações bioquímicas e histológicas da doença, enquanto os animais injetados com células M-1 apresentaram piora da doença [36]. Em experimento mais recente, macrófagos diferenciados em M-2, pela ação das citocinas IL-10 e TGF-beta, também inibiram os macrófagos M-1 e os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> e induziram a diferenciação de células T reguladoras no interstício renal de camundongos com SN induzida pela doxorrubicina, com consequente melhora dos animais [23].

#### Participação dos linfócitos T na patogênese da SNI

Estudos iniciais sugeriram a existência de um fator sérico responsável pela redução na função dos linfócitos T em indivíduos com SNI [4,16,37,38], além de alterações nos percentuais dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> [38]. Em 1985, Schnaper e Aune [37] relataram a presença de um fator solúvel na urina e no soro, de crianças com SNLM, denominado supressor solúvel da resposta imune (SIRS). Outros estudos mostraram alterações na relação entre as subpopulações de linfócitos T, TCD4<sup>+</sup> / TCD8<sup>+</sup>, no sangue periférico de pacientes com SN, com menor atividade das células TCD4<sup>+</sup> [12,39,40], aumento na quantidade dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> [39] e das células *natural killer* (NK) [40]. Em modelo animal de SN, a depleção dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> induziu aumento dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> e macrófagos no tecido renal e piora da doença, sugerindo assim função protetora para os linfócitos TCD4<sup>+</sup> [41]. Em trabalho de pesquisa paralelo, a depleção dos linfócitos TCD8<sup>+</sup>, também em modelo animal de SN, reduziu significativamente as lesões renais e a quantidade de macrófagos teciduais, sugerindo então função deletéria para estas células [42].

As evidências iniciais da participação dos linfócitos T na patogênese da SNI foram reforçadas pelo estudo de Tejani e colaboradores [43] que, utilizaram Ciclosporina-A para induzir remissão da doença em crianças, associada à redução nos níveis de Interleucina-2 (IL-2), uma citocina produzida predominantemente por linfócitos T. As ciclosporinas ainda são bem indicadas no tratamento da SNI, especialmente naqueles indivíduos resistentes aos corticóides [7].

Trabalhos mais recentes também demonstraram alterações na resposta dos linfócitos T na SNI, como na pesquisa de Okuyama e colaboradores [44], em que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com SNI aumentaram a expressão de RNAm para a proteína apoptótica TRAIL, sugerindo assim possível participação da mesma na função alterada dos linfócitos T. Na pesquisa de Musial e colaboradores [45] ocorreu redução na expressão da cadeia zeta nas células NK no sangue periférico de crianças com SNI e também em linfócitos TCD8<sup>+</sup> em cultura estimulada com anti-CD3/IL-2r. A cadeia zeta é componente do complexo, receptor de células T/CD3 (TCR/CD3) de linfócitos T, e também do CD16, molécula expressa na superfície de células NK, sendo importante na ativação e proliferação destas células, por coestimulação. A redução na expressão da cadeia zeta pode ser devido ao aumento da sua degradação em resposta à hiperatividade dessas células [45].

A gravidade da SNI está associada a menor atividade das células T reguladoras [6,18,23,46-48]. A principal célula com capacidade imunossupressiva é o linfócito T regulador natural, um linfócito TCD4<sup>+</sup> diferenciado no timo e que constitutivamente expressa alta concentração de CD25, uma cadeia alfa do receptor para a citocina IL-2 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) [49]. A célula T reguladora induzida origina-se na circulação periférica a partir da célula TCD4<sup>+</sup> virgem (TCD4<sup>+</sup> *naïves*) sob a ação de estímulos antigênicos [49] ou de citocinas imunossupressivas, como a TGF-beta [50] (FIG. 1). As células reguladoras induzidas são subdivididas em Th3 (produtoras de TGF-beta) e Tr1 (produtoras de IL-10 e IFN-alfa) [51]. O fator de transcrição FOXP3 atua na conversão das células TCD4 virgens em TCD4 reguladoras [50,51]. Outras populações de células como os linfócitos TCD8<sup>+</sup> reguladores e as NKT reguladoras, podem também assumir função imunossupressora (para maiores detalhes, ver revisão de Le e Chao [51]).

A participação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> na fisiopatologia da SN em modelo animal foi descrita inicialmente por Wang e colaboradores [41] ao observarem que a depleção destas

células piorou a doença, sugerindo assim função protetora para estes linfócitos, sem definirem, contudo, qual subclasse de linfócitos TCD4<sup>+</sup> teria esta função protetora. Posteriormente, este mesmo grupo relatou que a transfecção viral de FOXP3 em células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> gerou células T reguladoras, com altos níveis de FOXP3, TGF-beta e CTLA-4, que inibiram a proliferação, *in vitro*, das células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Após serem injetadas em camundongos com SN induzida pela doxorrubicina, estas células reduziram as alterações bioquímicas e histológicas características da doença [52]. Em outra investigação deste mesmo grupo, linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> inibiram a produção de TNF-alfa, IL-12, MIP-1 alfa/CCL3 e iNOS em cultura de macrófagos, sendo esta ação dependente de TFG-beta, mas não de IL-10 [53]. Linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> também reduziram a quantidade de macrófagos no interstício renal de animais com SN induzida pela doxorrubicina e aumentaram a expressão renal de FOXP3, sendo que o grau de melhora das lesões teciduais foi diretamente correlacionado aos níveis de FOXP3 e dependentes da presença de TGF-beta [53]. Pesquisa realizada em crianças com SNI também mostrou redução na quantidade de FOXP3 no tecido renal desses pacientes [25].

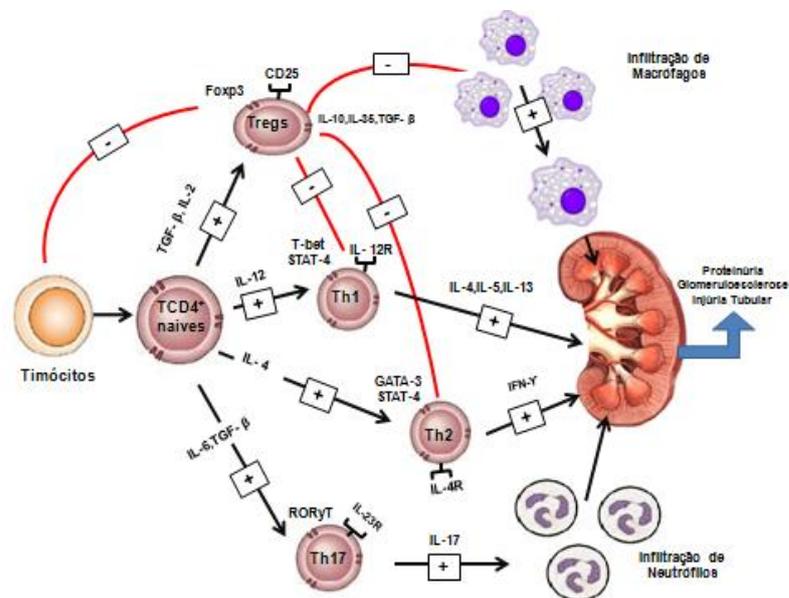


FIGURA 1 - Função supressora das células T reguladoras - Células TCD4<sup>+</sup> naíves assumem fenótipos Th1, Th2, Th17 e T-reg de acordo com as citocinas locais - modificado de Wang, et al. [47] .

Em camundongos com SN induzida pela doxorrubicina foi observado aumento na expressão renal de TGF-beta pelas células Tγδ (gama-delta), um subgrupo de células T cujo

TCR é formado pelas subunidades gama e delta. A depleção destas células, de fenótipo regulatório, promoveu piora da doença, sugerindo assim que a produção do TGF-beta, pelas células T- $\gamma\delta$ , estaria relacionada à ativação das células T reguladoras [46]. Células T reguladoras ( $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ ) de pacientes com SNLM apresentaram pior capacidade supressora sobre a proliferação das células T efetoras ( $CD4^+CD25^-FOXP3^-$ ), quando cultivadas em conjunto. Embora não tenha ocorrido redução na quantidade de células T reguladoras nem nos níveis de IL-2 ou TGF-beta, os níveis de IL-10 estavam reduzidos nesses pacientes [5]. Na pesquisa realizada por Shao e colaboradores (2009), em células mononucleares do sangue periférico de crianças com SNI, ocorreu redução na frequência de células T reguladoras e aumento na frequência das células Th17, sendo sugerido que o aumento na relação celular Th17/ T reguladora pode induzir inflamação tecidual local e contribuir para a lesão renal, proteinúria e progressão da SNI [54]. Recentemente, o aumento na resposta Th17 também foi destacada em modelo animal de SN induzida pela doxorrubicina [55].

Algumas observações paralelas contribuíram com as evidências acerca das alterações no balanço e perfil funcional das células T reguladoras na SNI, como a incidência de SN em pacientes com a síndrome ligada ao cromossomo X (Síndrome IPEX), uma desordem genética por mutações no gene *FOXP3*, que resulta na produção defeituosa de linfócitos T-reguladores ( $CD4^+CD25^+$ ) [18,48]. Portanto, tem sido definida uma relação entre a atividade dos linfócitos T-reguladores ( $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ ) e a SNI.

De acordo com Sellier-Leclerc e colaboradores, 2007 [56] a patogênese da SNI apresenta maior relação com a atuação das células imaturas do que das células T periféricas diferenciadas, uma vez que células-tronco, imaturas ( $CD34^+$ ) e células mononucleares do sangue periférico ( $CD34^-$ ) provenientes de pacientes com SNI, após serem injetadas em camundongos imunocomprometidos (SCID), induziram o surgimento de células  $CD45^+$  (leucócitos humanos) no sangue periférico destes animais. Contudo somente os animais que receberam as células-tronco ( $CD34^+$ ) desenvolveram proteinúria.

As descobertas das décadas de 70/80 corroboraram as suspeitas iniciais da participação da resposta imune na patogenia da SNI. Desde então, vários estudos têm procurado elucidar a relação complexa entre a regulação do sistema imune e a SNI, tanto em humanos quanto em modelos animais. As tabelas 1 e 2 resumem as principais descobertas desses estudos

TABELA 1

Resultados de avaliações imunológicas em estudos com pacientes portadores de S.N.I

Autores	Ano	Resultados Relevantes
[11]	1975	↑ Sérico de IgM e ↓ de IgG e IgA
[12]	1983	↓ Síntese de IgM e IgG e da relação LTCD4 <sup>+</sup> /LTCD8 <sup>+</sup> , com menor atividade LTCD4 <sup>+</sup> .
[14]	1985	↑ Sérico de IgM; IgE e LB e ↓ sérico de IgG ↓ na relação LTCD4 <sup>+</sup> /LTCD8 <sup>+</sup> .
[37]	1985	Presença de um fator solúvel na urina e no soro (Supressor Solúvel da Resposta Imune).
[39]	1991	↓ LTCD4 <sup>+</sup> e ↑ LTCD8 <sup>+</sup> e da expressão de HLA-DR na superfície de LTCD8 <sup>+</sup> .
[20]	1992	Sobrenadante da Cultura de PBMC de crianças com SNI induziu proteinúria e alterações elétricas na membrana basal glomerular de ratos.
[57]	1994	↑ IL-8/CXCL-8 sérica e de RNAm para IL-8/CXCL-8 nas PBMC.
[58]	1995	↑ IL-4; IL-8/CXCL-8, IFN-gama séricos e na produção de IL-2 e IL-4 em cultura de PBMC.
[59]	1999	↑ IL-13 em linfócitos TCD4 <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> no sangue periférico.
[40]	2002	↑ NK, LB, receptor solúvel da IL-2, TNF-alfa e ↓ na relação LTCD4 <sup>+</sup> /LTCD8 <sup>+</sup> .
[60]	2003	↑ Receptores solúveis de IgE (sCD23) e de IL-2 (sCD25).
[61]	2004	↑ Fator de transcrição para IL-4 ( <i>c-maf</i> ) e do fator de transcrição NF-KB em células LTCD4 <sup>+</sup> .
[3]	2008	↑ Sérico de TGF-b e correlação positiva entre ↑ urinários de IL-8/CXCL-8 e presença de proteinúria
[5]	2009	↓ IL-10 em linfócitos T-reg. e piora da capacidade supressora sobre linfócitos T-efet. ↑ IL-2, IL-8/CXCL-8 e TNF-a em cultura PMBC.
[62]	2009	↑ Sérico de IL-8/CXCL-8 e MIP-1beta/CCL4.
[54]	2009	↑ Frequência de Th17 e ↓ frequência de linfócitos T-reg. em PBMC. ↑ IL-6 e IL-1 no soro e ↑ IL-17 e TGF-beta no tecido renal
[25]	2010	↑ Percentual renal de LTCD3 <sup>+</sup> , macrófagos e LB e de linfócitos T-reg. (FOXP3 <sup>+</sup> ).
[45]	2010	↓ Expressão da cadeia zeta em células NK do sangue periférico e em LTCD8 <sup>+</sup> em cultura estimulada

TABELA 2

## Resultados de avaliações imunológicas em estudos utilizando modelo animal de S.N

Autores	Ano	Duração	Resultados Relevantes
[63]	1992	28 dias	Associação entre maior produção de IL-1 por macrófagos renais e presença de proteiúria.
[64]	1997	-----	↑ Síntese e secreção de MCP-1/CCL2 por células tubulares proximais cultivadas na presença de albumina.
[65]	1999	28 dias	Associação entre maior ativação do NF-kB e presença de proteinúria, infiltrado de macrófagos e lesão tecidual.
[30]	2000	42 dias	↑ Macrófagos no interstício e glomérulos e de LTCD4 <sup>+</sup> e LTCD8 <sup>+</sup> somente no interstício.
[30]	2000	42 dias	↓ Expressão de LTCD4 <sup>+</sup> induziu ↑ de LTCD8 <sup>+</sup> e macrófagos e consequente piora da lesão renal.
[41]	2001	42 dias	↓ Expressão de LTCD8 <sup>+</sup> ↓ a lesão renal.
[28]	2004	42 dias	Inibição do CCR1, receptor das quimiocinas CCL1, 2, 3, 4 e 5, que estão aumentadas no tecido renal, melhorou a SN.
[29]	2005	28 dias	Vacinação com DNA de MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5, melhorou os parâmetros bioquímicos e histológicos da doença.
[52]	2006	28 dias	A indução de linfócitos T-reg. ↓ a proliferação de linfócitos T-efet. e as alterações bioquímicas e histológicas da SN
[53]	2006	28 dias	Linfócitos T-reg., através do TGF-b, ↓ a quantidade e a ativação de macrófagos, ↑ a expressão renal de <i>FOXP3</i> .
[26]	2007	70 dias	Altos níveis de IL-13 induziram SN, hipercolesterolemia e ↑ na expressão glomerular de B7-1 (CD80).
[46]	2007	42 dias	Depleção dos LT(g/d), responsáveis pela alta expressão de TGF-b, promoveu piora da SN
[66]	2010	42 dias	Correlação positiva entre níveis aumentados de IL-6 na urina e tecido renal e a presença de proteinúria.
[23]	2010	28 dias	↓ Infiltrado inflamatório e melhora dos parâmetros bioquímicos e das lesões renais após transfusão de células M2.
[32]	2011	28 dias	Tratamento com antagonista AT-1 reduziu a expressão renal de ICAM-I, macrófagos e a produção de superóxidos.
[55]	2012	28 dias	Indução de resposta Th1, pelo uso do GSL-1, ↓ a resposta Th2 e reduziu a proteinúria e a lesão renal.

↑ = Aumento; ↓ = Redução; Ig = Imunoglobulinas; LTCD4<sup>+</sup>, LTCD8<sup>+</sup> e LTCD3<sup>+</sup> Linfócitos TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e TCD3<sup>+</sup>; LB=Linfócito B; PBMC = Células Mononucleares do Sangue Periférico; T-reg. = T-reguladores; T-efet. = T-efetores; NK = Células Natural Killer; MIP-1beta/CCL4 e MIP-1 alfa/CCL3 = Proteína Inflamatória Macrofágica-1 beta e 1 alfa; TGF-b = Fator de transformação de crescimento – beta; iNOS = Óxido nítrico sintase induzida; IL = Interleucinas; TNF-a = Fator de Necrose Tumoral – alfa; HLA-DR = Antígeno Leucocitário Humano; PDGF-BB = Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas; B7-1 = Molécula coestimulatória; LT(g/d) = Linfócitos T gama/delta; Células M2 = macrófagos produtores de IL-10 e TGF-b; AT-1 = Receptor da angiotensina II; GSL-1 = Glicosíngolípido bacteriano, agonista de resposta Th1 em células T natural killer

## Participação dos linfócitos B e sistema do complemento na patogênese da SNI

Poucos trabalhos investigaram o envolvimento dos linfócitos B em pacientes com SNI. Estudos pioneiros destacaram o aumento na quantidade destas células na fase ativa da doença [14,38,67]. Alguns estudos mais recentes mostraram o envolvimento dos linfócitos B na SNI, tanto de forma direta por análises histológicas [25] e hematológicas [40], quanto indiretamente pelo controle da SNI com o uso do Rituximab, um anticorpo inibidor da proliferação e diferenciação destas células [25,68-70]. Em pacientes com GEFS, o tratamento com Rituximab reduziu a proteinúria bem como a quantidade de linfócitos B no sangue periférico [68]. Níveis séricos elevados do receptor solúvel de IgE (sCD23) e níveis séricos e urinários elevados do receptor solúvel de IL-2 (sCD25) durante a fase de recidiva da SNI em crianças cortico-sensíveis sugerem anormalidades simultâneas, tanto dos linfócitos T quanto dos linfócitos B, na patogênese da SNI [60]. Em modelo animal de SN pela doxorrubicina, não foi destacada a presença de linfócitos B no tecido renal [30].

O sistema do complemento consiste em um conjunto de mais de trinta proteínas plasmáticas que podem estar solúveis ou aderidas às proteínas de superfície. A ativação de um componente do complemento promove uma cascata sequencial de reações com a produção de anafilatoxinas (C3a e C5a), potentes quimiotáticos para neutrófilos e monócitos. O resultado final da ativação do complemento é a formação do complexo de ataque à membrana (MAC; C5b-9), também denominado complexo terminal do complemento (TCC), responsável pela formação de poros na membrana, resultando em lise celular [71].

O sistema do complemento está relacionado às alterações inflamatórias no tecido renal. A ativação deste sistema, *in vitro*, induziu a formação do MAC na superfície de células epiteliais túbulo-proximais humanas além da produção das citocinas IL-6 e TNF-alfa, efeito este dependente do componente C6 [72]. Tanto a ultrafiltração glomerular dos componentes do sistema do complemento, quanto a formação intratubular do MAC estão relacionados ao acúmulo de miofibroblastos peritubulares em ratos com SN induzida pela doxorrubicina, eventos estes dependentes da atuação do componente C6 do sistema complemento [73]. Em modelo de SN induzida pelo Aminonucleosídeo de Puromicina, o bloqueio da formação do MAC produziu melhoras nos animais [74].

As superfícies das células do túbulo proximal apresentam atividade de C3 convertase, portanto, alterações na barreira de filtração glomerular e presença de proteínas do

sistema do complemento no filtrado tubular induz ativação destas proteínas e consequente formação do MAC [72]. Em modelo animal de doença renal crônica, não proteinúrica, o MAC não influenciou o desenvolvimento da lesão tubulointersticial, confirmando assim que a participação do sistema do complemento está condicionada à presença de proteínas na luz tubular [75]. Em geral os relatos da presença e ativação do sistema complemento na SN apontam para uma localização tubular e peritubular dos componentes deste sistema [73,76].

Diferentes modelos animais de SN ou esclerose glomerular foram utilizados para demonstrar a participação do sistema do complemento na etiopatogenia da doença [73,76-78]. No modelo de SN por sobrecarga proteica foram detectados depósitos dos componentes C3 e formação do MAC na superfície luminal das células túbulo- proximais [76]. A ausência do componente C6 protegeu o animal do acúmulo de miofibroblastos peritubulares, mas não alterou o declínio da função renal, sugerindo a existência de outros fatores envolvidos na promoção da lesão túbulo-intersticial [73]. Em modelo animal de glomerulonefrite, o bloqueio do CD59, uma proteína regulatória que inibe a formação final do MAC, provocou acúmulo glomerular de macrófagos, maior formação do MAC, aumento na expressão das moléculas de adesão (ICAM-1) e maior deposição de fibrina nos glomérulos [79]. Efeitos semelhantes foram demonstrados em modelo animal de glomerulonefrite usando camundongos *knockout* para o gen *CD59a* [78,80]. Em modelo animal de SN imune-induzida, utilizando camundongos *knockout* para o CD55, outro fator regulador do sistema do complemento, também ocorreu aumento da esclerose renal e alterações bioquímicas características da SN [77]. Em modelo animal de SN induzida pela doxorrubicina, o sistema do complemento é ativado pela via alternativa [78].

#### Participação de citocinas e quimiocinas na patogênese da SNI

As citocinas são proteínas solúveis, de baixo peso molecular, secretadas por leucócitos e outras células do organismo e que atuam como mensageiros do sistema imune. As quimiocinas, ou citocinas quimiotáticas, representam uma classe de citocinas responsáveis pelo controle do tráfego basal e inflamatório de leucócitos, por meio da quimiotaxia. Em suas denominações, recebem a sigla CC, quando apresentam dois resíduos de cisteína na sua estrutura, ou a sigla CXC, quando os dois resíduos de cisteína são separados por outro aminoácido [81].

Alguns estudos demonstraram a participação das citocinas/quimiocinas no processo inflamatório responsável pela progressão da doença renal crônica e rejeição do transplante renal (para revisão, ver refs [82] e [83]). Também foi sugerida a possível utilização das citocinas/quimiocinas como biomarcadores de evolução da doença renal [84] e no prognóstico de transplantados renais [85].

Diferentes citocinas/quimiocinas foram destacadas em pacientes com SNI ou em modelo animal da doença (TAB. 2). Algumas destas citocinas/quimiocinas foram correlacionadas à proteinúria e sugeridas como candidatas ao fator de permeabilidade glomerular, responsável pela proteinúria em pacientes com SNI ou em modelo animal da doença, tais como a IL-1 [63], IL-6 [66] e IL-8/CXCL8 [86,87]. Outro candidato ao fator de permeabilidade glomerular é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Por ser capaz de induzir fenestrações em leitos capilares normalmente não fenestrados [88] e estar presente, constitutivamente, nos capilares glomerulares e peritubulares [89], suspeitou-se que o VEGF poderia ser o fator de permeabilidade relacionado à proteinúria na SNI [90,91]. Contudo, em pacientes com SNI, os níveis deste fator não diferiram entre as fases de recidiva e de remissão da doença. Além disso, a injeção de VEGF, proveniente do soro de pacientes com SNI, não foi capaz de induzir proteinúria em ratos [90,91].

Em modelo animal de SN induzida pela doxorrubicina, a IL-1, secretada por macrófagos residentes glomerulares, foi associada à proteinúria [63]. Concentrações aumentadas de IL-6 foram detectadas na urina e tecido renal de ratos com SN pela doxorrubicina e apresentaram correlação positiva com a proteinúria [66]. Diversos estudos também demonstraram concentrações elevadas de IL-8/CXCL-8 no soro [58,62,86] e na urina [87] de pacientes com SNI, bem como aumento nos níveis de RNAm para IL-8/CXCL-8 em cultura de PBMC destes pacientes [86]. A IL-8/CXCL-8 presente no sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes com SNI alterou o metabolismo dos componentes sulfatados na membrana basal glomerular de ratos [57,86]. As concentrações urinárias de IL-8/CXCL-8 apresentaram correlação positiva com a proteinúria de 24 horas em crianças com SNI [87].

Concentrações aumentadas de IL-2, IL-4 em cultura estimulada de PBMC [58], de TGF-beta plasmático [87], bem como de gens para TGF-beta e alguns efetores dos linfócitos T citotóxicos no tecido renal [92] foram detectadas em pacientes com SNI.

Em modelo animal de SN também há relatos de aumento nas concentrações renais das citocinas IL-4, IL-1, TNF-alfa, IL-12p40 e de IL-17 [55] e das quimiocinas RANTES/CCL5 (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted), Eotaxin/CCL11 [28,55], TCA-3/CCL1 (T-cell activation-3), MCP-1/CCL2 (proteína quimiotática para monócitos/macrófagos-1), MIP-1alfa/CCL3 (proteína inflamatória do macrófago-1 alfa) e MIP-1beta/CCL4 (proteína inflamatória do macrófago-1 beta) [28]. O bloqueio do receptor destas quimiocinas (CCR1) reduziu a infiltração de macrófagos, linfócitos, fibroblastos e também a fibrose renal [28]. Wang e colaboradores [64] demonstraram que células tubulares proximais, em cultura com altas concentrações de albumina, aumentaram a produção e a secreção de MCP-1/CCL2 na porção basolateral, sendo esta produção dependente da exposição contínua às proteínas. A imunização de ratos usando DNA de quimiocinas MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5, antes da indução da SN pela doxorrubicina, resultou em menor quimiotaxia de monócitos/macrófagos e melhora nos parâmetros bioquímicos e nas lesões renais [29]. A tabela 3 apresenta uma lista de estudos que relacionaram as citocinas e quimiocinas à SNI.

Nem todos os estudos mostraram alterações na expressão de citocinas ou correlações entre a presença de citocinas e os níveis de proteinúria em pacientes ou modelo animal de SN. Strehlau e colaboradores [92] não detectaram alterações significativas nos níveis renais de RNAm para IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, IL-8/CXCL-8, IL-17 ou RANTES/CCL5 em crianças com SNI. No trabalho de Neuhaus e colaboradores [58], em crianças com SNI, apesar de ter ocorrido aumento nas concentrações séricas de IL-4, IL-8/CXCL-8 e IFN-gama não houve correlação destas citocinas com a proteinúria. Segundo Valanciué, et al. [61] em pacientes com SNI além do aumento do fator de transcrição nuclear para ativação do gene da IL-4 (*c-maf*) nas células TCD4<sup>+</sup>, ocorre também aumento na atividade de outro fator de transcrição nuclear, o NF- $\kappa$ B [61]. O NF- $\kappa$ B está relacionado ao controle da expressão de diversas citocinas e moléculas de adesão celular [93,32]. Em modelo animal de SN induzida pela doxorrubicina, o aumento da atividade do NF- $\kappa$ B apresentou correlação positiva com a lesão renal [32,65,93].

TABELA 3  
Citocinas e quimiocinas relacionadas à etiopatogênese da SNI

Autores	Datas dos Estudos	Tipos de Citocinas
[63]; [52]; [55]	1992; 2009; 2012	IL-1
[92]; [58]; [5]; [40]	2002; 1995; 2009; 2010	IL-2
[58]; [55]	1995; 2012	IL-4
[52]; [66]	2009; 2010	IL-6
[3]; [58]; [62]; [57]; [5]	2008; 1995; 2009; 1994; 2009	IL-8/CXCL-8
[55]	2012	IL12-P40
[59]; [26]	1999; 2007	IL-13
[52]; [55]	2009; 2012	IL-17
[52]	2009	IL-23p19
[3]; [92]; [52]	2008; 2002; 2009	TGF-beta
[5]; [40]; [55]	2009; 2010; 2012	TNF-alfa
[58]; [40]	1995; 2010	IFN-gama
[28]	2004	TCA-3 (CCL1)
[28]	2004	MIP-1 alfa (CCL3)
[62]	2009	MIP-1 beta (CCL4)
[28]; [55]	2004; 2012	RANTES (CCL5)
[28]; [55]	2004; 2012	Eotaxina (CCL11)
[64]	1997	MCP-1/CCL2

IL = (Interleucinas); TGF-beta = Fator transformante de crescimento do tipo beta; TNF-alfa = Fator de necrose tumoral do tipo alfa; IFN-gama = Interferon do tipo gama; PDGF-BB = Fator de agregação plaquetária do tipo BB; TCA-3/CCL1 = Quimiocina produzida por células T ativadas (T-cell activation 3); MIP-1alfa/CCL3 = Proteína inflamatória de macrófagos do tipo 1 alfa; MIP-1beta/CCL4 = Proteína inflamatória de macrófagos do tipo 1 beta; RANTES/CCL5 = Quimiocina para linfócitos T, eosinófilos e basófilos (regulated and normal T cell expressed and secreted); eotaxina/CCL11 = Quimiocina para linfócitos T, eosinófilos e basófilos; MCP-1/CCL2 = proteína quimiotóxica para monócitos do tipo 1.

## **Padrão de resposta imune na síndrome nefrótica**

### Classificação dos Linfócitos T-helper segundo o padrão de citocinas

Em 1986, Mosmann e colaboradores [94], classificaram os linfócitos TCD4<sup>+</sup> de camundongos, em linfócitos Th1, produtores de IL-2, IL-3 e IFN-gama, e linfócitos Th2, também produtores de IL-3, além de duas outras citocinas, descritas inicialmente como fator de crescimento de células T (TCGF-2) e fator de crescimento de mastócitos (MCGF-2). Posteriormente esta mesma classificação foi proposta para humanos [95]. Contudo, muitas células T não podem ser classificadas em Th1 ou Th2 com base nestes critérios originais, devido à complexa mistura de citocinas liberadas pelas mesmas, sendo, portanto, classificadas como Th0 [95,96].

As células Th0 possivelmente são intermediárias na diferenciação das células T virgens (*naïves*) em Th1 ou Th2 [95]. Um padrão misto de citocinas (Th0) ocorre mais precocemente após ativação dos linfócitos e a caracterização em Th1 ou Th2 surge usualmente na fase crônica da doença [96]. De forma geral, células Th1 produzem IL-2, IFN-gama e TNF-beta enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Contudo, os principais marcadores para estas respostas são o IFN-gama e a IL-4, respectivamente (FIG. 2) [6,96]. Células TCD4<sup>+</sup> *naïves* sob a influência de IL-12 ou de IFN-gama se diferenciam em Th1, e pela influência da IL-4 se diferenciam em Th2. A IL-4, principal indutora da resposta Th2, é proveniente da ativação dos próprios linfócitos, sendo, portanto, um evento mais tardio na resposta imune, o que pode justificar a dificuldade em definir um padrão de polarização da resposta imune na SNI [96]. Ainda assim, alguns trabalhos têm caracterizado a SNI como uma resposta polarizada.

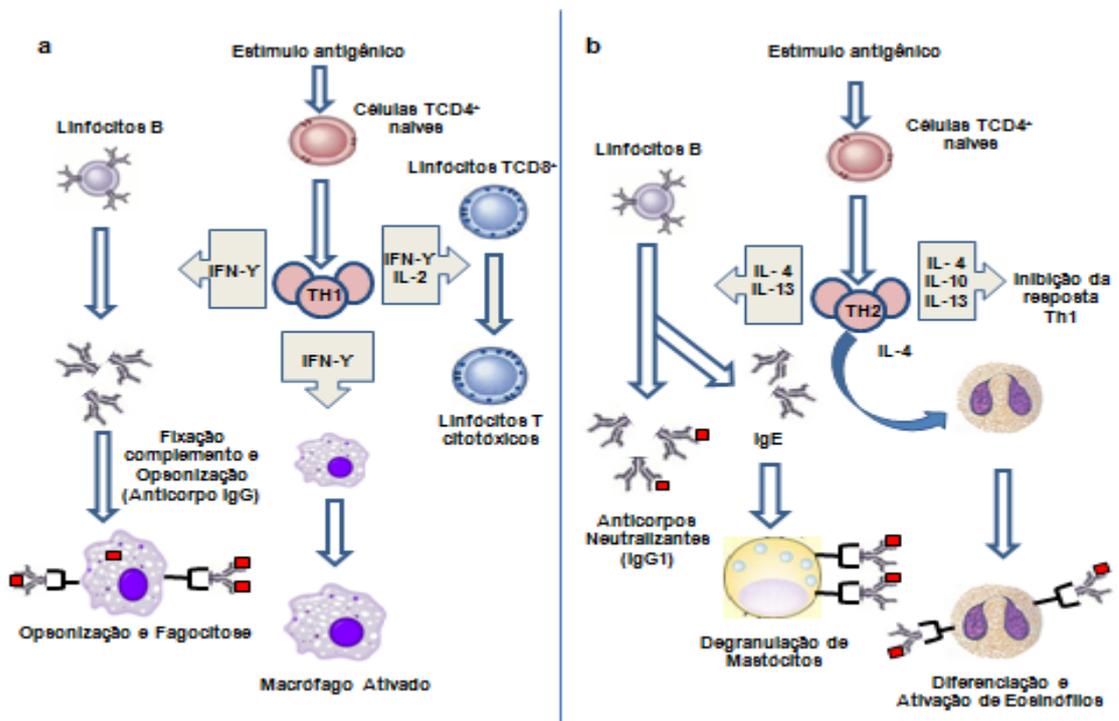


FIGURA 2 - Funções Efetoras de linfócitos Th1 e Th2. (A) Células Th1 induzem fagocitose e defesa, mediada por células T, contra microrganismos. (B) Células Th2 induzem produção de IgE e posterior degranulação de mastócitos e ativação de eosinófilos – modificado de Abbas; Murphy e Sher [96].

#### Respostas de padrão Th1/ Th2 na SNI

Algumas glomerulonefrites humanas tem resposta imune predominantemente Th1, incluindo a glomerulonefrite crescêntica e a membranoproliferativa, enquanto outras apresentam resposta predominantemente Th2, tais como nefropatia membranosa, nefropatia por IgA e a SNLM [97]. Alguns estudos abordaram a resposta imunológica na SNI como um desequilíbrio no eixo Th1/Th2 [6,22], com tendência à maior resposta Th2 [22,26,55,59,97].

Em ratos da linhagem Buffalo/Mna, portadores de SN espontânea, antes do início da proteinúria ocorrem alterações precoces no balanço entre as citocinas Th1 e Th2 com predomínio da resposta Th2 (IL-10 e IL-13) e inibição da resposta Th1 (IL-2 e IFN-gama) [22]. Foi observada quantidade elevada de RNAm para IL-13, em linfócitos TCD4+ e TCD8+ de crianças com SNI [26]. Ratos transfectados com IL-13 desenvolveram SN, com

hiperexpressão de receptores para IL-4 e IL-13 nos glomérulos e correlação entre os níveis séricos de IL-13 e a expressão glomerular de B7-1 (CD80), molécula coestimulatória geralmente presente na superfície de linfócitos B e de células apresentadoras de antígenos (APCs) [26]. O CD80 está relacionado à redução da apoptose e indução da proliferação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> efetores [98].

A susceptibilidade animal à lesão renal pela doxorrubicina pode estar ligada à resposta T-helper, pois camundongos da linhagem C57BL/6 que apresentam resposta polarizada para o eixo Th1 são resistentes ao modelo de SN pela doxorrubicina, enquanto a espécie BALBc, com resposta imune polarizada para o eixo Th2, são susceptíveis ao desenvolvimento da doença [99]. Recentemente foi demonstrado aumento na concentração da citocina IL-4 e da quimiocina eotaxina/CCL11, ambas relacionadas à resposta Th2, em tecido renal de animais com SN induzida pela doxorrubicina [55]. O estímulo à resposta Th1 pelo uso de antígeno bacteriano GSL-1 em animais com SN pela doxorrubicina reduziu a proteinúria e os fatores pró-fibrogênicos renais [55].

Apesar de vários estudos destacarem o predomínio da resposta Th2 na SNI, Lama e colaboradores [40] obtiveram resultados sugestivos de resposta Th1, com níveis elevados de IL-2, IL-2R e IFN-gama, em crianças com SNI córtico-sensível. De acordo com Araya e colaboradores [6] não existem evidências contundentes para definir um predomínio da resposta Th2 na SNI. A falta de padronização na escolha dos pacientes com SNI e as diferentes técnicas utilizadas para se mensurar os níveis de citocinas podem induzir resultados diversos [6,62], que muitas vezes indicam uma resposta Th1 [6,40].

Algumas limitações dificultam a investigação das citocinas na etiopatogênese da SNI, por apresentarem ação local, podem não ser adequadamente identificadas no plasma ou fluidos corporais. Além disso, uma vez no plasma podem se ligar aos receptores solúveis e moléculas antagonistas ou variar sua produção dependendo da fase da doença [58]. Fatores externos também interferem com o padrão de produção das citocinas como, por exemplo, mudanças no tipo ou na quantidade de proteínas ingeridas foram associadas as alterações no perfil das citocinas no tecido renal e órgãos linfoides em modelo animal de SN [100,101]. Sendo assim, a definição de uma resposta imune polarizada para Th1 ou Th2 também é limitada pelas dificuldades na identificação das citocinas envolvidas no processo de lesão renal na SNI.

## Considerações finais e perspectivas

Nas últimas décadas, muito se tem pesquisado sobre o papel do sistema imune na SNI por meio de estudos clínicos e da utilização de modelos animais, contudo, persistem muitas dúvidas sobre os mecanismos imunológicos relacionados a esta doença. Em função da diversidade de metodologias utilizadas, os resultados dos estudos clínicos e experimentais são muito variados, não estabelecendo um padrão definido de resposta imunológica.

Diversas evidências assinalam para a resposta alterada dos linfócitos T reguladores e alguns estudos sugerem um aumento na citotoxicidade, dependente dos linfócitos TCD8<sup>+</sup>, das células NK e das moléculas do complemento. Além disso, ressalta-se a participação dos macrófagos, principalmente na fase inicial da lesão renal. As pesquisas ainda não conseguiram identificar o fator de permeabilidade relacionado à proteinúria na SNI. Apesar de existirem evidências da participação de algumas citocinas/quimiocinas no aumento da permeabilidade glomerular, tais como a IL-8 (CXCL8), os resultados das investigações nem sempre são concordantes.

Dentre as perspectivas imunoterapêuticas, sugere-se a possível indução de células T reguladoras e a possibilidade da reprogramação dos macrófagos para um perfil protetor (M-2), por meio da utilização de citocinas Th2. Devido à intrincada relação entre as diferentes citocinas e entre as diversas células componentes da resposta imune é possível que a SNI não apresente fator causal único, mas seja decorrente de alterações simultâneas ou sucessivas em diferentes subtipos celulares e diferentes citocinas, dependendo de fatores relacionados à resposta imunológica individual, tempo da doença, resposta à terapia, dentre outros. Assim, consideramos que estudos longitudinais com pacientes e modelos animais, avaliados em diferentes fases evolutivas da doença, podem auxiliar no entendimento da resposta imunológica na SNI e na detecção de biomarcadores para a evolução e prognóstico da doença.

## Referências

1. Schachter AD. The pediatric nephrotic syndrome spectrum: clinical homogeneity and molecular heterogeneity. *Pediatr Transplant.* 2004; 8: 344-348.
2. D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk, RJ. Focal Segmental Glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 2011; 365:2398-2411
3. Souto MFO, Teixeira MM, Penido MGG, Simões e Silva AC. Fisiopatologia da Síndrome Nefrótica em crianças e adolescentes. *Arch Latin Nefr Ped.* 2008; 8:1-10.
4. Fodor P, Saitúa MT, Rodriguez E, González B, Schlesinger L. T-cell dysfunction in minimal-change nephrotic syndrome of childhood. *Am J Dis Child.* 1982; 136:713-717.
5. Araya C, Diaz L, Wasserfall C, Atkinson M, Mu W, Johnson R, *et al.* T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2009; 24:1691-1698.
6. Araya CE, Wasserfall CH, Brusko TM, Mu W, Segal MS, Johnson RJ, *et al.* A case of unfulfilled expectations cytokines in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21:603-610.
7. Mello VR, Guersoni AC, Martini D, Toporovski J. Ciclosporina no tratamento da síndrome nefrótica idiopática córtico-resistente e córtico-dependente. *J Bras Nefrol.* 2002; 24:11-17.
8. Gitlin D, Janeway CA, Farr LE. Studies of the metabolism of plasma proteins in the nephrotic syndrome. I. Albumin, y globulin and immunoglobulin *J Clin Invest.* 1956; 35:44-56.
9. Shalboub RJ. Pathogenesis of lipoid nephritis: a disorder of T cell function. *Lancet* 1974; 304:556-560.
10. Lagrue G, Branellec A, Blanc C, Xheneumont S, Beaudoux F, Sobel A, *et al.* A vascular permeability factor in lymphocyte culture supernants from patients with nephrotic syndrome II: Pharmacological and physicochemical Properties. *Biomedicine.* 1975; 23: 73-75.
11. Giangiacomo J, Cleary TG, Cole BR, Hoffstein P, Robson AM. Serum immunoglobulins in the nephrotic syndrome. A possible cause of minimal change

nephrotic syndrome. *N Engl J Med.* 1975; 293:08-12.

12. Herrod HG, Stapleton FB, Trouy RL, Roy S. Evaluation of T lymphocyte subpopulations in children with nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol.* 1983; 52:581-585.
13. Boulton JJM, Tulloch I, Dore B, Mclay A. Changes in the glomerular capillary wall induced by lymphocyte products and serum of nephrotic patients. *Clin Nephrol.* 1983; 20:72-77.
14. Yokoyama H, Kida H, Tani Y, Abe T, Tomosugi N, Koshino Y, *et al.* Immunodynamics of minimal change nephrotic syndrome in adults T and B lymphocyte subsets and serum immunoglobulin levels. *Clin Exp Immunol.* 1985; 61:601-607.
15. Beaman M, Oldfield S, Maclennan ICM, Michael J, Adu D. Hypogammaglobulinaemia in nephrotic rats is attributable to hypercatabolism of IgG. *Clin Exp Immunol.* 1988; 74:425-430.
16. Moorthy AV, Zimmerman SW, Burkholder PM. Inhibition of lymphocyte blastogenesis by plasma of patients with minimal change nephrotic syndrome. *Lancet.* 1976; 1:1160-1162.
17. Kausman JY, Kitching AR. A New Approach to Idiopathic Nephrotic Syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:2621-2622.
18. Hashimura Y, Nozu K, Kanegane H, Miyawaki T, Hayakawa A, Yoshikawa N, *et al.* Minimal change nephrotic syndrome associated with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2009; 24:1181-1186.
19. Lagrue G, Branellec A, Xheneumont S, Weil B. Lymphokine 'skin reactive factor' (SRF) and the nephrotic syndrome. *Bibl Anat.* 1975; 13:331-334.
20. Tanaka R, Yoshikawa N, Nakamura H, Ito H. Infusion of Peripheral Blood Mononuclear cell products from nephrotic children increases albuminuria in rats. *Nephron.* 1992; 60:35-41.
21. Riyuzo MC, Soares V. Revisão: Papel do infiltrado inflamatório na fibrose túbulo-intersticial e evolução das glomerulopatias. *J Bras Nefrol.* 2002; 24:40-47.

22. Le Berre L, Herve C, Buzelin F, Usal C, Souillou JP, Dantal J. Renal macrophage activation and Th2 polarization precedes the development of nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats. *Kidney Int.* 2005; 68:2079-2090.
23. Cao Q, Wang Y, Zheng D, Sun Y, Wang YA, Lee. IL-10/TGF- $\beta$ -Modified Macrophages Induce Regulatory T Cells and Protect against Adriamycin Nephrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21:933-942.
24. Kuncio G S, Neilson EG, Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 1991; 39:550-556.
25. Benz K, Büttner M, Dittrich K, Campean V, Dötsch J, Amann K. Characterization of renal immune cell infiltrates in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2010; 25:1291-1298.
26. Lai, K-W, Wei Ch-L, Tan L-K, Tan P-H,; Chiang GSC, Lee CGL, *et al.* Overexpression of interleukin 13 induces minimal-change-like nephropathy in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:1476-1485.
27. Lee VWS, Wang Y, Qin X, Wang Y, Zheng G, Mahajan D, *et al.* Adriamycin nephropathy in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21:3293–3298.
28. Vielhauer V, Berning E, Eis V, Kretzler M, Segerer S, Strutz F, *et al.* CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2004; 66:2264–2278.
29. Wu H, Wang Y, Tay Y-C, Zheng G, Shang C, Alexander S, *et al.* DNA vaccination with naked DNA encoding MCP-1 and RANTES protects against renal injury in adriamycin nephropathy. *Kidney Int* 2005; 67:2178-2186.
30. Wang Y, Wang YP, Tay Y-C, Harris DCH. Progressive adriamycin nephropathy in mice: Sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int.* 2000; 58:1797-1804.
31. Rossmann P, Matousovic K, Bohdanecká M. Experimental adriamycin nephropathy: fine structure, morphometry, glomerular polyanion and cell membrane antigens. *J Pathol.* 1993; 169:99-108.
32. Muñoz M, Rincón J, Pedrañez A, Viera N, Hernández-Fonseca JP, Mosquera J. Proinflammatory role of angiotensin II in a rat nephrosis model induced by adriamycin.

- J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2001; doi: 10.1177/1470320311410092 2011.
33. Van Goor H, Van Der Horst MLC, Atmosoerodjo J, Joles JA, Van To A, Grond J. Renal Apolipoproteins in Nephrotic Rats. *Am J Pathol.* 1993; 142:1804-1812.
  34. Erwig LP, Kluth DC, Rees AJ. Macrophage heterogeneity in renal inflammation. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18:1962-965.
  35. Eardley KS, Cockwell P. Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. *Kidney Int* 2005; 68:437-455.
  36. Wang Y, Wang YP, Zheng G, Lee VWS, Ouyang L, Chang DHH, *et al.* Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney Int.* 2007; 72:290-299.
  37. Schnaper HW, Aune TM. Identification of the Lymphokine Soluble Immune Response Suppressor in Urine of Nephrotic Children. *J Clin Invest.* 1985; 76:341-349.
  38. Sasdelli M, Rovinetti C, Cagnoli L, Beltrandi E, Barboni F, Zucchelli P. Lymphocyte subpopulations in minimal-change nephropathy. *Nephron.* 1980; 25:72-76.
  39. Fiser RT, Arnold WC, Charlton RK, Steele RW, Childress SH, Shirkey B. T-lymphocyte subsets in nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 1991; 40:913-916.
  40. Lama G, Luongo I, Tirino G, Borriello A, Carangio C, Salsano ME. T-lymphocyte populations and cytokines in childhood nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis.* 2002; 39:958-965.
  41. Wang Y, Wang Y, Feng X, Bao S, Yi S, Kairaitis L, *et al.* Depletion of CD4 T cells aggravates glomerular and interstitial injury in murine adriamycin nephropathy. *Kidney Int.* 2001; 59:975-984.
  42. Wang Y, Wang YP, Tay Y-C, Harris DCH. Role of CD8 cells in the progression of murine adriamycin nephropathy. *Kidney Int.* 2001; 59:941-949.
  43. Tejani AT, Butt K, Trachtman H, Suthanthiran M, Rosenthal CJ, Khawar MR. Cyclosporine-A induced remission of relapsing nephrotic syndrome in children. *Kidney Int.* 1988; 33:729-734.
  44. Okuyama S, Komatsuda A, Wakui H, Aiba N, Fujishima N, Iwamoto K, *et al.* Up-regulation of TRAIL mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from

- patients with minimal-change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20:539-544.
45. Musial K, Ciszak L, Kosmaczewska A, Szteblich A, Frydecka I, Zwolińska D. Zeta chain expression in T and NK cells in peripheral blood of children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2010; 25:119-127.
  46. Wu H, Wang YM, Wang Y, Hu M, Zhang GY, Knight JF, *et al*. Depletion of gamma-delta T cells exacerbates murine adriamycin nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18:1180-1189.
  47. Wang YM, Hu M, Wang Y, Polhill T, Zhang GY, Wang Y, *et al*. Regulatory T Cells in Renal Disease. *Int J Clin Exp Med*. 2008; 1:294-304.
  48. Rubio-Cabezas O, Minton JA, Caswell R, Shield JP, Deiss D, Sumnik Z, *et al*. Clinical heterogeneity in patients with FOXP3 mutations presenting with permanent neonatal diabetes. *Diabetes Care*. 2009; 32:111-116.
  49. Apostolou I, Von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med*. 2004; 199:1401-1408.
  50. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, *et al*. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naïve T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003; 198:1875-1886.
  51. Le NT, Chao N. Regulating regulatory T cells. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 39:01-09.
  52. Wang YM, Zhang GY, Wang Y, Hu M, Wu H, Watson D, *et al*. Foxp3-transduced polyclonal regulatory T cells protect against chronic renal injury from Adriamycin. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17:697-706.
  53. Mahajan D, Wang Y, Qin X, Wang Y, Zheng G, Wang YM, *et al*. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells Protect against Injury in an Innate Murine Model of Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17:2731-2741.
  54. Shao XS, Yang XQ, Zhao XD, Li Q, Xie YY, Wang XG, *et al*. The prevalence of Th17 cells and FOXP3 regulate T cells (Treg) in children with primary nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2009; 24:1683-1690.
  55. Pereira RL, Reis VO, Semedo P, Buscariollo BN, Donizetti-Oliveira C, Cenedeze MA, *et al*. Invariant Natural Killer T Cell Agonist Modulates Experimental Focal and

Segmental Glomerulosclerosis. PLoS ONE. 2012; doi:10.1371/journal.pone.0032454.

56. Sellier-Leclerc AL, Duval A, Riveron S, Macher MA, Deschenes G, Loirat C, *et al.* A Humanized Mouse Model of Idiopathic Nephrotic Syndrome Suggests a Pathogenic Role for Immature Cells. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:2732-2739.
57. Garin EH, Blanchard DK, Matsushima K, Djeu JY. IL-8 production by peripheral blood mononuclear cells in nephrotic patients. *Kidney Int.* 1994; 45:1311-1317.
58. Neuhaus TJ, Wadhwa M, Callard R, Barratt TM. Increased IL-2, IL-4 and interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) in steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol.* 1995; 100:475-479.
59. Yap HK, Cheung W, Murugasu B, Sim SK, Seah CC, Jordan SC. Th1 and Th2 Cytokine mRNA Profiles in Childhood Nephrotic Syndrome: Evidence for Increased IL-13 mRNA Expression in Relapse. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10:529-537.
60. Kemper MJ, Meyer-Jark T, Lilova M, Müller-Wiefel DE. Combined T- and B-cell activation in childhood steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Clin Nephrol.* 2003; 60:242-247.
61. Valanciuté A, Le SG, Solhonne B, Pawlak A, Grimbert P, Lyonnet L *et al.* NF-Kappa-B p65 antagonizes IL-4 induction by c-maf in minimal change nephrotic syndrome. *J Immunol.* 2004; 172:688-698.
62. Kanai T, Yamagata T, Momoi MY. Macrophage inflammatory protein-1b and interleukin-8 associated with idiopathic steroid sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr Int.* 2009; 51:443-447.
63. Bricio T, Molina A, Egido J, Gonzalez E, Mampaso F. IL-1-like production in adriamycin-induced nephrotic syndrome in the rat. *Clin Exp Immunol.* 1992; 87:117-121.
64. Wang Y, Chen J, Chen L, Tay Y-C, Rangan GK, Harris DCH. Induction of Monocyte Chemoattractant Protein- 1 in Proximal Tubule Cells by Urinary Protein. *J Am Soc Nephrol.* 1997; 8:1537-1545.
65. Rangan GK, Wang Y, Tay YC, Harris DCH. Inhibition of nuclear factor-kb activation reduces cortical tubulointerstitial injury in proteinuric rats. *Kidney Int.* 1999; 56:118-34.

66. Wang LM, Chi HJ, Wang LN, Nie L, Zou YH, Zhao TN, *et al.* Expression of interleukin 6 in rat model of doxorubicin induced nephropathy. *Chin J Contemp Pediatr.* 2010; 12:912-914.
67. Kerpen HO, Bhat JG, Kantor R, Gauthier B, Rai KR, Schacht RG, *et al.* Lymphocyte subpopulations in minimal change nephrotic syndrome. *Clin Immunol Immunopathol.* 1979; 14:130-136.
68. Pescovitz MD, Book BK, Sidner RA. Resolution of recurrent focal segmental glomerulosclerosis proteinuria after rituximab treatment. *N Engl J Med.* 2006; 354:1961–1963.
69. Ahmed MS, Wong CF. Rituximab and nephrotic syndrome: a new therapeutic hope? *Nephrol Dial Transplant.* 2008; 23:11–17.
70. Takei T, Nitta K. Rituximab and minimal change nephrotic syndrome: a therapeutic option. *Clin Exp Nephrol.* 2011; 15:641-647.
71. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res.* 2011; doi:10.1007/s00441-010-1034-0
72. David S, Biancone L, Caserta C, Bussolati B, Cambi V, Camussi G. Alternative pathway complement activation induces proinflammatory activity in human proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant.* 1997; 12: 51–56.
73. Rangan G K, Pippin JW, Couser WG. C5b-9 regulates peritubular myofibroblast accumulation in experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2004; 66:1838-1848.
74. He C, Imai M, Song H, Quigg RJ, Tomlinson S. Complement Inhibitors Targeted to the Proximal Tubule Prevent Injury in Experimental Nephrotic Syndrome and Demonstrate a Key Role for C5b-9. *J Immunol.* 2005; 174:5750-5757.
75. Rangan GK, Pippin JW, Coombes JD, Couser WG. C5b-9 does not mediate chronic tubulointerstitial disease in the absence of proteinuria. *Kidney Int.* 2005; 67:492-503.
76. Eddy AA. Interstitial nephritis induced by protein overload proteinuria. *Am J Pathol* 1989; 135:719-773.
77. Bao L, Haas M, Pippin J, Wang Y, Miwa T, Chang A, *et al.* Focal and segmental glomerulosclerosis induced in mice lacking decay-accelerating factor in T cells. *J Clin*

- Invest. 2009; 119:1264-1274.
78. Turnberg D, Lewis M, Moss J, Xu Y, Botto MH, Cook T. Complement Activation Contributes to Both Glomerular and Tubulointerstitial Damage in Adriamycin Nephropathy in Mice. *J. Immunol.* 2006; 177:4094-4102.
  79. Matsuo S, Nishikage H, Yoshida F, Nomura A, Piddlesden SJ, Morgan BP. Role of CD59 in experimental glomerulonephritis in rats. *Kidney Int.* 1994; 46:191-200.
  80. Turnberg D, Botto M, Warren J, Morgan BP, Walport MJ, Cook HT. CD59a Deficiency Exacerbates Accelerated Nephrotoxic Nephritis in Mice. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14:2271-2279.
  81. Abbas AK, Lichtman AH. Cytokines. In: Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology.* 5th ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier Science; 2003. pp.243-274.
  82. Vianna HR, Bouissou CMMS, Tavares MS, Teixeira MM, Simões e Silva AC. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. *J Bras Nefrol.* 2011; 33:351-364.
  83. Pereira AB, Rezende NA, Teixeira Junior AL, Teixeira MM, Simões e Silva AC. Citocinas e quimiocinas no transplante renal. *J Bras Nefrol.* 2009; 31:286-296.
  84. Vianna HR, Soares CMBM, Silveira KD, Elmiro GS, Mendes PM, Tavares MS, et al. Cytokines in chronic kidney disease: potential link of MCP-1 and dyslipidemia in glomerular diseases. *Pediatr Nephrol.* 2012; doi:10.1007/s00467-012-2363-x.
  85. Pereira AB, Teixeira AL, Rezende NA, Pereira RM, Miranda DM, Oliveira EA, et al. Urinary chemokines and anti-inflammatory molecules in renal transplanted patients as potential biomarkers of graft function: a prospective study. *Int Urol Nephrol.* 2012; 44:1539-1548.
  86. Garin EH, Laflam P, Chandler L. Anti-interleukin 8 antibody abolishes effects of lipid nephrosis cytokine. *Pediatr Nephrol.* 1998; 12:381-385.
  87. Souto MFO, Teixeira AL, Russo RC, Penido M-GMG, Silveira KD, Teixeira MM, Simões e Silva AC. Immune Mediators in Idiopathic Nephrotic Syndrome: Evidence for a Relation Between Interleukin 8 and Proteinuria. *Pediatr Res.* 2008; 64:637-642.
  88. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci.* 1995; 108:2369-

2379.

89. Simon M, Gröne HJ, Jöhren O, Kullmer J, Plate KH, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in human renal ontogenesis and in adult kidney. *Am J Physiol.* 1995; 268:240-250.
90. Webb NJA, Watson CJ, Roberts ISD, Bottomley MJ, Jones CA, Lewis MA, *et al.* Circulating vascular endothelial growth factor is not increased during relapses of steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 1999; 55:1063-1071.
91. Laflam PF, Garin EH. Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  and vascular permeability growth factor on albuminuria in rats. *Pediatr Nephrol.* 2005; 21:177-181.
92. Strehlau J, Schachter AD, Pavlakis M, Singh A, Tejani A, Strom TB. Activated intrarenal transcription of CTL-effectors and TGF-1 in children with focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2002; 61:90-95.
93. Ruiz-Ortega M, Lorenzo Ó, Rupérez M, Blanco J, Egido J. Systemic Infusion of Angiotensin II into Normal Rats Activates Nuclear Factor-kB and AP-1 in the Kidney Role of AT1 and AT2 Receptors. *Am J Pathol.* 2001; 158:1743-1756.
94. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986; 175:05-14.
95. Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S. Purified protein derivative of mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest.* 1991; 88:346-350.
96. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1986; 383:787-793.
97. Hurtado A, Johnson RJ. Hygiene hypothesis and prevalence of glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2005; 68 (supplement):62-67.
98. Odobasic D, Kitching AR, Tipping PG, Holdsworth SR. CD80 and CD86 costimulatory molecules regulate crescentic glomerulonephritis by different mechanisms. *Kidney Int.* 2005; 68:584-594.

99. Lee VWS, Harris DCH. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology* 2011; 16:30-38.
100. Tovar AR, Murguía F, Cruz C, Hernández-Pando R, Aguilar-Salinas CA, Pedraza-Chaverri J, *et al.* A Soy Protein Diet Alters Hepatic Lipid Metabolism Gene Expression and Reduces Serum Lipids and Renal Fibrogenic Cytokines in Rats with Chronic Nephrotic Syndrome. *J Nutr.* 2002; 132:2562-2569.
101. Kim SY, Lim AY, Jeon SK, Lee IS, Choue R. Effects of Dietary Protein and Fat Contents on Renal Function and Inflammatory cytokines in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2011; doi:10.1155/2011/945123.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar parâmetros bioquímicos, biométricos, histológicos e imunológicos em ratos com síndrome nefrótica (SN) induzida pela doxorubicina.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (a) Comparar parâmetros de função renal tais como: albuminúria, proteinúria, sódio e potássio urinários e plasmáticos, creatinina urinária e plasmática nos animais com SN induzida pela administração de doxorubicina em relação ao grupo controle, formado por animais que receberam injeção de salina;
- (b) Comparar parâmetros biométricos tais como: consumo alimentar, massa (peso) corporal, massa renal, massa hepática, massa cardíaca e massa do baço nos animais com SN em relação ao grupo controle;
- (c) Comparar parâmetros bioquímicos do sangue tais como: colesterol e triglicérides séricos, nos animais com SN em relação ao grupo controle;
- (d) Comparar a histologia renal dos animais com SN em relação ao grupo controle;
- (e) Comparar o leucograma total e diferencial dos animais com SN em relação ao grupo controle;
- (f) Comparar a expressão da molécula coestimuladora CD80 em leucócitos do sangue periférico dos animais com SN em relação ao grupo controle;
- (g) Comparar a expressão da integrina CD18 em leucócitos do sangue periférico dos animais com SN em relação ao grupo controle;
- (h) Comparar o *Status Redox* (atividade oxidativa/antioxidante) do tecido renal de animais com SN em relação ao grupo controle.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 AMOSTRA**

No presente estudo, foram utilizados sessenta e quatro ratos Wistar, machos, com idade entre 6 e 8 semanas, com peso médio de 300 gramas no início do experimento, obtidos do Centro de Bioterismo – Cebio - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil. Durante a realização dos experimentos, os animais foram alojados em condições ambientais controladas, com ciclos claro/escuro de 12 h e livre acesso à água e alimentação (ração padrão para roedores - Nuvital, Nuvilab, Brasil) na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Brasil. O protocolo experimental (99/2009) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA / UFMG).

### **4.2 DELINEAMENTO**

#### **4.2.1 Protocolo experimental:**

##### **4.2.1.1 Indução da nefropatia**

Os ratos foram previamente divididos em dois grupos: grupo DOX, que recebeu dose única, na veia da cauda, de cloridrato de Doxorrubicina (7,5mg/kg, Doxolem - Farmaclinic, Belo Horizonte, Brasil) e o grupo CON que recebeu, nas mesmas condições, solução salina. Animais de cada grupo foram eutanasiados 7, 14, 21 e 28 dias após a injeção, considerando que, no modelo proposto, as lesões renais são consideradas mínimas no dia 7, moderadas no dia 14 e severas entre os dias 21 e 28 após injeção da Doxorrubicina (Rangan *et al*,1999; Park *et al*, 2003). O desenho geral do protocolo experimental está ilustrado nas figuras 1 e 2. Os procedimentos específicos serão discutidos de maneira mais detalhada, a seguir.

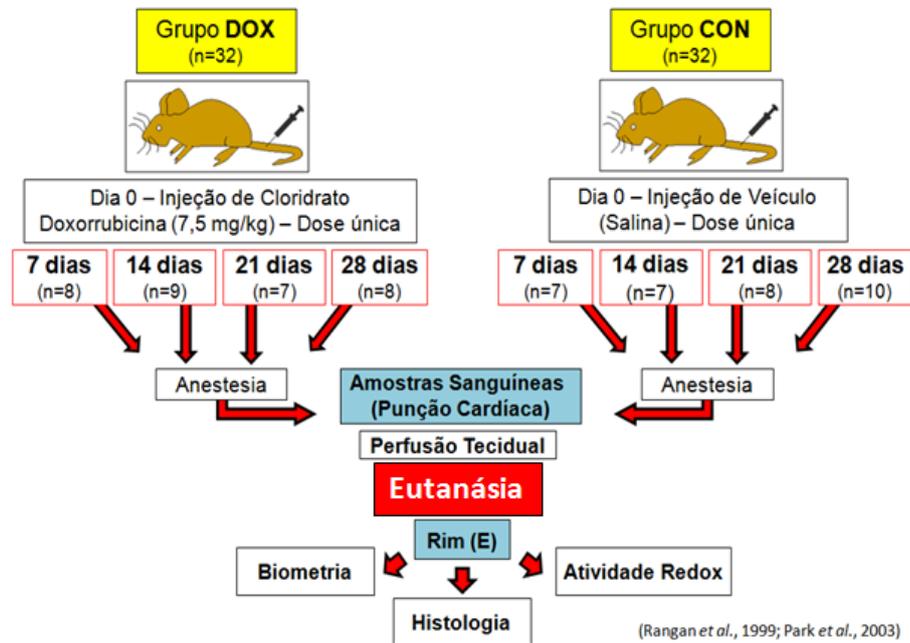


FIGURA 1 - Desenho esquemático do protocolo experimental. Animais do grupo DOX desenvolveram a SN e animais do grupo CON serviram de controle para os parâmetros avaliados.

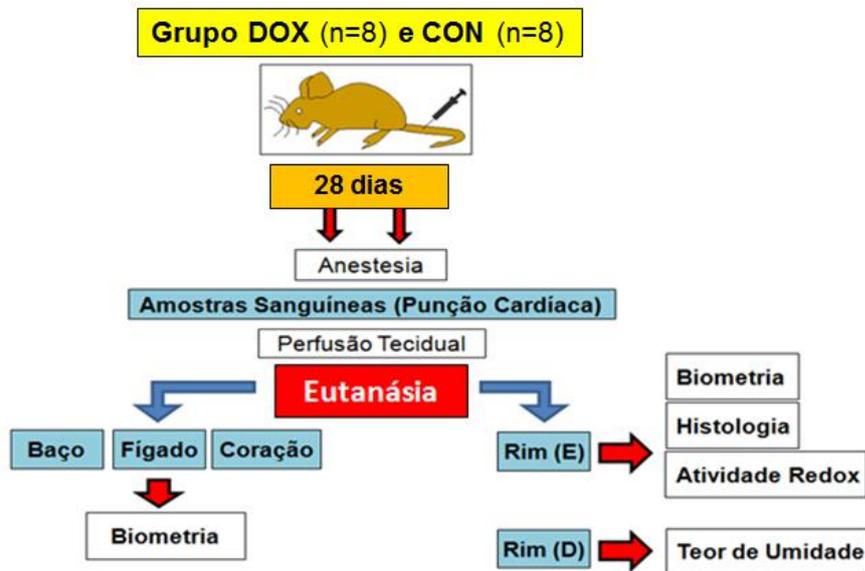


FIGURA 2 – Desenho esquemático do protocolo experimental utilizado nos animais do grupo de 28 após a injeção.

#### 4.2.1.2 Avaliação da função renal e eutanásia

Para avaliar a função renal, amostras urinárias de 24 horas foram coletadas em gaiolas metabólicas nos dias 0 (pré-injeção), 7, 14, 21 e 28 (pós-injeção) e amostras sanguíneas foram obtidas por punção cardíaca conforme será descrito. Antes da primeira coleta de urina (dia 0) os animais foram mantidos na gaiola metabólica por um período de cinco dias, para o devido condicionamento. Ao final do protocolo experimental animais de cada grupo foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (60mg/Kg) e xylazina (8 mg/kg) conforme indicado pelo CETEA/UFMG (<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea>) e em seguida coletou-se amostra sanguínea. Após a anestesia os rins foram expostos por laparotomia/toracotomia e uma cânula foi inserida na aorta, via ventrículo esquerdo, para perfusão de solução salina, (phosphate-buffered saline - 0,15 mol/L cloreto de sódio; 0,01 mol/L fosfato de sódio tampão - pH 7,4 a 37° C) por gravitação, até obter-se a exsanguinação dos órgãos, indicada pelo clareamento dos mesmos.

#### 4.2.1.3 Remoção e preparo dos órgãos

Após o clareamento, os rins foram removidos e imediatamente pesados. Em seguida cada rim foi dividido em três porções, por meio de cortes coronais (FIG. 3) e cada porção foi processada de acordo com as análises a serem realizadas, ou seja, colorações de rotina, imuno-histoquímica e avaliação do *status redox*. A porção dos rins separada para análises histológicas e morfométricas foi fixada em paraformaldeído 4% (ph 7,2) por 2 horas, em seguida transferida para a solução de Bouin por 4 horas e depois para uma solução de etanol 70%, trocada diariamente até o clareamento do órgão. Após a etapa de fixação, a amostra foi desidratada em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%) e duas trocas de xilol e em seguida embebida em parafina para realização dos cortes histológicos com 4 µm de espessura que foram montados em lâminas de vidro. Antes da coloração, os cortes foram desparafinizados em duas trocas de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e lavados em água corrente. Em seguida, foram corados pela Hematoxilina, por 10 minutos e lavados em água corrente, para retirada do excesso do corante. Os cortes foram rapidamente diferenciados em álcool acidulado (100 mL de álcool absoluto e 10 gotas de ácido clorídrico) e novamente lavados em água corrente para evitar acidificação excessiva. Posteriormente, foram corados pela Eosina, por 30 segundos e novamente lavados em água corrente. Após a última lavagem foram desidratados em 2 banhos

de álcool absoluto e levados à estufa a 56°C para secagem e montados com lamínula e Entellan. Para as demais colorações, ácido periódico de Shiff (PAS), tricrômico de masson (TM) e prata amoniacal de Gomori, também foram realizadas as etapas de desparafinização e hidratação dos cortes, seguidas pelos protocolos específicos de cada coloração.

A quantidade e distribuição de colágeno tipo I e tipo III no tecido renal foram avaliadas por meio de marcação para imunofluorescência e microscopia confocal, conforme descrito por Robertson *et al.*, (2008) e Pinheiro *et al.*, (2009). Resumidamente, a porção do rim separada para imuno-histoquímica foi imersa em recipiente de plástico contendo solução de Metanol (80%) e DMSO (20%), armazenada em Freezer -80°C durante uma semana e em seguida transferida para o freezer-20°C, onde permaneceu por mais 24 horas. Após este período de fixação cada amostra foi lavada três vezes em etanol 99,9% à temperatura ambiente, duas vezes em xilol e então embebida em parafina para a confecção de cortes de 5 a 8 micrometros, montados em lâminas de vidro.

A terceira porção do rim foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada no freezer -80°C para posterior análise do *status redox*. Após o descongelamento os fragmentos renais foram pesados, macerados e homogeneizados. A peroxidação lipídica foi avaliada pelos níveis teciduais de MDA e a capacidade antioxidante renal foi avaliada através da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), conforme será descrito adiante.

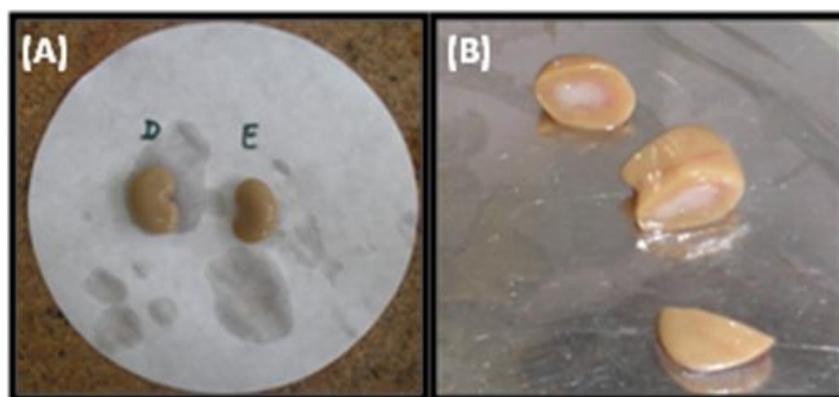


FIGURA 3 - Rins de rato com síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina: (A) Rins esquerdo e direito, logo após a nefrectomia. (B) Rim fatiado em três partes para diferentes análises (Arquivo pessoal).

#### 4.2.1.4 Análises biométricas

Nos dias 7, 14, 21 e 28 após a injeção, animais de cada grupo foram avaliados quanto aos parâmetros: massa corporal, massa renal, consumo alimentar, consumo de água e volume urinário. Para a avaliação do consumo alimentar, consumo de água e volume urinário os animais foram colocados em gaiolas metabólicas por um período de 24 horas. Após o sacrifício, o rim esquerdo de cada animal foi removido e imediatamente pesado. Para avaliação da massa renal e corporal, foram empregadas balanças eletrônicas semi-analíticas.

Nos animais do grupo de 28 dias também foram removidos o coração, baço e fígado, para avaliação da massa desses órgãos. Nesses mesmos animais o rim direito foi utilizado para calcular a massa seca e o percentual de umidade, conforme descrito a seguir: após a remoção, o rim foi imediatamente pesado (massa fresca) e em seguida colocado em estufa à 60°C por 24hs, para desidratação. Após ser retirado da estufa, o rim foi novamente pesado (massa seca). O conteúdo de líquido de cada rim foi calculado segundo a fórmula:  $[(\text{massa fresca} - \text{massa seca}) / \text{massa fresca}] \times 100$  (Yamanari *et al.*, 2007).

#### 4.2.1.5 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas em amostras urinárias de 24 horas com o uso de kits para dosagens de: creatinina (K067 – método cinético de tempo fixo), albumina (K078 – método turbidimétrico) e proteína total (K108 – método colorimétrico - vermelho de pirogalol). Análises bioquímicas também foram realizadas em amostras de plasma (ou soro) utilizando kits colorimétricos para dosagens de: triglicerídeos (K117 – método enzimático de ponto final), colesterol total (K083 – método enzimático de ponto final) e glicose (kit K082 – método enzimático colorimétrico). Todos os kits são comercialmente disponíveis (Bioclin-Quibasa, Belo Horizonte, Brasil).

As amostras foram analisadas utilizando-se o analisador automático Cobas Mira Plus (Roche, AG, Switzerland) e o espectrofotômetro Halo DB-20 Spectrophotometer (Dynamica GmbH, Salzburg-Mayrwies, Áustria). Dosagens de sódio e potássio na urina foram realizadas por fotometria de chama (Fotômetro de chamas DM-62, Digimed – Digicrom analítica Ltda, São Paulo).

#### 4.2.1.6 Análises histológicas e morfométricas

Para as colorações de rotina, as imagens histológicas foram capturadas utilizando-se microscopia convencional em campo claro com objetivas de (5x, 20x e 40x) e ocular de (10x) e digitalizadas através da microcâmara Leica DFC340FX acoplada ao microscópio Leica DM5000B. Para a análise das imagens utilizou-se o *softwares* de análise e processamento de imagem, Image J 1.43 para Windows Vista/7, disponível gratuitamente na Internet (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e Leica QwinV3 (disponível no setor de Fotodocumentação e Morfometria do Laboratório de Multiusuários do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto. Foram avaliados em média 20, 35 e 60 glomérulos por lâmina, capturados em objetiva de 40x, para as colorações com HE, prata amoniacal de Gomori e PAS, respectivamente. Nas colorações pelo tricrômico de Masson foram avaliados 10 campos aleatórios, capturados em objetiva de 20x (Wang *et al.*, 2001; Vielhauer *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007).

Para o cálculo da área glomerular e do tufo capilar glomerular utilizou-se o software Image J, após a calibração do programa e definição da escala de medida ( $\mu\text{m}$ ). A área glomerular bem como do tufo capilar glomerular, descritas em  $\mu\text{m}^2$ , foram delimitadas manualmente nos cortes corados com PAS e digitalizados em objetiva de 40x. A delimitação destas áreas foi realizada com o auxílio de um mouse, orientando-se pelos limites da capsula de Bowman (A) e do tufo capilar (B) como demonstrado na figura 2.

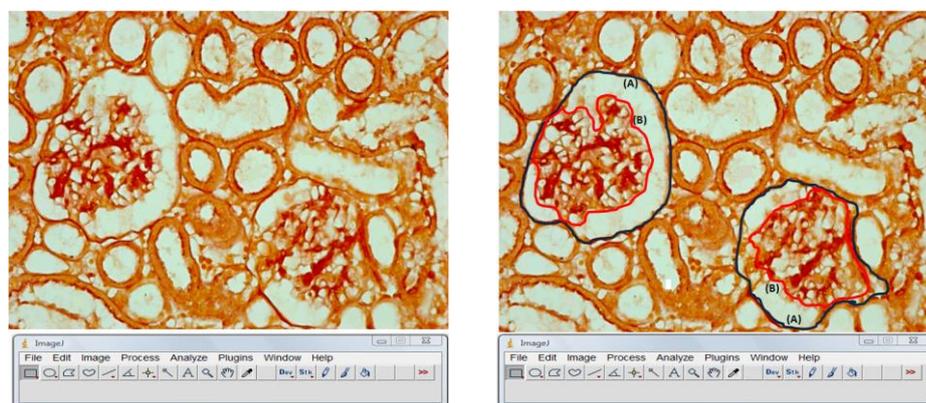


FIGURA 4 - Fotos Ilustrativas da delimitação da área glomerular e do tufo capilar glomerular pelo programa Image J, em animais com SN induzida pela Doxorubicina. Microscopia de luz; coloração PAS; aumento 400x - (Arquivo pessoal).

A contagem dos glomérulos também foi realizada com o emprego do software Image J. Lâminas coradas em HE foram capturadas em aumento de 5x, considerando-se todo o campo histológico da lâmina. Com o auxílio do mouse foram demarcados na imagem os pontos correspondentes aos glomérulos, que posteriormente foram calculados pelo próprio programa (FIG. 5).

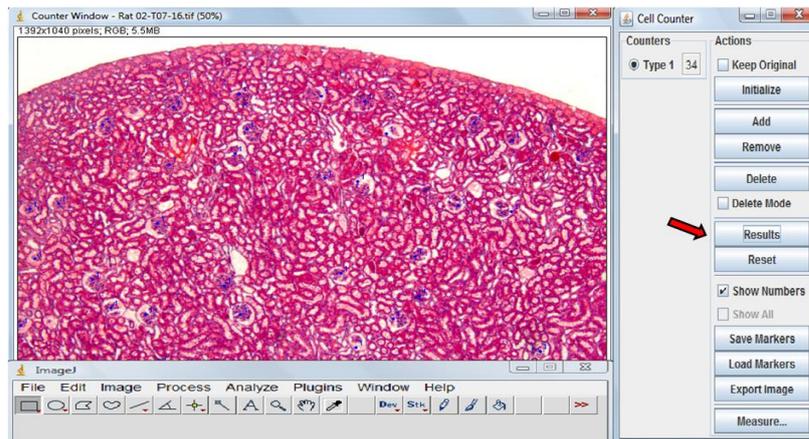


FIGURA 5 - Foto ilustrativa da estratégia de quantificação glomerular pelo programa Image J, em animais com SN induzida pela Doxorubicina. Microscopia de luz; coloração hematoxilina & eosina; aumento 50x - (Arquivo pessoal).

A análise da celularidade glomerular e tubulointersticial, descritas como número de células por área definida (FIG. 6), bem como da deposição tecidual de colágeno, descrita como percentual da área avaliada (FIG. 7), foram realizadas com o auxílio do software de análise e processamento de imagem Leica QwinV3. A análise das imagens foi realizada segundo protocolo de operação do *software*, resumidamente, a evidenciação das estruturas de interesse foi baseada nos parâmetros RGB, para as cores vermelha, verde e azul (Red, Green, Blue) respectivamente, com a graduação variando de 0 a 255 em cada parâmetro. Inicialmente procedeu-se a binarização da imagem e em seguida, com o auxílio do mouse, foi realizada a seleção do pixel desejado, representativo da cor (estrutura) a ser quantificada. Após a seleção do pixel desejado, a imagem binária foi formada automaticamente e evidenciada com uma cor diferente das demais estruturas, em seguida selecionou-se as avaliações desejadas e procedeu-se a mensuração.

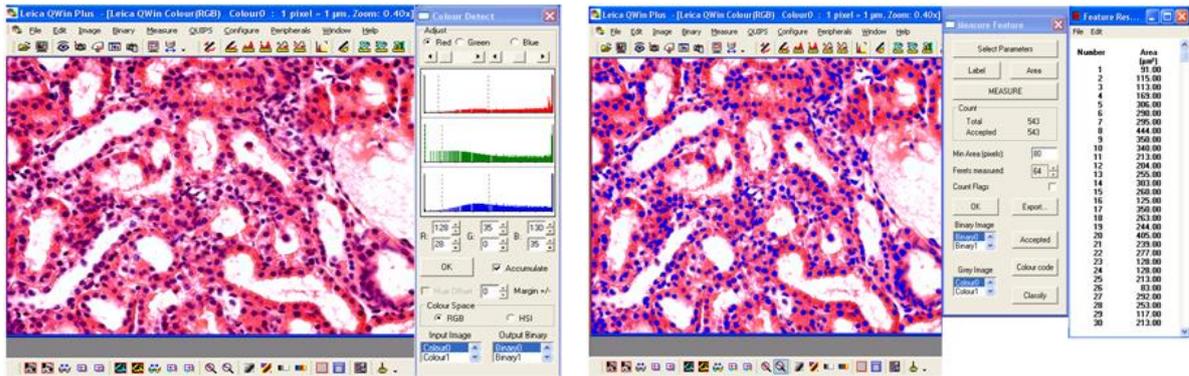


FIGURA 6 - Foto ilustrativa da estratégia de análise da celularidade tubulointersticial e glomerular pelo *Software* Leica QwinV3, em animais com SN induzida pela Doxorubicina. Microscopia de luz; coloração hematoxilina & eosina; aumento 400x - (Arquivo pessoal).

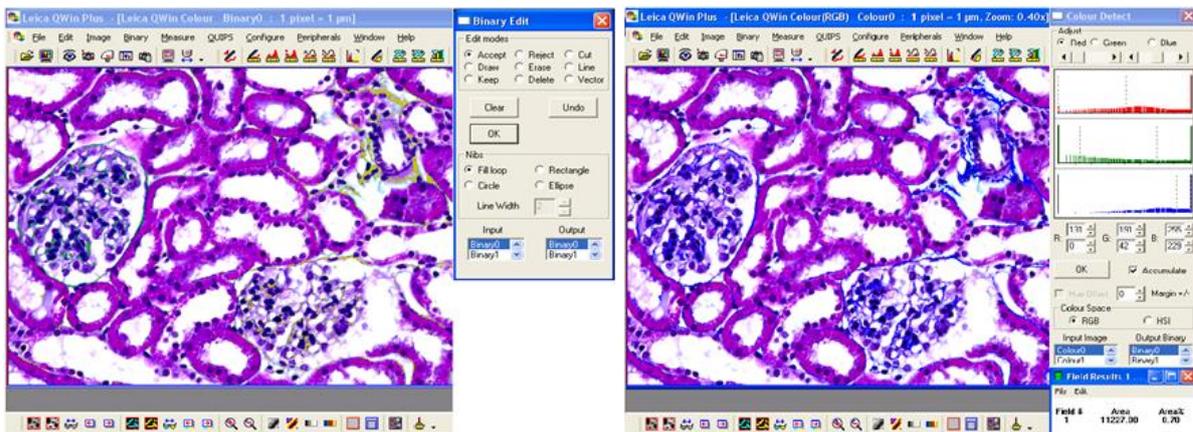


FIGURA 7 - Foto ilustrativa da estratégia de análise da deposição tecidual de colágeno pelo *Software* Leica QwinV3, em animais com SN induzida pela Doxorubicina. Microscopia de luz; coloração tricrômico de masson; aumento 400x - (Arquivo pessoal).

#### 4.2.1.7 Análises imuno-histoquímicas

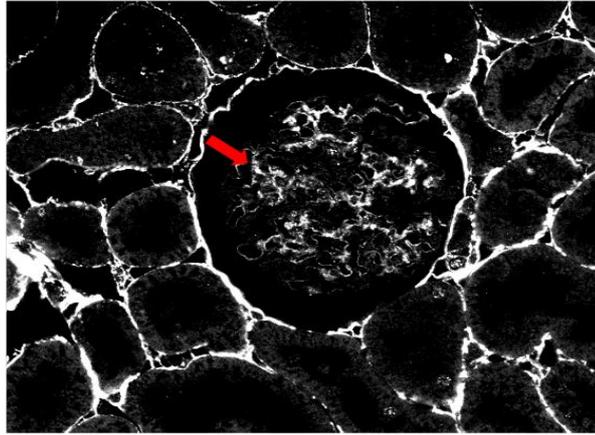
Para a marcação imuno-histoquímica os cortes foram previamente desparafinizados com xilol e reidratados em concentrações decrescentes de etanol até salina tamponada em fosfato. Em seguida foram incubados em solução bloqueadora (1% de albumina sérica bovina e 0,1% Tween 20) à temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente as lâminas foram incubadas, *overnight* a 4°C, com um dos seguintes anticorpos primários: rabbit anti-human collagen I (1:200, cat. no. 600-401-103-0.5) ou rabbit

anti-human collagen III (1:200, cat. no. 600-401-105-0.1) (Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA, USA), previamente diluídos em solução bloqueadora (1:10). Após cinco lavagens em solução tampão fosfato o anticorpo Donkey anti-rabbit IgG-conjugado com Cy3 (cat. no. 711-165-152, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) foi adicionado, em ambiente escuro à temperatura ambiente, e permaneceu durante 1 hora. Em seguida foram realizadas lavagens com solução tampão fosfato e montagem em 90% glicerol/ 10% Tris 1M.

As imagens foram capturadas com o microscópio confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss Inc., Göttingen Germany) com objetiva de 40x e aumento final de 400x. Os parâmetros do microscópio confocal foram definidos no início da sessão de imagens e não mais alterados. Para as análises quantitativas as imagens foram capturadas em 8 bits e analisadas em escala de cinza (FIG. 6). Quatro imagens foram capturadas para cada região renal e três medidas foram obtidas para cada imagem. A quantificação da intensidade de fluorescência e da área foi realizada com auxílio do software Scion Image Beta 4.02 software (Scion Corporation, NIH-USA). A fluorescência de fundo foi subtraída da região de interesse. A intensidade de fluorescência baseou-se no nível de graduação de cinza e variou de 0 (preto) a 255 (branco) com um valor médio para cada área correspondendo à soma do valor de cinza de todos os pixels, dividido pelo número de pixels por área (Pinheiro *et al.*, 2009). As marcações imunohistoquímicas, bem como a fotodocumentação e análises das imagens estão sendo realizadas no Laboratório Multiusuários do Centro de Nefrologia Pediátrica do Departamento de Pediatria, na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

#### **4.2.1.8 Contagem global e diferencial de leucócitos do sangue periférico**

Para obtenção dos valores de leucócitos totais (leucograma global) foi utilizado o contador automático de células CELM CC-550® (CELM, Barueri, SP, Brasil). O balanço das diferentes populações leucocitárias (leucograma diferencial) foi realizado pela análise do esfregaço sanguíneo, após coloração com Giemsa e May-Grunwald, utilizando-se microscópio óptico (Olympus – BX41 TF - Japan).



**FIGURA 8** - Foto ilustrativa da estratégia de análise por imunofluorescência para colágeno tipo I em glomérulo renal de animais com SN induzida pela Doxorrubicina. Microscopia confocal; aumento 400x - (Arquivo pessoal).

#### **4.2.1.9 Análise de marcadores de superfície em leucócitos circulantes, por citometria de fluxo**

A análise de marcadores de superfície dos leucócitos circulantes foi realizada de acordo com o método de imunofluorescência recomendado pela Becton Dickinson (BD, San Diego, CA - USA), modificado como a seguir: 50 uL de amostra de sangue heparinizado foram incubados, no escuro, por 30 minutos e à temperatura ambiente, com 5 uL de anticorpo monoclonal (mAbs) específico para marcadores de superfície celular e conjugado ao fluorocromo ficoeritrina-PE, isotiocianato de fluoresceína-FITC ou biotina (TAB. 1). Após o período de incubação os eritrócitos foram lisados usando-se 100 uL de solução de lise (Optilyse-B, Immunotec-USA) por 5 minutos, seguido da adição de 900uL de água destilada e reincubação por 10 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de tampão PBS (phosphate-buffered saline - 0,15 mol/L cloreto de sódio; 0,01 mol/L fosfato de sódio tampão - pH 7,4) contendo 0,01% de azida sódica.

Os anticorpos biotinizados foram revelados utilizando-se streptavidina-FITC (BD – Pharmingen TM), conforme descrito por Wu e colaboradores (2007). Para a aquisição dos dados utilizou-se o instrumento FACScan (Becton-Dickinson, USA) com auxílio do programa Cell-Quest. A identificação das populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual de populações e subpopulações celulares foram realizadas utilizando-se também o programa Cell-Quest. A fenotipagem teve como objetivo a análise de linfócitos T totais (células CD3+); linfócitos T auxiliares (células CD3+CD4+); linfócitos T citotóxicos

(células CD3+CD8+), linfócitos T auxiliar e T citotóxico ativados (células CD4+CD18+ e CD8+CD18+, respectivamente), monócitos ativados (células SSC<sup>int</sup>CD4<sup>low+</sup>CD18+ e SSC<sup>int</sup>CD4<sup>low+</sup>CD80+) bem como células com características sugestivas de linfócitos NK ativados (células SSC<sup>int</sup>CD8<sup>low+</sup>CD18+).

TABELA 1

Relação dos anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos utilizados na análise específica de moléculas de superfície em subpopulações leucocitárias

Anticorpos monoclonais	Clone e marca	Especificidade
Anti-CD3 de rato conjugado com FITC	clone G4.18 - BD	Linfócitos T
Anti-CD4 de rato conjugado com PE	clone OX-35 - BD	Subpopulações de Linfócitos T auxiliares e monócitos (CD4 <sup>low</sup> )
Anti-CD8 de rato conjugado com PE	Clone OX-8 - BD	Subpopulações de Linfócitos T citotóxico e Linfócitos com fenótipo sugestivos de células NK (CD8 <sup>low</sup> )
Anti-CD80 de rato conjugado com biotina	Caltag	Molécula coativadora
Anti-CD18 de rato conjugado com biotina	Caltag	Integrina envolvida com migração celular

A análise do balanço das principais populações leucocitárias foi realizada utilizando-se gráficos de distribuição pontual de tamanho versus granulidade (FSC x SSC) (FIG. 7-a), onde foi destacada uma região correspondente à população de interesse (neutrófilos, linfócitos ou monócitos). Dentro de cada população de interesse foi quantificado o percentual de células fluorescentes, utilizando-se gráficos de fluorescência-1 versus fluorescência-2 (FL1xFL2) (FIG. 7-b).

A estratégia de análise utilizada para avaliar a expressão dos marcadores CD18 e CD80 na superfície das populações celulares de interesse está representada na figura 8. A avaliação baseou-se na determinação da intensidade média de fluorescência (MIF), que representa a intensidade de luz emitida pela excitação do fluorocromo associado aos anticorpos monoclonais ligados às moléculas de interesse na superfície celular. Inicialmente, as populações celulares foram selecionadas em gráficos de distribuição pontual em função da granulidade celular e fluorescência 2 (SSC x FL2) (FIG. 8-a), em seguida foram utilizados histogramas de fluorescência 2 (FL2) que determinou a expressão de CD18 e CD80, na superfície destas células, conforme mostrado na figura 8-b. Todos os procedimentos

envolvendo a citometria de fluxo foram realizados no laboratório de imunologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (Labimuno-UFVJM).

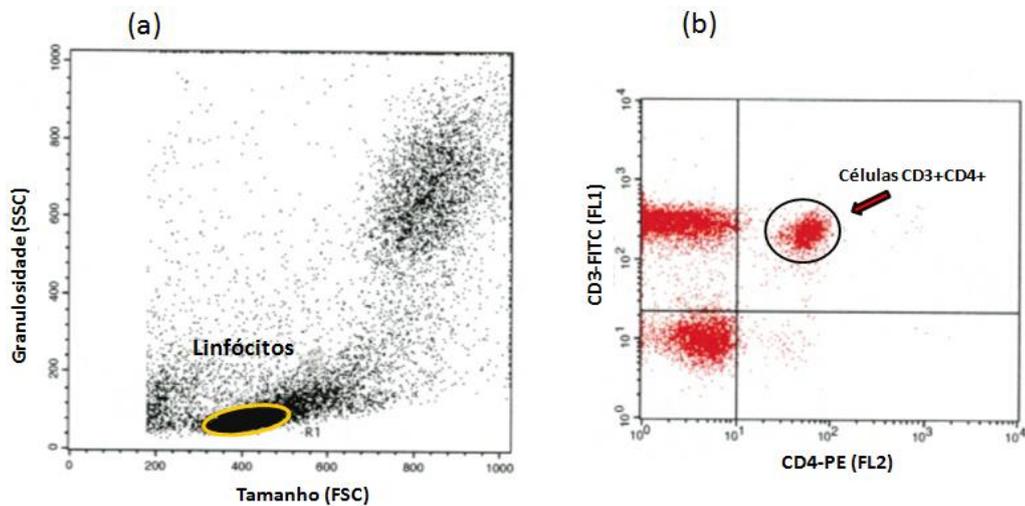


FIGURA 9 - Estratégia de análise, por citometria de fluxo, das subpopulações leucocitárias do sangue periférico de ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina: (a) gráfico de distribuição pontual de tamanho versus granulidade (FSC x SSC); (b) gráfico de fluorescência 1 versus fluorescência 2 (FL1 x FL2) - (Arquivo pessoal).

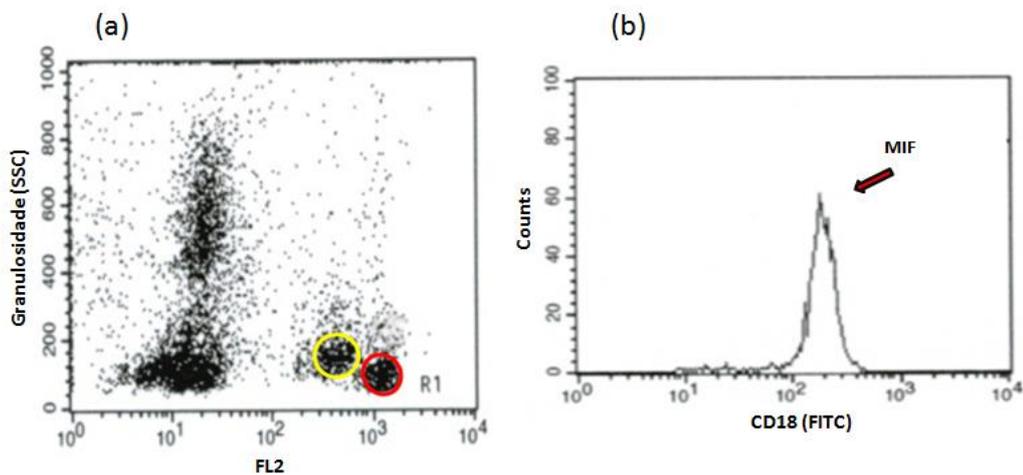


FIGURA 10 - Estratégia de análise, por citometria de fluxo, da expressão dos marcadores CD18 e CD80 na superfície de leucócitos do sangue periférico de ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina: (a) gráfico de distribuição pontual de granulidade versus fluorescência 2 (SSC x FL2); (b) determinação da expressão de CD18 por histogramas de fluorescência 2 (FL2) - (Arquivo pessoal).

#### 4.2.1.10 Status Redox

Logo após o sacrifício, os rins de cada animal foram removidos e uma parte congelada em nitrogênio líquido e armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após o descongelamento os fragmentos renais foram pesados, macerados e homogeneizados com solução PBS (phosphate-buffered saline - 0,15 mol/L cloreto de sódio; 0,01 mol/L fosfato de sódio tampão - pH 7,4). Os níveis de TBARs, substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, que inclui o malondialdeído (MDA) foram determinados por reação com o ácido tiobarbitúrico em condições ácidas, a  $90^{\circ}\text{C}$ , por 90 minutos. As amostras foram analisadas em leitor de microplacas a 532 nm, em triplicata, e uma curva padrão com concentrações conhecidas de MDA (1,1,3,3-tetramethoxypropane) foi utilizada para determinar o conteúdo de MDA nas amostras, em nmol de MDA•mg proteína<sup>-1</sup>. A atividade da enzima catalase foi determinada pelo decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio, em espectrofotômetro, a 240nm. Os ensaios foram realizados em duplicata e a atividade da catalase expressa em mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decompostos por minuto, por miligrama de proteína ( $\Delta\text{E}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$ ). A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi calculada como unidades por miligrama de proteína, sendo que uma unidade de enzima foi considerada aquela que causou a inibição da auto-oxidação do pirogalol em 50%. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 8.2, contendo ácido Dietileno triamina pentacético (1mM) e a reação foi iniciada pela adição de pirogalol (0,5 mM) a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 4 minutos. A absorbância foi determinada, em duplicada, em leitor de microplacas a 420 nm. A concentração de proteína de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina de soro bovino como padrão (Barreto *et al.*, 2011).

### 4.3 METODOLOGIA DA REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura foi iniciada antes do início dos experimentos, ainda na fase de escrita do projeto para seleção neste programa de pós-graduação, através do DINTER (UFVJM/UFMG). A revisão continuou durante todo o desenvolvimento desse trabalho. A consulta à literatura foi realizada pelo “MEDLINE”, via US National Library of Medicine, pelo endereço eletrônico <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Também foram utilizados artigos disponibilizados no portal Periódicos CAPES -

<<http://www.periodicos.capes.gov.br.ez36.periodicos.capes.gov.br/index.php> e, ainda, as referências bibliográficas encontradas nos artigos. As palavras-chave utilizadas para a pesquisa foram: síndrome nefrótica idiopática, doxorubicina, imunologia, modelo animal, rato, leucocitos, CD18, CD80, estresse oxidativo, integrinas beta-2, fibrose renal, glomeruloesclerose focal segmental, com os respectivos descritores também em inglês.

#### **4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises estatísticas foram realizadas com o pacote SPSS (Statistical Package for Social Sciences, IBM Inc., USA) versão 17.0. A normalidade e homogeneidade dos dados foram verificadas pelos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Análises intragrupo foram feitas por Análise de Variância e teste post-hoc de Tukey, ou pelo teste Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann-Whitney. Análise bivariada com teste t de Student ou teste de Mann-Whitney, de acordo com a normalidade da variável, foi utilizada para verificação de diferença entre os grupos. A associação entre variáveis foi verificada pelo teste de correlação de Pearson. Os resultados foram apresentados como média e erro padrão, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). Quando os resultados do grupo controle não apresentaram diferença estatística intra-grupo os dados deste grupo foram analisados em conjunto.

#### **4.5 ASPECTOS ÉTICOS**

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA / UFMG) - protocolo 99/2009.

## 4.6 REFERÊNCIAS

Barreto TO, Cleto LS, Gioda CR, Silva RS, Sousa-Franco J, Magalhães JP, Penaforte CL, Pinto KMC, Cruz JS and Rocha-Vieira E. Swim training does not protect mice from skeletal muscle oxidative damage following a maximum exercise test. *Eur J Appl Physiol* 2011; 111:1439-6327.

Park E, Kim S, Lee M, Lee HS, Lee I, Sung JK and Yoon Y 2003. Protective effects of N-acetylcysteine and selenium against Doxorubicin toxicity in rats. *J Vet Sci*; 4:129-136.

Pinheiro SVB, Ferreira AJ, Kitten GT, Silveira KD, Silva DA, Santos SHS, Gava E, Castro CH, Magalhães JA, Mota RK, Botelho-Santos GA, Bader M, Alenina N, Santos RAS and Simões e Silva AC, 2009. Genetic deletion of the angiotensina-(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. *Kidney Int*; 75:1184-1193.

Rangan GK, Wang Y, Tay YC and Harris DCH 1999. Inhibition of nuclear factor-kb activation reduces cortical tubulointerstitial injury in proteinuric rats. *Kidney Int*; 56:118-34.

Robertson D, Savage K, Reis-Filho JS and Isacke CM 2008. Multiple immunofluorescence labeling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. *BMC Cell Biol*; doi: 10.1186/1471-2121-9-13. Published online: 19 Mar 2008.

Wang Y, Wang Y, Feng X, Bao S, Yi S, Kairaitis L, Tay Y-C, Rangan GK and Harris DCH 2001. Depletion of CD4 T cells aggravates glomerular and interstitial injury in murine Adriamycin nephropathy. *kidney int*; 59:975-984.

Wu H, Wang YM, Wang Y, Hu M, Zhang GY, Knight JF, Harris DCH and Alexander SI 2007. Depletion of gama-delta T cells exacerbates murine Adriamycin nephropathy. *J Am Soc Nephrol*; 18:1180-1189.

Yamanari MGI, Kunitake TA, Almeida JIJ, Jukemura J, Cunha JEM and Machado MCC 2007. Efeito da hipertermia na pancreatite aguda grave experimental. *Rev Col Bras Cir*; 34: 35-40.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ARTIGO ORIGINAL

#### **Alterações morfológicas, histológicas e bioquímicas em ratos com nefropatia induzida pela doxorubicina**

Wagner de Fátima Pereira <sup>1</sup>, Gustavo Eustáquio Alvim Brito-Melo <sup>1</sup>, Cayo Antonio Almeida <sup>1</sup>, Fabrine Aguiar Jardim <sup>1</sup>, Lázaro Lopes Moreira <sup>1</sup>, Gyzelly Gomes da Cruz <sup>1</sup>, Sérgio Veloso Brant Pinheiro <sup>3</sup>, Patrícia da Silva Santos Guimarães <sup>1</sup>, Cláudia Martins Carneiro <sup>2</sup>, Ana Cristina Simões e Silva <sup>3,a</sup>.

- 1 Laboratório de Imunologia, Centro Integrado de Pesquisa em Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina, Minas Gerais, Brasil.
- 2 Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (LIMP / NUPEB), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.
- 3 Laboratório Interdisciplinar de Investigações Médica, Unidade de Nefrologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>a</sup> Endereço corrente – Laboratório Interdisciplinar de Investigações Médicas – Faculdade de Medicina – Avenida Alfredo Balena 190 - 2º andar sala 281 - Bairro Santa Efigênia - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil CEP: 30130-100.

Autor correspondente: Ana Cristina Simões e Silva. E-mail: [acssilva@hotmail.com](mailto:acssilva@hotmail.com)

## Resumo

Modelos experimentais têm contribuído para a compreensão da fisiopatologia da Síndrome Nefrótica (SN). Nesse sentido, a injeção de doxorrubicina em roedores induz proteinúria e lesões renais que se assemelham à SN em humanos. O objetivo deste estudo foi descrever as alterações morfológicas, bioquímicas e histológicas em diferentes fases de evolução da doença, em ratos com SN induzida pela doxorrubicina, contribuindo, assim, para a caracterização do referido modelo experimental. Ratos Wistar, machos, com peso entre 250-500 g, foram divididos em dois grupos: animais que receberam injeção endovenosa de doxorrubicina (7,5mg/kg) (DOX=25) e animais injetados com salina (CON=20). Amostras urinárias de 24 horas foram coletadas nos dias 7, 14, 21 e 28 após injeções. Nesses mesmos tempos, animais de cada grupo foram sacrificados e amostras de sangue coletadas para análises. Após perfusão com solução salina tamponada em fosfato (PBS) os órgãos foram removidos, pesados e os rins preparados para análises histológicas. Animais do grupo DOX desenvolveram proteinúria, dislipidemias, alterações biométricas, além de alterações histológicas compatíveis com a presença de infiltrado inflamatório túbulo intersticial crônico e processo fibrogênico renal. Nesse modelo animal algumas alterações bioquímicas surgem precocemente e servem como biomarcadores inespecíficos para a SN, enquanto as lesões histológicas tornam-se bastante intensas a partir do 21º dia após a injeção da doxorrubicina. A caracterização detalhada desse modelo animal de lesão renal, através de estudos morfológicos, bioquímicos e histológicos, pode contribuir para a melhor compreensão da história natural da SN.

**Descritores:** Síndrome nefrótica, Modelo animal, Doxorrubicina, Fibrose renal, Alterações bioquímicas, Alterações biométricas.

**Abstract**

Experimental models have contributed to our understanding of the pathophysiology of nephrotic syndrome (NS). In this regard, in rodents the injection of doxorubicin induced proteinuria and renal lesions which mimic human NS. The aim of this study was to describe the morphometric, biochemical and histological changes at different stages of disease progression in rats with doxorubicin-induced nephropathy as a contribution to the characterization of this experimental model. Male Wistar rats (250-300g) were divided into two groups: animals injected with intravenous Doxorubicin (7.5 mg/kg) (DOX, n=25) and animals injected with saline (control, CON n=20). Twenty-four hour urine samples were collected at days 7, 14, 21 and 28 after injections. At the same time points, animals were sacrificed and blood samples collected for analysis. After perfusion with phosphate buffered saline (PBS), the organs were removed, weighed and kidneys prepared for histology. Animals of DOX group developed proteinuria, dyslipidemia, biometric and histological changes, consistent with chronic tubulointerstitial inflammatory infiltrate and renal fibrogenic process. In this animal model, some biochemical changes appear early and serve as nonspecific biomarkers for NS, while histological lesions become quite intense from day 21 after the doxorubicin injection. The detailed characterization of this animal model through morphometric, biochemical and histological studies may contribute to better understanding the natural history of NS.

**Keywords:** Nephrotic syndrome, Animal model, Doxorubicin, Renal fibrosis, Biochemical changes, Biometric changes

## **Introdução**

A Síndrome Nefrótica (SN) é uma glomerulopatia bastante comum em crianças e pode ser provocada por lesão renal primária ou estar associada à doença sistêmica. Entre as características da SN, destacam-se a proteinúria maciça, hipoalbuminemia, edema generalizado e hiperlipidemia (Schachter, 2004). Denominam-se Síndrome Nefrótica Idiopática (SNI) as alterações provocadas por lesão renal primária. Quanto à histopatologia, observam-se mais frequentemente na SNI as lesões glomerulares mínimas (SNLM), caracterizadas por fusão dos processos podais dos podócitos, seguida pela glomeruloesclerose focal e segmentar (GEFS) (Schachter, 2004; Souto *et al.*, 2008). Além disso, devido à importância clínica da resposta dos pacientes ao tratamento com esteroides, a SNI também pode ser classificada em síndrome nefrótica córtico-sensível (SNCS), síndrome nefrótica córtico-resistente (SNCR) e síndrome nefrótica córtico-dependente (SNCD) (Schachter, 2004). A SNI é a glomerulopatia mais comum em crianças, apesar da sua fisiopatologia permanecer ainda desconhecida (Souto *et al.*, 2008). Modelos experimentais têm contribuído para a compreensão da fisiopatologia da SN (Eddy *et al.*, 2012). Entre eles, ressalta-se o modelo de indução da SN pelo quimioterápico doxorrubicina, uma vez que, em roedores, essa droga induz a lesões renais semelhantes às observadas em pacientes com SN (Lee e Harris, 2011; Wang *et al.*, 2000). O objetivo deste estudo foi descrever as alterações biométricas, bioquímicas e histológicas em diferentes fases de evolução da doença renal, em ratos com SN induzida pela doxorrubicina, contribuindo assim, para a caracterização do referido modelo.

## **Metodologia**

### **Animais**

Neste estudo, foram utilizados quarenta e cinco ratos Wistar, machos, com idade entre 6 e 8 semanas, com peso médio de 300 gramas no início do experimento, obtidos do Centro de Bioterismo – Cebio - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil. Os animais foram alojados em condições ambientais controladas, com ciclos claro/escuro de 12 h e livre acesso à água e alimentação (ração padrão para roedores - Nuvital, Nuvilab, Brasil). Protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA / UFMG).

## Desenho Experimental

Os animais foram previamente divididos em dois grupos: grupo DOX (n=25), que recebeu dose única, na veia da cauda, de cloridrato de doxorubicina (7,5mg/kg, Doxolem - Farmaclinic, Belo Horizonte, Brasil) e grupo CON (n=25) que recebeu, nas mesmas condições, solução salina (Rangan *et al.*,1999; Wang *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2003). Animais de cada grupo foram eutanasiados 7, 14, 21 e 28 dias após a injeção, considerando que, no modelo proposto, as lesões renais são consideradas mínimas no dia 7, moderadas no dia 14 e severas entre os dias 21 e 28 após injeção da doxorubicina (Rangan *et al.*,1999; Park *et al.*, 2003).

### Avaliação da função renal e Eutanásia

Para avaliar a função renal, amostras urinárias de 24 horas foram coletadas em gaiolas metabólicas nos dias 0 (antes da injeção), 7, 14, 21 e 28 (após a injeção) e amostras sanguíneas foram obtidas por punção cardíaca conforme descrito a seguir. Ao final do protocolo experimental animais de cada grupo foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (60mg/Kg) e xylazina (8 mg/kg) e em seguida coletou-se amostra sanguínea. Após a anestesia os rins foram expostos por laparotomia/toracotomia e uma cânula foi inserida na aorta, via ventrículo esquerdo, para perfusão de solução salina, (PBS - phosphate-buffered saline / 0,15mol/L cloreto de sódio / 0,01 mol/L fosfato de sódio tampão, pH 7,4; a 37° C) por gravitação, até se obter a exsanguinação dos órgãos, indicada pelo seu clareamento.

### Remoção e preparo dos órgãos

Após o clareamento, os rins foram removidos e imediatamente pesados. Em seguida cada rim foi dividido em três porções, por meio de cortes coronais, e cada porção foi processada de acordo com as análises a serem realizadas. Nos animais do grupo 28 dias, também foram removidos fígado, coração e baço para avaliação da massa desses órgãos. Além disso, nesse mesmo grupo, o rim direito foi utilizado para calcular o percentual de umidade renal, conforme será descrito adiante.

A porção do rim separada para análises histológicas e morfométricas foi fixada em paraformaldeído 4% (ph 7,2) por 2 horas, em seguida transferida para a solução de Bouin por 4 horas e depois para uma solução de etanol 70%, trocada diariamente até o clareamento

do órgão. Posteriormente, a amostra foi desidratada em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%) e duas trocas de xilol, e em seguida, embebida em parafina para realização dos cortes histológicos com 4 µm de espessura, que foram montados em lâminas de vidro.

Antes da coloração, os cortes foram desparafinizados em duas trocas de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e lavados em água corrente. Em seguida, foram corados pela hematoxilina (10 minutos), lavados em água corrente, diferenciados em álcool acidulado (100 mL de álcool absoluto e 10 gotas de ácido clorídrico) e novamente lavados em água corrente. Posteriormente, foram corados pela eosina (30 segundos), lavados em água corrente, desidratados em 2 banhos de álcool absoluto e levados à estufa (56°C) para secagem e, em seguida, montados com lamínula e Entellan®. Para as demais colorações, ácido periódico de Shiff (PAS), tricrômico de Masson (TM) e prata amoniacal de Gomori também foram realizadas as etapas de desparafinização, hidratação e protocolos específicos para cada coloração.

A quantidade e distribuição de colágeno tipo I e tipo III no tecido renal foram avaliadas por meio de marcação para imunofluorescência e microscopia confocal, conforme descrito por Robertson *et al.*, (2008) e Pinheiro *et al.*, (2009). Resumidamente, a porção do rim separada para imuno-histoquímica foi imersa em solução de metanol (80%) e DMSO (20%), armazenada em freezer -80°C durante uma semana e, em seguida, transferida para o freezer -20°C, onde permaneceu por mais 24 horas. Após este período de fixação, cada amostra foi lavada três vezes em etanol 99,9% à temperatura ambiente, duas vezes em xilol e então embebida em parafina para a confecção de cortes de 5 a 8 micrômetros, montados em lâminas de vidro.

A terceira porção do rim foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada no freezer -80°C para posterior análise do *status redox*. Após o descongelamento os fragmentos renais foram pesados, macerados e homogeneizados. A peroxidação lipídica foi avaliada pelos níveis teciduais de MDA e a capacidade antioxidante renal foi avaliada através da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), conforme descrito adiante.

### Análises biométricas

Para avaliar o consumo alimentar, o consumo de água e o volume urinário animais de cada grupo foram colocados em gaiolas metabólicas no dia anterior à eutanásia, por um período de 24 horas. No dia da eutanásia cada animal foi avaliado quanto à massa corporal e, após a anestesia e perfusão, os rins foram removidos e imediatamente pesados. Para avaliação da massa renal e corporal, foram empregadas balanças eletrônicas semianalíticas. Nos animais do grupo 28 dias também foram removidos o coração, baço e fígado, para avaliação da massa desses órgãos. Nesses animais o rim direito foi utilizado para calcular a massa renal desidratada e o percentual de umidade, conforme descrito: após a nefrectomia o rim foi imediatamente pesado (massa fresca) e, em seguida, colocado em estufa a 60°C por 24hs, para desidratação. Após ser retirado da estufa, o rim foi novamente pesado (massa desidratada). O conteúdo de líquido de cada rim foi calculado segundo a fórmula:  $[(\text{massa fresca} - \text{massa desidratada}) / \text{massa fresca}] \times 100$  (Yamanari *et al.*, 2007).

### Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas em amostras urinárias de 24 horas com o uso de kits para dosagens de: creatinina (K067 – método cinético de tempo fixo), albumina (K078 – método turbidimétrico) e proteína total (K108 – método colorimétrico - vermelho de pirogalol). Análises bioquímicas também foram realizadas em amostras de plasma (ou soro) utilizando kits colorimétricos para dosagens de: triglicerídeos (K117 – método enzimático de ponto final), colesterol total (K083 – método enzimático de ponto final) e glicose (kit K082 – método enzimático colorimétrico). Todos os kits são comercialmente disponíveis (Bioclin-Quibasa, Belo Horizonte, Brasil). As amostras foram analisadas utilizando-se o analisador automático Cobas Mira Plus (Roche, AG, Switzerland) e o espectrofotômetro Halo DB-20 Spectrophotometer (Dynamica GmbH, Salzburg-Mayrwies, Áustria). Dosagens de sódio e potássio foram realizadas por fotometria de chama (Fotômetro de chamas DM-62, Digimed – Digicrom analítica Ltda, São Paulo).

### Análises histológicas e morfométricas

Para as colorações de rotina, as imagens histológicas foram capturadas utilizando-se microscopia convencional em campo claro, com objetivas de 5x, 20x e 40x e ocular de 10x e digitalizadas através da microcâmera Leica DFC340FX acoplada ao microscópio Leica DM5000B. Para a análise das imagens, utilizou-se o software de morfometria Image J 1.43

para Windows Vista/7, disponível gratuitamente na Internet (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) e o software de análise e processamento de imagem Leica QwinV3. Foram avaliados em média 20, 35 e 60 glomérulos por lâmina, capturados em objetiva de 40x, para as colorações com HE, prata amoniacal de Gomori e PAS, respectivamente. Nas colorações pelo tricrômico de Masson foram avaliados 10 campos aleatórios, capturados em objetiva de 20x (Wang *et al.*, 2001; Vielhauer *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007).

Para o cálculo da área glomerular e do tufo capilar glomerular utilizou-se o software Image J, após a calibração do programa e definição da escala de medida ( $\mu\text{m}$ ). A área glomerular bem como a do tufo capilar glomerular, descritas em  $\mu\text{m}^2$ , foram delimitadas manualmente nas lâminas coradas com PAS e capturadas em objetiva de 40x. A delimitação dessas áreas foi realizada com o auxílio de um mouse, orientando-se pelos limites da cápsula de Bowman e do tufo capilar.

A contagem dos glomérulos também foi realizada com o emprego do software Image J. Lâminas coradas em HE foram capturadas em aumento de 5x, considerando-se todo o campo histológico da lâmina. Com o auxílio do mouse foram demarcados na imagem os pontos correspondentes aos glomérulos, que posteriormente, foram calculados pelo próprio programa.

A análise da celularidade glomerular e tubulointersticial, descritas como número de células por área definida, bem como da deposição tecidual de colágeno, descrita como percentual da área avaliada, foram realizadas com o auxílio do software de análise e processamento de imagem Leica QwinV3. Os valores obtidos para cada variável, tanto pelo programa Image J, quanto pelo Leica QwinV3, foram registrados em planilhas do Excel para posterior análise estatística.

#### Imuno-histoquímica

Para a marcação imuno-histoquímica os cortes foram desparafinizados com xilol, reidratados em concentrações decrescentes de etanol até salina tamponada em fosfato e incubados em solução bloqueadora (1% de albumina sérica bovina e 0,1% Tween 20) à temperatura ambiente durante uma hora. As lâminas foram incubadas, *overnight* a 4°C, com um dos anticorpos primários: rabbit anti-human collagen I (1:200, cat. no. 600-401-103-0.5) ou rabbit anti-human collagen III (1:200, cat. no. 600-401-105-0.1) (Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA, USA), previamente diluídos em solução

bloqueadora (1:10). Após cinco lavagens em solução tampão fosfato o anticorpo Donkey anti-rabbit IgG-conjugado com Cy3 (cat. no. 711-165-152, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) foi adicionado, em ambiente escuro à temperatura ambiente, e permaneceu durante uma hora. Em seguida foram realizadas lavagens com solução tampão fosfato e montagem em 90% glicerol/ 10% Tris 1M.

As imagens foram capturadas através do microscópio confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss Inc., Göttingen Germany) com objetiva de 40x e aumento final de 400x. Os parâmetros do microscópio confocal foram definidos no início da sessão de imagens e não mais alterados. Para as análises quantitativas, as imagens foram capturadas em 8 bits e analisadas em escala de cinza. Quatro imagens foram capturadas para cada região renal e três medidas efetuadas para cada imagem. A quantificação da intensidade de fluorescência e da área foi realizada com auxílio do software Scion Image Beta 4.02 software (Scion Corporation, NIH-USA). A fluorescência de fundo foi subtraída da região de interesse. A intensidade de fluorescência baseou-se no nível de graduação de cinza e variou de 0 (preto) a 255 (branco) com um valor médio para cada área correspondendo à soma do valor de cinza de todos os pixels, dividido pelo número de pixels por área (Pinheiro *et al.*, 2009).

#### Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o pacote SPSS (Statistical Package for Social Sciences, IBM Inc., USA) versão 17.0. A normalidade e homogeneidade dos dados foram verificadas pelos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Análises intragrupo foram feitas por Análise de Variância e teste post-hoc de Tukey, ou pelo teste Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann-Whitney. Análise bivariada com teste t de Student ou teste de Mann-Whitney, de acordo com a normalidade da variável, foi utilizada para verificação de diferença entre os grupos. Adotou-se o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

Para excluir qualquer alteração prévia ao protocolo experimental, os animais foram avaliados para os seguintes parâmetros, antes da injeção de doxorubicina, (T-0): proteinúria, creatinina urinária, massa corporal, consumo água e volume urinário, e os resultados não apresentaram diferença estatística entre os grupos (TAB. 1).

### Alterações bioquímicas e disfunção renal, induzidas pela doxorrubicina

Os animais do grupo DOX, quando comparados ao grupo CON desenvolveram dislipidemia, com aumento na quantidade de colesterol total e triglicérido a partir do 14º dia após a injeção da doxorrubicina. Também demonstraram aumento na glicemia no 28º dia após a injeção (TAB. 2). Animais do grupo DOX desenvolveram albuminúria no 7º dia após a injeção da droga (GRAF. 1). Nesse grupo, ocorreu também aumento na excreção urinária de proteínas totais, redução na excreção urinária de creatinina, além de redução no clearance de creatinina nas três primeiras semanas após a injeção da droga, com normalização do clearance no 28º dia após a injeção (TAB. 2). A creatinina sérica não demonstrou alteração ao longo do experimento, entretanto, no grupo DOX ocorreu redução na concentração sérica de creatinina no 28º dia após a injeção. A excreção de sódio e potássio, na urina, apresentou dinâmica semelhante, com redução significativa na excreção desses íons, no grupo DOX em relação ao grupo CON a partir do 14º após a injeção da droga (TAB. 2).

TABELA 1  
Condição inicial (pré-tratamento) dos animais utilizados no experimento

	Grupo CON	Grupo DOX	P
	Média (EP)	Média (EP)	
Proteinúria (mg/L)	30,51 (2,19)	31,81 (2,84)	0,736
Creatinina urinária (mg/dL)	145,91 (11,62)	130,57 (7,77)	0,265
Massa corporal (mg)	315,24 (7,73)	296,55 (7,01)	0,082
Consumo de água (mL)	41,42 (2,34)	35,96 (2,04)	0,085
Volume urinário (mL)	7,12 (0,84)	8,32 (1,63)	0,679

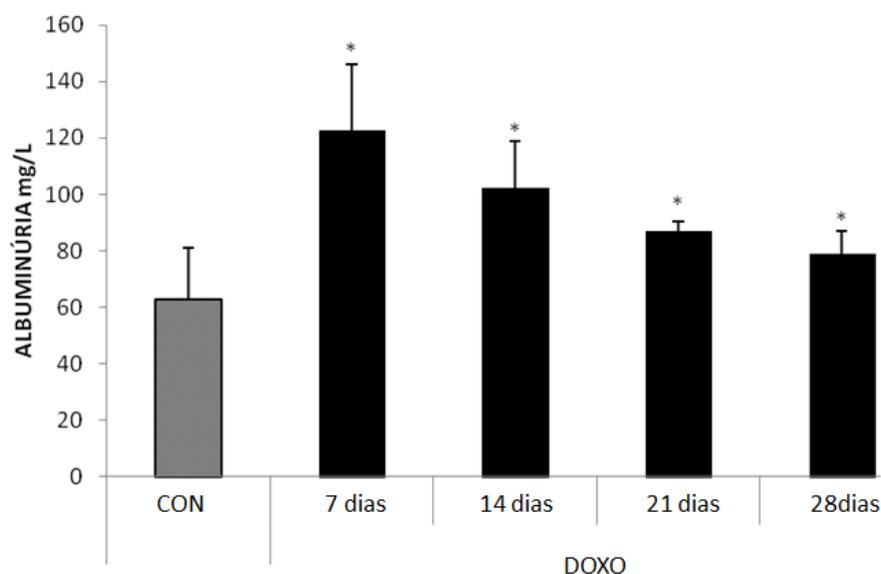


GRÁFICO 1 – Presença de albuminúria em ratos com síndrome nefrótica a partir do 7º dia após a injeção da doxorrubicina. Grupo CON representa a média de todos os tempos (7, 14, 21 e 28 dias). (\*) = Alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ )

#### Alterações biométricas induzidas pela doxorrubicina

Nos animais do grupo DOX em relação ao grupo CON, observamos menor ganho de massa corporal (TAB. 3) a partir do 14º dia após injeção da droga, além de redução no consumo alimentar a partir do 7º dia e aumento na massa renal (fresca) a partir do 14º dia (TAB. 2). Não ocorreu alteração significativa no volume urinário entre os dois grupos (TAB. 3). No grupo DOX em relação ao grupo CON, no 28º dia após a injeção, ocorreu aumento na massa hepática, na massa renal (fresca e desidratada) e também no percentual de umidade dos rins. Não ocorreram alterações significativas na massa do baço ou do coração (TAB. 4).

#### Esclerose renal induzida pela doxorrubicina

Nos animais do grupo DOX, em relação ao grupo CON, ocorreu redução progressiva na quantidade de glomérulos, bem como na área glomerular, com diferença significativa a partir do 21º dia após injeção da droga (TAB. 2). A partir do 21º dia, também ocorreu aumento significativo na deposição renal de colágeno nesses animais (TAB. 2). No 28º dia, após a injeção da doxorrubicina, ocorreu redução na área do tufo capilar glomerular (TAB. 3), redução na celularidade glomerular e aumento na celularidade túbulo intersticial (FIG. 1 e TAB. 2). Nos animais do grupo DOX observou-se hipertrofia da membrana basal tubular e glomerular, e aumento nas áreas PAS positivas no tufo capilar glomerular (FIG. 2).

Ocorreu também aumento na deposição de colágeno no tufo glomerular e na parede dos túbulos no 28º dia após a injeção da doxorubicina (FIG. 2). A impregnação pela Prata amoniacal mostrou expansão intersticial no grupo DOX (FIG. 1), verificada pelo aumento na espessura da membrana basal dos túbulos e glomérulos e sinais de glomeruloesclerose focal e segmentar, caracterizada pela obliteração parcial dos capilares glomerulares.

#### Correlação entre proteinúria, dislipidemia e massa renal

Nos animais do grupo DOX, no presente estudo, a concentração de proteína na urina apresentou correlação fraca ( $r=0,371$ ) e moderada ( $r=0,496$ ) com os níveis séricos de triglicerídeos e colesterol, respectivamente. Observou-se também correlação mais acentuada ( $r=0,618$ ) entre a concentração de proteína na urina e a massa renal (TAB. 5). Ocorreu forte correlação entre as concentrações séricas de colesterol e triglicerídeos ( $r=0,792$ ) além de correlação moderada entre a massa renal e a concentração sérica de colesterol ( $r=0,627$ ) e triglicerídeos ( $r=0,471$ ). Não houve correlação entre esses lipídeos e a deposição de colágeno no tecido renal (TAB. 5)

#### Discussão

No presente estudo, os animais do grupo DOX apresentaram alterações condizentes com os distúrbios renais e metabólicos, característicos do modelo animal de SN induzida pela doxorubicina. Entre as alterações, foram observados distúrbios bioquímicos tais como dislipidemia precoce; alterações histológicas compatíveis com a presença de infiltrado inflamatório crônico e processo de fibrose renal, além de alterações biométricas. Observou-se, ainda, correlação positiva da proteinúria com a concentração de lipídeos no plasma e com a massa renal. Devido às limitações no estudo da SNI em pacientes, modelos experimentais contribuem bastante para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos dessa doença (Lee, *et al.*, 2006; Eddy *et al.*, 2012), como o modelo de indução da SN pelo quimioterápico doxorubicina. Em roedores, a doxorubicina induz a lesões renais semelhantes às observadas em pacientes com SNI (Wang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006; Lee e Harris, 2011).

A proteinúria é a alteração bioquímica característica da SN, tanto em pacientes (Schachter, 2004) quanto no modelo animal, sendo útil para confirmar a eficácia do modelo

animal de SN (Pippin *et al.*, 2009). De acordo com Thomas e Colaboradores (1999), a alta concentração de proteína na urina está associada à piora da doença renal. No modelo de SN induzida pela doxorrubicina ocorre perda de proteína na urina entre 5 e 7 dias após a injeção da droga (Bertani *et al.*, 1982; Wang *et al.*, 2000; Pippin *et al.*, 2009). Além da proteinúria, pode ocorrer hipoalbuminemia, hipercreatinemia (Wang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006) e redução no clearance de creatinina (Chen *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2006). Este estudo confirmou a ocorrência de albuminúria; nos animais do grupo DOX em relação ao grupo controle, que iniciou precocemente e persistiu por todo o período experimental. Observamos também redução na excreção urinária de creatinina, significativa a partir do 14º dia após injeção da droga, além de redução no clearance de creatinina, durante as três primeiras semanas após a injeção, conforme esperado, para uma doença de comportamento progressivo. De forma interessante, no 28º dia o clearance de creatinina voltou aos valores do grupo controle. Nesse mesmo momento, a concentração plasmática de creatinina apresentou-se significativamente menor do que no grupo controle, o que pode sugerir uma tentativa de recuperação da função renal. Alguns autores não encontraram alterações significativas na concentração urinária ou plasmática de creatinina (Bertani *et al.*, 1982; Okuda *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1995), no modelo animal de SN induzida pela doxorrubicina.

A dislipidemia é característica comum aos pacientes com SNI (Schachter, 2004) e também tem sido descrita no modelo animal de SN (Shearer *et al.*, 2005; Buranakarl *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2011). No presente estudo ocorreu aumento nos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos, principalmente a partir do 14º dia após a injeção da doxorrubicina. No modelo animal de SN induzida pela doxorrubicina, a patogênese da lesão renal tem sido associada às dislipidemias (Van Goor *et al.*, 1993; De Boer *et al.*, 1999; Shearer *et al.*, 2005). No estudo de Shearer e colaboradores (2005) houve correlação positiva entre o aumento no colesterol plasmático e a perda de albumina na urina. No presente estudo, a concentração de proteína na urina dos animais do grupo DOX apresentou correlação fraca e moderada com os níveis de triglicerídeos e colesterol séricos, respectivamente. Observou-se no presente estudo correlação moderada entre a proteinúria e a massa renal. De acordo De Boer e colaboradores (1999) a intensidade da fibrose glomerular apresenta maior correlação com a concentração de colesterol plasmático do que com a concentração de proteínas na urina. Nos resultados deste estudo a concentração sérica de colesterol apresentou forte correlação com os níveis séricos de triglicerídeos, conforme esperado. Também houve correlação moderada entre a massa renal e a concentração sérica de colesterol e triglicerídeos,

contudo, não se detectou correlação entre esses lipídeos e a deposição de colágeno no tecido renal.

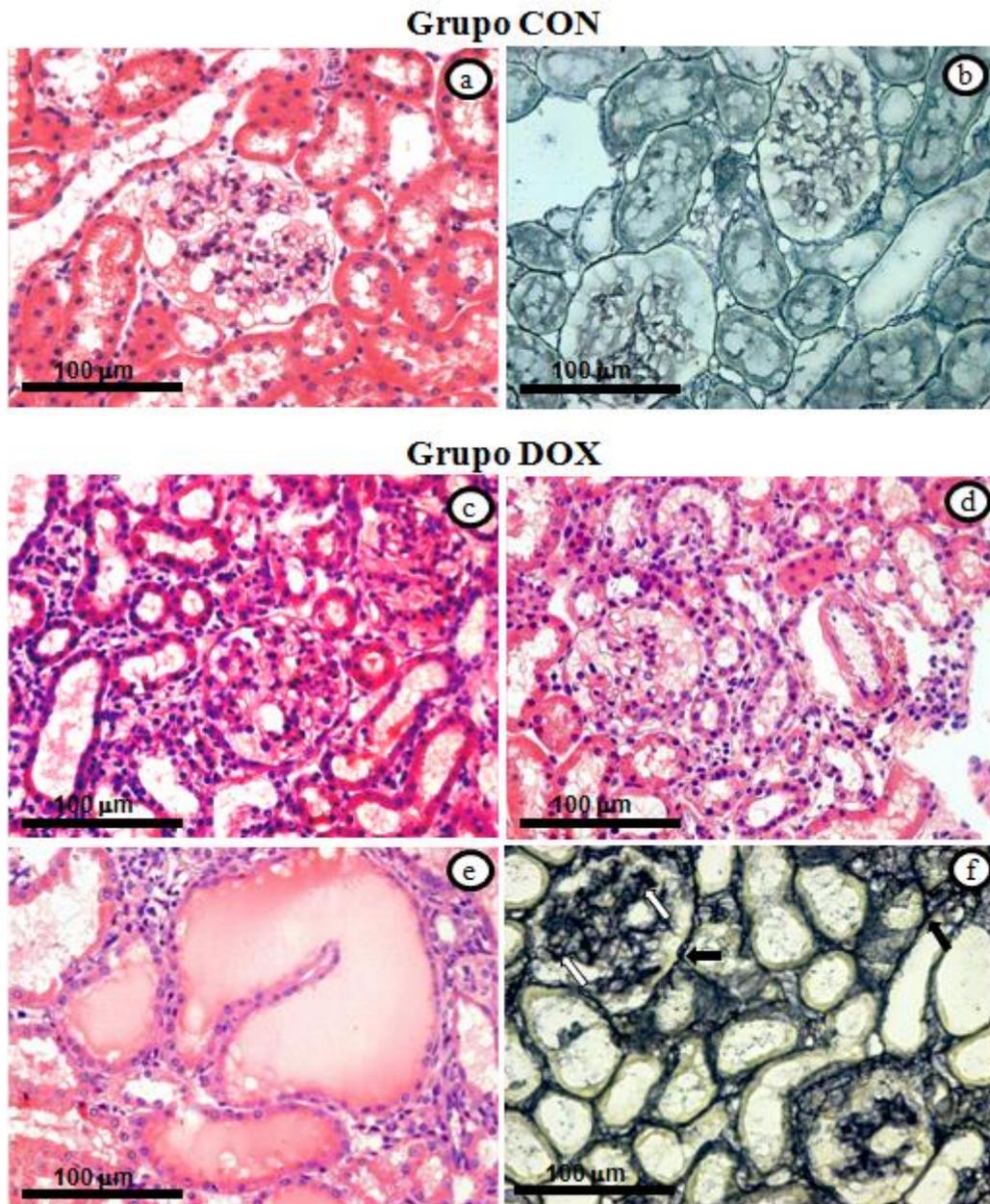


FIGURA 1 - Alterações histológicas renais em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina - (a) e (b) Grupo CON: aparência tecidual normal (HE e Prata amoniacal); (c) e (d) Grupo DOX 28º dia: redução na celularidade glomerular e aumento na celularidade tubulointerstitial (HE); (e) e (f) Grupo DOX 28º dia: áreas de depósitos hialínicos e expansão do volume intersticial (HE); glomerulosclerose focal com obliteração parcial dos capilares glomerulares – setas brancas (Prata amoniacal).

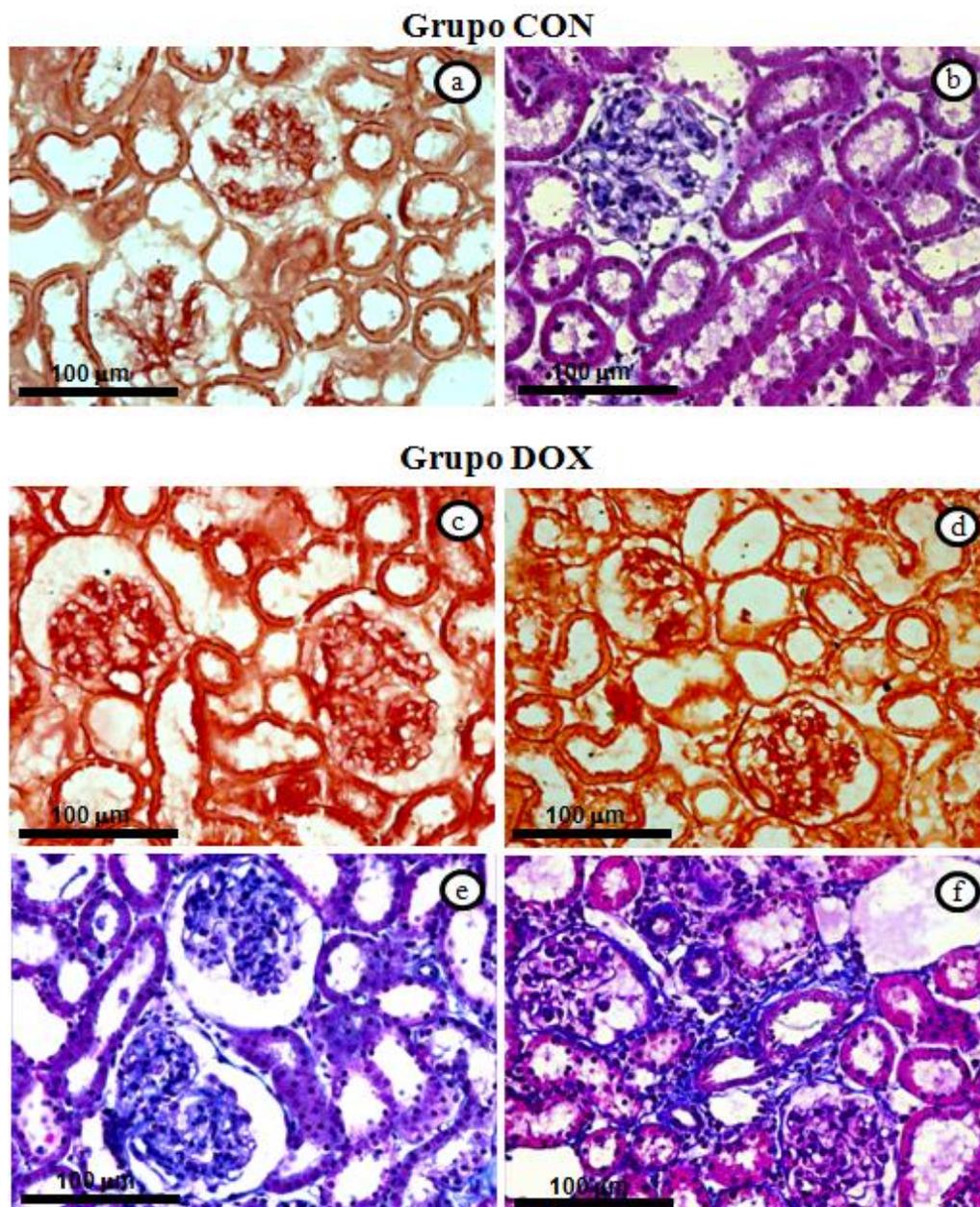


FIGURA 2 - Alterações histológicas renais em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina - (a) e (b) Grupo CON: aparência tecidual normal (PAS e Tricrômico de Masson); (c) e (d) Grupo DOX 28° dia: aumento das áreas PAS positivas no tufo capilar glomerular e na membrana basal dos túbulos e cápsula de Bowman (PAS); (e) e (f) Grupo DOX 28° dia: aumento na deposição de colágeno no tufo glomerular e na parede dos túbulos (Tricrômico de Masson).

TABELA 2

Resultados das análises bioquímicas, biométricas e histológicas em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina. (\*) = Alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Grupo CON representa a média de todos os tempos (7, 14, 21 e 28 dias).

	Grupo DOX				
	Grupo CON	T-07	T-14	T-21	T-28
	Média (EP)	Média (EP)	Média (EP)	Média (EP)	Média (EP)
Colesterol total (mg/dL)	66,63 (7,59)	97,63 (12,42)	350,11 (33,15) *	544,34 (73,86) *	513,71 (96,65) *
Triglicerídeos (mg/dL)	72,93 (6,53)	41,10 (7,40) *	569,44 (164,46) *	686,95 (54,79) *	574,28 (122,95) *
Proteinúria (mg/L)	33,25 (3,09)	44,55 (5,34)	45,34 (5,53)	58,73 (6,84) *	71,54 (3,42) *
Razão Albumina/ Creatinina urina (mg/g)	0,39 (0,07)	0,92 (0,18) *	1,05 (0,35) *	1,09 (0,41) *	0,98 (0,11) *
Na+ urina (mg/dL)	0,49 (0,06)	0,46 (0,12)	0,18 (0,03) *	0,21 (0,05) *	0,24 (0,06) *
K+ urina (mg/dL)	2,16 (0,20)	2,60 (0,26)	0,97 (0,18) *	0,91 (0,15) *	0,75 (0,16) *
Glicemia (mg/dL)	311,31 (22,09)	364,90 (22,39)	356,98 (40,65)	359,95 (39,75)	467,76 (74,16) *
Creatinina urinária (mg/dL)	145,20 (22,44)	138,79 (18,82)	64,15 (12,70) *	47,25 (8,09) *	68,07 (5,05) *
Creatinina sérica (mg/dL)	0,60 (0,02)	0,61 (0,06)	0,88 (0,36)	0,82 (0,13)	0,42 (0,02) *
Clearance creatinina (mL/min.)	1,54 (0,32)	0,76 (0,09) *	0,34 (0,06) *	0,68 (0,16) *	1,58 (0,30)
Consumo alimentar (mg/dia)	30,25 (0,67)	20,54 (3,24) *	22,20 (2,19) *	22,47 (1,57) *	26,98 (2,33)
Massa renal fresca (mg)	9,28 (0,35)	9,45 (0,27)	10,70 (0,46) *	12,81 (0,40) *	13,84 (0,81) *
Quantidade de glomérulos (unid.)	185,80 (8,44)	180,33 (15,82)	192,60 (14,75)	130,42 (17,19) *	128,85 (10,45) *
Área glomerular ( $\mu\text{m}^2$ )	7238,88 (131,30)	7047,73 (402,15)	7183,36 (42,49)	6322,90 (720,52) *	6609,10 (154,31) *
Deposição renal de colágeno (%)	6,13 (0,79)	7,55 (0,46)	6,61 (0,81)	11,04 (0,62) *	12,19 (0,68) *
Celularidade Glomerular (unid.)	62,50 (1,64)	63,07 (2,33)	66,69 (4,22)	63,86 (5,09)	51,65 (1,85) *
Celularidade Tubulointersticial (unid.)	428,40 (10,13)	438,04 (14,91)	456,10 (20,13)	439,81 (32,85)	503,39 (16,01) *

TABELA 3

Resultados das análises biométricas e histológicas em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina / (\*) = Alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ )

	Grupo CON				Grupo DOX			
	T-07	T-14	T-21	T-28	T-07	T-14	T-21	T-28
	Média (EP)	Média (EP)	Média (EP)	Média (EP)				
Volume urinário (mL/dia)	9,50 (2,22)	8,40 (1,60)	23,50 (4,15)	5,90 (2,05)	5,41 (1,05)	7,10 (1,64)	14,92 (3,77)	12,42 (2,46)
Massa corporal (gramas)	276,92 (6,85)	343,20 (13,98)	389,44 (15,26)	379,04 (8,89)	273,26 (6,02)	277,94 (11,60) *	296,08 (11,49) *	308,15 (14,68) *
Área tufo capilar glomerular ( $\mu\text{m}^2$ )	3433,00 (72,80)	4021,46 (32,22)	3761,60 (59,00)	3661,70 (40,90)	3716,80 (179,25)	3768,73 (136,66)	3245,73 (139,75)	3253,86 (91,95) *

TABELA 4

Resultados das análises biométricas em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina, 28 dias após a injeção. (\*) = Alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). (+) = massa do órgão corrigida pela massa corporal do animal.

	Grupo CON	Grupo DOX
	Média (EP)	Média (EP)
Massa renal fresca (mg) +	4,31 (0,19)	7,18 (0,39) *
Massa renal desidratada (mg) +	0,86 (0,04)	1,16 (0,05) *
Percentual de umidade dos rins (%)	79,92 (0,66)	83,65 (0,59) *
Massa hepática (mg) +	38,06 (2,45)	63,83 (3,23) *
Massa do baço (mg) +	3,81 (0,53)	2,94 (0,39)
Massa cardíaca (mg) +	3,31 (0,15)	3,68 (0,24)

TABELA 5

Correlações entre proteinúria, concentração sérica de lipídeos, massa renal e deposição de colágeno nos rins, em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina. (\*) = Correlações estatisticamente significativas

	Proteinúria		Colesterol		Triglicerídeos	
	r	p	r	p	r	p
Colesterol	0,496 *	0,004	-	-		
Triglicerídeos	0,371 *	0,041	0,792 *	<0,001	-	-
Massa renal	0,618 *	<0,001	0,627 *	0,001	0,471 *	0,015
Deposição colágeno	0,139	0,333	0,330	0,147	0,164	0,315

Em geral, as alterações glicêmicas não têm sido foco de estudos no modelo animal de SN induzida pela doxorrubicina. Acredita-se que o aumento da glicemia, observada no 28º, nos animais do grupo DOX, possa estar relacionado às alterações nos mecanismos hepáticos de glicogenólise ou gliconeogênese. Distúrbios nos mecanismos glomerulares e tubulares de formação da urina poderiam justificar as alterações verificadas na excreção urinária de sódio e potássio que, no presente estudo, se apresentaram reduzidas no grupo DOX.

A perda de massa corporal é relato comum nos animais com SN induzida pela doxorrubicina, ocorrendo normalmente nas primeiras semanas após a injeção da droga (Okuda *et al.*, 1986; Rangan *et al.*, 1999; Jeansson *et al.*, 2009). Essa perda de massa pode estar associada à redução no consumo alimentar (Buranakarl *et al.*, 2008; Jeansson *et al.*, 2009). Posteriormente observa-se ganho de massa, mas de forma bem mais lenta que no grupo controle (Wang *et al.*, 2000; Lee, *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2011). Segundo Mihailovic-Stanojevic e colaboradores (2009) a perda de massa pode estar relacionada à dose de doxorrubicina e à linhagem animal utilizada, não sendo, portanto, um achado constante. Os resultados do presente estudo corroboram os achados da literatura, pois nos animais do grupo DOX ocorreu perda de massa corporal na primeira semana após injeção da droga, seguida pelo ganho de massa ao longo do experimento, contudo com menor intensidade que nos animais do grupo CON. Observou-se, ainda, redução no consumo alimentar no grupo DOX, a partir do 7º dia após a injeção, o que poderia justificar o menor ganho de massa corporal. Em humanos a doxorrubicina provoca alterações na mucosa bucal, além de anorexia que ocorre nas primeiras 24 horas após a injeção e pode perdurar por vários dias (Adriamycin 2012). A

utilização de injeções intraperitoneais, com solução de eletrólitos e glicose, pode evitar a perda de massa nos animais tratados com a doxorubicina (Jeansson *et al.*, 2009).

Apesar da existência de relato indicando redução progressiva da massa renal em animais injetados com a doxorubicina, (Lee *et al.*, 2006), a maioria dos estudos descreve hipertrofia desse órgão, em animais com SN induzida pela doxorubicina (Okuda *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2000). No presente estudo, ocorreu aumento da massa renal a partir do 14º dia após a injeção da doxorubicina. Devido ao aumento da massa renal, observado no grupo DOX, ao longo deste experimento, realizaram-se procedimentos de desidratação dos rins, para saber se esse aumento de massa foi devido ao acúmulo de líquido (edema), característico de pacientes com SN (Schachter, 2004) e também presente no modelo animal de SN (Bertani *et al.*, 1982; Nakhoul *et al.*, 2005) ou, se ocorreu pelo excesso de tecido, devido à fibrose túbulo-glomerular, característica também presente em pacientes com SN (Souto *et al.*, 2008) e no modelo animal dessa doença (Wu *et al.*, 2007). Observou-se que o aumento na massa renal nos animais do grupo DOX, no 28º dia após injeção da droga, ocorreu em parte devido ao aumento do percentual de líquido tecidual e, em parte, devido ao aumento na quantidade de tecido renal, provavelmente relacionados aos mecanismos de edema e de fibrose tecidual, respectivamente.

Outros órgãos internos como coração pulmão e fígado foram pouco investigados no modelo animal de SN induzida pela doxorubicina. De acordo com Zheng e colaboradores (2005) esses órgãos não são afetados nas doses de doxorubicina usualmente utilizadas para induzir SN em camundongos, por um período de até 15 dias. Neste estudo, ocorreu aumento na massa hepática, nos animais do grupo DOX em relação ao grupo controle, sem alteração significativa na massa do baço ou do coração nesses animais, após 28 dias de injeção da droga. Apesar de não se ter verificado o teor de umidade do fígado, acredita-se que o aumento na massa hepática também esteja relacionado ao aumento no percentual de líquido tecidual (edema) e na quantidade de tecido hepático, uma vez que a perda proteica provocada pela doença pode sobrecarregar a função hepática e com isso promover hipertrofia desse órgão.

No modelo animal de SN induzida pela Doxorubicina, as lesões renais são mínimas ou moderadas, entre o 7º e o 14º dia após injeção da droga, e acentuadas entre o 21º e 28º dia (Rangan *et al.*, 1999). No presente estudo, as alterações histológicas nos animais do grupo DOX, a partir do 21º dia após a injeção da droga, foram descritas como reduções na quantidade de glomérulos, na área glomerular, na área do tufo capilar glomerular e na

celularidade dos glomérulos. Também foi demonstrado aumento na deposição de colágeno no tufo capilar glomerular e na parede dos túbulos renais, além de hipertrofia da membrana basal dos glomérulos e túbulos renais e aumento nas áreas PAS positivas no tufo capilar glomerular. O aumento na espessura da membrana basal de túbulos e glomérulos e a obliteração parcial dos capilares do tufo glomerular, verificados na impregnação pela prata, para os animais do grupo DOX, são compatíveis com a expansão do volume intersticial e com o processo de glomerulosclerose focal e segmentar, conforme descrito anteriormente por Bertani e colaboradores (1986) e também por Vielhauer e colaboradores (2004). Todas essas alterações são condizentes com a perda progressiva da função renal e com o processo de fibrose tecidual tardia.

Os dados desta pesquisa corroboraram os achados da literatura no sentido que, no modelo animal de SN induzida pela doxorubicina, durante a evolução da doença, ocorre redução da celularidade glomerular, atrofia e colapso do tufo glomerular além de expansão mesangial (Chen *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000). Os dados deste estudo demonstram que no 28º dia após a injeção da doxorubicina ocorreu aumento na celularidade túbulo-intersticial, indicativo da presença de um infiltrado inflamatório mononuclear crônico. Segundo Wang e colaboradores o acúmulo de células inflamatórias, como macrófagos e linfócitos no tecido renal, é característico no modelo animal de SN pela doxorubicina e ocorre somente no espaço intersticial.

Diversas alterações relatadas no presente estudo são bem descritas na literatura, contudo algumas delas foram pouco investigadas, como o aumento na quantidade de líquido no tecido renal (edema), responsável pelo aumento de massa desse órgão e possivelmente contribuindo para a disfunção do mesmo.

## **Conclusão**

Os achados do presente estudo corroboram a caracterização do modelo animal de SN induzida pela doxorubicina. Nesse modelo animal de SN, as alterações bioquímicas, como dislipidemias e proteinúria, surgem precocemente, durante a evolução da doença e as lesões histológicas tornam-se bastante intensas a partir do 21º dia após a injeção da doxorubicina. Uma vez que a fisiopatologia da SNI ainda não está bem definida, estudos biométricos, bioquímicos e histológicos, evidenciando a progressão da lesão renal e suas

consequências, contribuem com a melhor compreensão e direcionamento das investigações sobre essa doença. Estudos adicionais devem investigar o mecanismo de formação do edema renal, bem como a importância desse edema na progressão da lesão renal no modelo animal de SN induzida pela doxorubicina, a fim de colaborar para a melhor compreensão da história natural dessa doença.

## Referencias

Adriamycin [database on the Internet]. Health Communication Network 2012; Disponível em: [http://www.pfizer.com.au/sites/au/Products/Leaflets/PI\\_Adriamycin\\_212.pdf](http://www.pfizer.com.au/sites/au/Products/Leaflets/PI_Adriamycin_212.pdf). Acessado em 02 de Agosto de 2012.

Bertani T, Cutillo F, Zoja C, Brogginini M, Remuzzi G. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney Int* 1986; 30:488–496.

Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thoua Y, *et al.*. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 1982; 46:16–23.

Buranakarl C, Kalandakanond-Thongsong S, Pondeenana S. Renal catecholamine contents in doxorubicin-treated rats receiving morinda citrifolia (Noni) Juice. *J Thai of Physiol Sci* 2008; 20:89–96.

Chen A, Sheu LF, Ho YS, Lin YF, Chou WY, Chou TC, *et al.*. Experimental focal segmental glomerulosclerosis in mice. *Nephron* 1998; 78:440-452.

Chen A, Wei CH, Sheu LF, Ding SL, Lee WH. Induction of proteinuria by adriamycin or bovine serum albumin in the mouse. *Nephron* 1995; 69:293–300.

De Boer E, Navis G, Tiebosch AT, De Jong PE, Dezeuw D. Systemic factors are involved in the pathogenesis of proteinuria-induced glomerulosclerosis in Adriamycin nephrotic rats. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2359–2366.

Eddy AA, López-Guisa JM, Okamura DM, Yamaguchi I. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatr Nephrol* 2012; 27:1233–1247.

Jeansson M, Björck K, Tenstad O, Haraldsson B. Adriamycin Alters Glomerular Endothelium to Induce Proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:114–122.

Lee VWS, Harris DCH. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental

glomerulosclerosis. *Nephrology* 2011; 16:30–38.

Lee VWS, Wang Y, Qin X, Wang Y, Zheng G, Mahajan D, *et al.* Adriamycin nephropathy in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21: 3293–3298.

Mihailovic-STanojevic N, Jovovic D, Miloradovic Z, Grujic-Milanovic J, Jerkic M, Markovic-Lipkovski J. Reduced progression of adriamycin nephropathy in spontaneously hypertensive rats treated by losartan. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:1142–1150.

Muñoz M, Rincón J, Pedrañez A, Viera N, Hernández-Fonseca JP, Mosquera J. Proinflammatory role of angiotensin II in a rat nephrosis model induced by adriamycin. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. Doi: 10.1177/1470320311410092 2011. Published online: 24 June 2011.

Nakhoul F, Ramadan R, Khankin E, Yaccob A, Kositch Z, Lewin M, *et al.* Glomerular abundance of nephrin and podocin in experimental nephrotic syndrome: different effects of antiproteinuric therapies. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289:880-890.

Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, Onoyama K, Fujimi S, Fujishima M. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int* 1986; 29:502–510.

Park E, Kim S, Lee M, Lee HS, Lee I, Sung JK, *et al.* Protective effects of N-acetylcysteine and selenium against doxorubicin toxicity in rats. *J of Veterinary Medicine* 2003; 4:129-136.

Pinheiro SVB, Ferreira AJ, Kitten GT, Silveira KD, Silva DA, Santos SHS, Gava E, Castro CH, Magalhães JA, Mota RK, Botelho-Santos GA, Bader M, Alenina N, Santos RAS and Simões e Silva AC, 2009. Genetic deletion of the angiotensin(1-7) receptor Mas leads to glomerular hyperfiltration and microalbuminuria. *Kidney Int*; 75:1184-1193.

Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC, Durvasula RV, Hauser PV, Kowalewska J, *et al.* Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296:213-229

Rangan GK, Wang Y, Tay YC, Harris DCH. Inhibition of nuclear factor-kb activation reduces cortical tubulointerstitial injury in proteinuric rats. *Kidney Int* 1999; 56:118-34.

Robertson D, Savage K, Reis-Filho JS and Isacke CM 2008. Multiple immunofluorescence labeling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. *BMC Cell Biol*; doi: 10.1186/1471-2121-9-13. Published online: 19 Mar 2008.

Schachter AD. The pediatric nephrotic syndrome spectrum: clinical homogeneity and

molecular heterogeneity. *Pediatr Transplant* 2004; 8: 344-348.

Shearer GC, Newman JW, Hammock BD, Kaysen GA. Graded Effects of Proteinuria on HDL Structure in Nephrotic Rats. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:1309–1319.

Souto MFO, Teixeira MM, Penido MGMG, Simões e Silva AC. Fisiopatologia da Síndrome Nefrótica em crianças e adolescentes. *Arch Latin Nefr Ped* 2008; 8:1-10.

Thomas ME, Brunskell NJ, Harris KPJ, BaileYE, Pringgle JH, Furnes PE, *et al.* Proteinúria induces tubular cell turnover: a potential mechanisms for tubular atrophy. *Kidney Int* 1999; 55:890-898.

Van Goor H, Van Der Horst MLC, Atmosoerodjo J, Joles JA, Van To A, Grond J. Renal Apolipoproteins in Nephrotic Rats. *Am J Pathol* 1993; 142:1804-1812.

Vielhauer V, Berning E, Eis V, Kretzler M, Segerer S, Strutz F, *et al.* CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2004; 66:2264–2278.

Wang Y, Wang YP, Tay Y-C, Harris DCH. Progressive adriamycin nephropathy in mice: Sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int* 2000; 58:1797–1804.

Wang Y, Wang YP, Tay Y-C, Harris DCH. Role of CD8 cells in the progression of murine adriamycin nephropathy. *Kidney Int* 2001-b; 59:941-949.

Wu H, Wang YM, Wang Y, Hu M, Zhang GY, Knight JF, *et al.* Depletion of gama-delta T cells exacerbates murine adriamycin nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1180–1189.

Yamanari MGI, Kunitake TA, Almeida JLJ, Jukemura J, Cunha JEM, Machado MCC. Efeito da hipertermia na pancreatite aguda grave experimental. *Rev Col Bras Cir* 2007; 34: 35-40.

Zheng Z, Schmidt-Ott KM, Chua S, Foster KA, Frankel RZ, Pavlidis P, *et al.* A Mendelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2502–2507.

## 5.2 ARTIGO ORIGINAL

### **Aumento na expressão de CD18 e CD80 em leucócitos do sangue periférico: potencial ligação entre a maior ativação leucocitária e a lesão renal em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina**

Wagner de Fátima Pereira<sup>1</sup>; Gustavo Eustáquio Alvim Brito-Melo<sup>1</sup>; Dirceu de Sousa Melo<sup>1</sup>; Talita Emanuela Domingues<sup>1</sup>; Karine Beatriz Costa<sup>1</sup>; Lorena Barbosa Fonseca<sup>1</sup>; Cleiton Willian Cordeiro<sup>1</sup>; Fábio Lourenço Tadeu Guimarães<sup>1</sup>; Etel Rocha-Vieira<sup>1</sup>; Ana Cristina Simões e Silva<sup>2,a</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de imunologia, Centro Integrado de Pesquisa em Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório interdisciplinar de investigações médicas Unidade de nefrologia pediátrica, Departamento de Pediatria, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>a</sup> Endereço corrente – Laboratório Interdisciplinar de Investigações Médicas – Faculdade de Medicina – Avenida Alfredo Balena 190 - 2º andar sala 281 - Bairro Santa Efigênia - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil CEP: 30130-100.

Autor correspondente: Ana Cristina Simões e Silva. E-mail: [acsilva@hotmail.com](mailto:acsilva@hotmail.com)

## Resumo

A Síndrome Nefrótica (SN) caracteriza-se por proteinúria, hipoalbuminemia e edema generalizado. Embora seu mecanismo fisiopatológico continue desconhecido, estudos com pacientes e modelo animal têm associado a SN com alterações na resposta imunológica. No presente estudo foi avaliada a expressão das moléculas CD80 e CD18, relacionadas à ativação e migração celular respectivamente, nos leucócitos do sangue periférico de ratos com SN induzida pela doxorubicina, bem como o perfil do leucograma e o dano oxidativo renal nestes animais, em diferentes fases da doença. Ratos *Wistar*, machos, 250 a 300 gramas de peso foram divididos em dois grupos: animais que receberam injeção endovenosa de doxorubicina (7,5mg/kg) (DOX=32) e animais que receberam solução salina (CON=32). Animais de cada grupo foram eutanasiados nos dias 7, 14, 21 e 28 após as injeções, sendo coletadas amostras de urina de 24 horas e sangue para análises bioquímicas e imunológicas. A caracterização fenotípica dos leucócitos foi realizada por citometria de fluxo, pela expressão de CD18 em monócitos, linfócitos e células NK e pela expressão de CD80 em monócitos. Amostras de tecido renal foram quantificadas para o Malondialdeído (MDA) e para a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase. Nos animais do grupo DOX ocorreram alterações temporárias no leucograma total e nas subpopulações de monócitos, neutrófilos e linfócitos, além de aumento na expressão de CD18 em linfócitos T citotóxicos, células NK e monócitos, bem como na expressão de CD80 em monócitos. O dano oxidativo renal apresentou correlação positiva com a expressão de CD80 em monócitos e com os níveis plasmáticos de creatinina, evidenciando uma associação entre a maior ativação periférica de monócitos e a lesão renal nos animais com SN. Estes resultados sugerem que células citotóxicas e fagocíticas são preferencialmente recrutadas do sangue periférico para o foco da lesão, o que pode contribuir para a injúria renal neste modelo animal de SN. Estudos adicionais que analisem o efeito do bloqueio das integrinas e moléculas coestimuladoras, bem como a resposta migratória dos neutrófilos e o dano oxidativo no tecido renal, podem oferecer novas oportunidades terapêuticas para o tratamento da SN em humanos.

**Descritores:** Síndrome nefrótica idiopática, modelo animal, doxorubicina, leucócitos, CD18, CD80, estresse oxidativo.

## **Abstract**

The nephrotic syndrome (NS) is characterized by proteinuria, hypoalbuminemia and generalized edema. Although the pathophysiological mechanisms of NS remain unknown, studies with animal models and patients have associated the NS with changes in immune response. The present study investigated the expression of molecules related to cell activation and migration, CD18 and CD80 respectively, on peripheral blood leukocytes as well the leucogram profile and renal production of reactive oxygen species in rats with NS induced by Doxorubicin. Male Wistar rats, 250-300 grams, were divided into two groups: animals receiving intravenous injection of doxorubicin (7.5 mg / kg) (DOX = 32) and control animals that received saline (CON = 32). Animals of each group were euthanized at days 7, 14, 21 and 28 after injection. Twenty four hour urine samples and blood samples were collected for biochemical and immunological analyzes. The phenotypic analysis of leukocytes was performed by flow cytometry. The expression of CD18 in monocytes, CD4 +, CD8 + and NK cells and the expression of CD80 in monocytes were measured. In renal tissue samples, the oxidative activity was evaluated by malondialdehyde (MDA) production and antioxidant activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase. The DOX group animals showed temporary alterations in the leucogram, in monocytes, neutrophils and lymphocytes. There was significant increase in cellular CD18 expression in cytotoxic T lymphocytes, NK cells and monocytes as well as raised CD80 expression on peripheral blood monocytes. The increased production of reactive oxygen species in renal tissue of DOX group animals was positively correlated with the CD80 expression on monocytes and serum levels of creatinine, indicating a link between increased activation of peripheral monocytes and kidney damage in animals with NS. The results suggest that phagocytic and cytotoxic cells are preferentially recruited from peripheral blood to the focus of the injury, which could contribute to injury in the animal model of doxorubicin induced NS. Additional studies analyzing the effects of the integrins and co-stimulatory molecules blockade as well as migratory neutrophil response and the renal oxidative damage may offer new opportunities for therapeutic treatment in humans NS.

**Keywords:** Idiopathic nephrotic syndrome, animal model, doxorubicin, leukocyte, CD18, CD80, oxidative stress.

## Introdução

A síndrome nefrótica (SN) é uma glomerulopatia bastante comum em crianças e adultos, apesar de sua fisiopatologia permanecer ainda desconhecida (Abrantes *et al.*, 2004; Souto *et al.*, 2008; D`agati *et al.*, 2011). Diversos estudos evidenciaram o envolvimento do sistema imune na SN, com alterações na resposta mediada por células TCD8<sup>+</sup> (Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001-b) bem como a participação de macrófagos (Wang *et al.*, 2007; CAO *et al.*, 2010; Benz *et al.*, 2010) e células NK (Musial *et al.*, 2010) na patogênese da nefropatia. Na SN a lesão renal também pode estar relacionada ao dano oxidativo tecidual, por meio de espécies reativas de oxigênio (Zima *et al.*, 1998; Ghodake *et al.*, 2010; Takiue *et al.*, 2012). Estudos recentes mostraram alterações na produção de espécies reativas de oxigênio no plasma de pacientes com SN (Ghodake *et al.*, 2010). Produtos da peroxidação lipídica foram associados à lesão renal induzida pela doxorubicina em modelo animal de SN (Zima *et al.*, 1998; Boonsanit *et al.*, 2006; Takiue *et al.*, 2012). Algumas pesquisas apontam também para as alterações na atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase, tanto no plasma de pacientes (Ghodake *et al.*, 2010) quanto no tecido renal de animais com SN (Boonsanit *et al.*, 2006; Takiue *et al.*, 2012).

Tendo em vista a participação de células fagocíticas e citotóxicas no desenvolvimento da lesão renal na SN (Lama *et al.*, 2002; Benz *et al.*, 2010; Musial *et al.*, 2010) e por ser conhecida a participação dos macrófagos na geração de radicais livres (Berens *et al.*, 1998; Akyoul *et al.*, 2007) é provável que, alterações na ativação e migração destas células possam influenciar o curso da SN. Durante a ativação das células T são necessários dois tipos de sinais, a ligação entre o receptor das células T (TCR) com o antígeno apresentado pelo complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e, em seguida, o sinal denominado coestimulatório, entre a molécula CD28 presente na superfície das células T e a molécula CD80 (B7-1) na superfície das células apresentadoras de antígeno (Engel *et al.*, 1994; Sayegh e Turka, 1995; Fleischer *et al.*, 1996). No mecanismo de migração celular, as integrinas dos leucócitos e as moléculas de adesão intercelular desempenham papel essencial na fixação leucocitária às células-alvo e à matriz extracelular (Springer, 1994; Gahmberg, 1997). Após estímulos lesivos, sinais quimiotáticos advindos do sítio inflamatório ativam as integrinas nos leucócitos e induzem a fixação e rolamento dos mesmos através da parede vascular (Penberthy *et al.*, 1997).

Modelos experimentais têm contribuído para a compreensão da fisiopatologia da SN (Eddy *et al.*, 2012), dentre eles, ressalta-se o modelo de indução da SN pelo quimioterápico doxorubicina. Em roedores, este fármaco induz lesões renais semelhantes às observadas em pacientes com SN (Wang *et al.*, 2000; LEE e Harris, 2011). O presente estudo investigou a expressão da molécula coestimulatória CD80 e da integrina CD18 em leucócitos do sangue periférico associada às alterações no leucograma, bem como na atividade oxidativa renal de ratos com SN induzida pela doxorubicina.

## Metodologia

### Animais

Foram utilizados sessenta e quatro ratos *Wistar*, machos, com 6 a 8 semanas de idade e peso entre 250 e 300 gramas no início do experimento. Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo – Cebio - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil e mantidos em condições ambientais controladas, com ciclos claro/escuro de 12-h e livre acesso à água e alimentação (ração padrão para roedores - Nuvital, Nuvilab, Brasil). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) - protocolo 99/2009.

### Indução da Nefropatia

Os animais foram inicialmente divididos em dois grupos: grupo DOX (n=32), que recebeu dose única, na veia da cauda, de cloridrato de doxorubicina (7,5mg/kg, Doxolem - Farmaclinic, Belo Horizonte, Brasil) e o grupo CON (n=32), que recebeu, nas mesmas condições, solução salina (Rangan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2003). Animais de cada grupo foram eutanasiados nos dias 7, 14, 21 e 28 após a injeção, conforme a evolução da doença descrita em estudos anteriores (Rangan *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2003). Amostras sanguíneas para análises bioquímicas e imunológicas foram obtidas por punção cardíaca, sob anestesia (ketamina:xylazina, 60:8 mg/kg de peso corporal). Em seguida os animais foram perfundidos com salina, via artéria aorta, para posterior remoção dos rins, sendo então eutanasiados por exsanguinação.

## Avaliação da Função Renal e Eutanásia

Para avaliar a função renal, amostras urinárias de 24 horas foram coletadas, em gaiolas metabólicas, nos dias 0 (antes da injeção), 7, 14, 21 e 28 (após a injeção) e amostras sanguíneas foram obtidas por punção cardíaca no momento da eutanásia. Para análise das amostras utilizou-se o analisador automático Cobas Mira Plus – Roche, AG, Switzerland e kits comercialmente disponíveis para dosagens de creatinina (K067) e albumina (078) - Bioclin-Quibasa, Belo Horizonte, Brasil. Nos dias 7, 14, 21 e 28 animais de cada grupo foram anestesiados (ketamina - 60mg/Kg e xylazina - 8 mg/kg), para a coleta de sangue por punção cardíaca e em seguida foram eutanasiados por exsanguinação.

## Contagem global e diferencial de leucócitos do sangue periférico

Para realização do leucograma global foi utilizado o contador automático de células CELM CC-550® (CELM, Barueri, SP, Brasil). O balanço das diferentes subpopulações leucocitárias (leucograma diferencial) foi realizado pela análise do esfregaço sanguíneo, após coloração com Giemsa e May-Grunwald, utilizando-se microscópio óptico em aumento de 100x (Olympus – BX41 TF - Japan).

## Análise de marcadores de superfície em leucócitos circulantes, por citometria de fluxo

Para a análise dos marcadores de superfície utilizou-se o método de imunofluorescência recomendado pela Becton Dickinson (BD, San Diego, CA - USA) e modificado como a seguir: 50 uL de amostra de sangue heparinizado foram incubados, no escuro, por 30 minutos e à temperatura ambiente, com 5 uL de anticorpo monoclonal (mAbs) específico para marcadores de superfície celular e conjugado ao fluorocromo ficoeritrina-PE, isotiocianato de fluoresceína-FITC ou biotina (TAB. 1). Após o período de incubação os eritrócitos foram lisados (100 uL de solução de lise - Optilyse-B, Immunotec-USA) por 5 minutos, seguido da adição de 900uL de água destilada e reincubação por 10 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de tampão PBS (phosphate-buffered saline - 0,15 mol/L cloreto de sódio; 0,01 mol/L fosfato de sódio tampão - pH 7,4) contendo 0,01% de azida sódica.

Os anticorpos biotinilados foram revelados utilizando-se streptavidina-FITC (BD – Pharmingen TM), conforme descrito por Wu e colaboradores (2007). A aquisição dos dados

foi realizada com o instrumento FACScan (Becton-Dickinson, USA). O programa Cell-Quest foi utilizado para a aquisição dos dados, identificação das populações celulares de interesse e determinação do valor percentual de populações e subpopulações celulares. A fenotipagem teve como objetivo a análise de linfócitos T totais (células CD3+); linfócitos T auxiliares (células CD3+CD4+); linfócitos T citotóxicos (células CD3+CD8+), linfócitos T auxiliar e T citotóxico ativados, (células CD4+CD18+ e CD8+CD18+) respectivamente, monócitos ativados (células  $SSC^{int}CD4^{low+}CD18+$  e  $SSC^{int}CD4^{low+}CD80+$ ) bem como células com características sugestivas de linfócitos NK ativados (células  $SSC^{int}CD8^{low+}CD18+$ ).

Foram utilizados gráficos de distribuição pontual de tamanho versus granulosidade (FSC x SSC) para análise do balanço das principais populações leucocitárias, com demarcação da região correspondente à subpopulação de interesse (neutrófilos, linfócitos ou monócitos). Dentro de cada uma dessas subpopulações, quantificou-se o percentual de células fluorescentes, utilizando-se gráficos de fluorescência-1 versus fluorescência-2 (FL1xFL2). A avaliação da expressão de CD18 e CD80 na superfície celular baseou-se na determinação da intensidade média de fluorescência (MIF) emitida pela excitação do fluorocromo associado aos anticorpos monoclonais ligados às moléculas de interesse na superfície celular. Inicialmente, as populações celulares foram selecionadas em gráficos de distribuição pontual em função da granulosidade celular e fluorescência 2 (SSC x FL2), em seguida foram utilizados histogramas de fluorescência 2 (FL2) para determinar a expressão de CD18 e CD80, na superfície destas células.

TABELA 1

Relação dos anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos utilizados na análise específica de moléculas de superfície em subpopulações leucocitárias

<b>Anticorpos monoclonais</b>	<b>Clone e marca</b>	<b>Especificidade</b>
Anti-CD3 de rato conjugado com FITC	clone G4.18 - BD	Linfócitos T
Anti-CD4 de rato conjugado com PE	clone OX-35 - BD	Subpopulações de Linfócitos T auxiliares e monócitos ( $CD4^{low}$ )
Anti-CD8 de rato conjugado com PE	Clone OX-8 - BD	Subpopulações de Linfócitos T citotóxico e Linfócitos com fenótipo sugestivos de células NK ( $CD8^{low}$ )
Anti-CD80 de rato conjugado com biotina	Caltag	Molécula co-ativadora
Anti-CD18 de rato conjugado com biotina	Caltag	Integrina relacionada à migração celular

## Status Redox

Imediatamente após a eutanásia os rins de cada animal foram removidos e uma parte congelada em nitrogênio líquido e armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após o descongelamento os fragmentos renais foram pesados, macerados e homogeneizados com PBS (phosphate-buffered saline - 0,15 mol/L cloreto de sódio; 0,01 mol/L fosfato de sódio tampão - pH 7,4). O *status* redox foi avaliado conforme metodologia empregada por Barreto e colaboradores. Resumidamente, os níveis teciduais de TBARs, substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, que inclui o Malondialdeído (MDA) foram determinados por reação com o ácido tiobarbitúrico em condições ácidas, a  $90^{\circ}\text{C}$ , por 90 minutos e analisados em leitor de microplacas a 532 nm. Determinou-se a atividade da enzima catalase pelo decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio, em espectrofotômetro a 240nm. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi calculada com base na inibição da auto-oxidação do pirogolol em 50%, com a absorbância determinada em leitor de microplacas a 420 nm. A concentração de proteína de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina de soro bovino como padrão (Barreto *et al.*, 2011).

## Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como média +/- erro padrão da média, com nível de significância de 95% ( $<0,05$ ). Análise de Variância (ANOVA), com post-hoc de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann-Whitney foram usados para múltiplas comparações intragrupo. A diferença entre os grupos foi verificada por teste t de Student ou teste de Mann-Whitney, de acordo com a normalidade dos dados. A associação entre variáveis foi verificada pelo teste de correlação de Pearson. As análises foram realizadas usando o SPSS para *Windows* (Statistical Package for Social Sciences, IBM Inc., USA) versão 17.0. Considerou-se grupo controle único quando não houve diferença intragrupo significativa nos animais injetados com salina.

## Resultados

### Disfunção renal

Os resultados bioquímicos (TAB. 2) mostraram que os animais que receberam injeção de doxorrubicina desenvolveram a lesão renal, evidenciada por alterações bioquímicas precoces do tipo albuminúria e aumento na relação albumina/creatinina na urina ( $p < 0,05$ ), como previamente descrito (Pippin *et al.*, 2009; Jeansson *et al.*, 2009).

### Alterações no percentual de leucócitos do sangue periférico

Na fase inicial da doença - (7º dia após a injeção) - ocorreu redução significativa na contagem global de leucócitos, no grupo DOX em relação ao grupo CON (GRAF. 1), com redução percentual nas populações de monócitos e neutrófilos (TAB. 2). Pela citometria de fluxo, observou-se aumento significativo no percentual de linfócitos T citotóxicos ( $CD3^+CD8^+$ ) e também no percentual de linfócitos T auxiliares ( $CD3^+CD4^+$ ) (TAB. 2). Na Fase Intermediária da doença - (14º dia após a injeção) - o grupo DOX demonstrou aumento na quantidade global de leucócitos (GRAF. 1), com elevação nos percentuais de monócitos e neutrófilos e redução no percentual de linfócitos (TAB.2). Na Fase Tardia da doença - (21º e 28º dia após a injeção) - a quantidade total de leucócitos ainda permaneceu aumentada no grupo DOX em relação ao grupo CON, contudo sem diferença significativa (GRAF. 1). O percentual de monócitos e linfócitos no sangue periférico dos animais do grupo DOX aumentou no 21º dia e novamente reduziu no 28º dia, enquanto o percentual de neutrófilos permaneceu aumentado a partir do 14º até o 28º dia (TAB. 2).

GRÁFICO 1 - Leucometria global de ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina, em diferentes fases da doença. (\*) = Alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ )

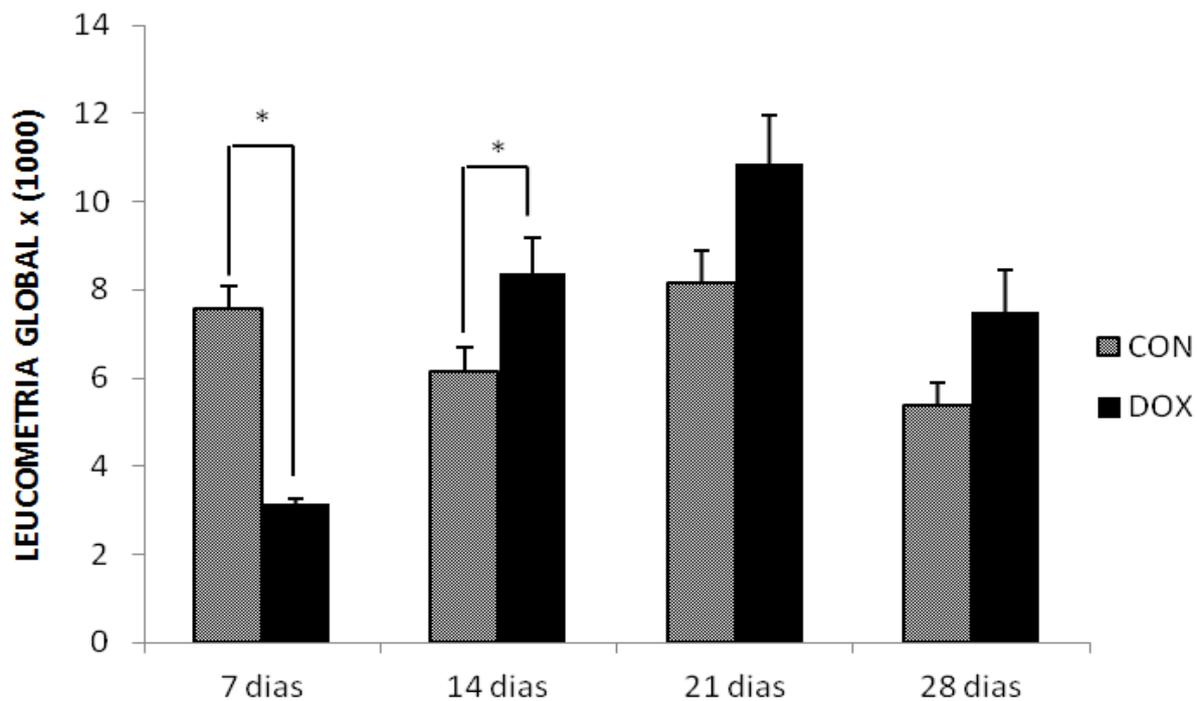


TABELA 2

Resultados das análises bioquímicas, imunológicas e do *status redox* de ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina. (\*) = Alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Grupo CON representa a média de todos os tempos (7, 14, 21 e 28 dias)

	Grupo controle	Grupo doxorubicina			
		T-07	T-14	T-21	T-28
	Média (EP)	Média (EP)	Média (EP)	Média (EP)	Média (EP)
Albuminúria (mg/L)	62,92 (18,09)	122,66 (23,17) *	102,43 (16,57) *	87,05 (3,43) *	79,06 (7,90) *
Razão Albumina / Creatinina urina (mg/g)	0,39 (0,07)	0,92 (0,18) *	1,05 (0,35) *	1,09 (0,41) *	0,98 (0,11) *
Monócitos	5,19 (0,52)	4,14 (0,70) *	7,20 (2,40)	8,10 (0,76) *	3,20 (0,78) *
Neutrófilos	12,35 (1,16)	9,88 (1,29) *	34,80 (3,16) *	23,70 (3,94) *	33,70 (4,25) *
Linfócitos	67,64 (2,45)	84,44 (1,41) *	57,30 (4,59) *	81,25 (2,23) *	62,50 (4,40) *
Eosinófilos	0,15 (0,06)	0,20 (0,13)	0,10 (0,10)	0,30 (0,21)	0,30 (0,21)
Basófilos	0,11 (0,11)	0,11 (0,11)	0,70 (0,30)	0,20 (0,13)	0,30 (0,21)
LT CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> <sup>(a)</sup>	45,94 (1,70)	79,92 (1,92) *	57,53 (2,03)	47,93 (4,30)	47,86 (3,52)
LT CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> <sup>(a)</sup>	13,41 (0,55)	16,19 (1,00) *	12,09 (1,74)	12,70 (0,92)	13,40 (0,88)
LT CD4 <sup>+</sup> CD18 <sup>+</sup> <sup>(b)</sup>	10,72 (0,52)	11,54 (1,18)	12,43 (0,57)	12,65 (1,60)	12,02 (1,07)
MDA (mmol/mg proteína)	2,18 (0,11)	3,32 (0,51) *	2,62 (0,40)	2,09 (0,52)	1,80 (0,22)
Catalase ( $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ proteína).	4,61 (0,37)	5,83 (1,63)	4,97 (0,89)	4,94 (0,91)	4,21 (0,47)
SOD (U/mg proteína)	0,39 (0,02)	0,36 (0,04)	0,32 (0,02)	0,42 (0,02)	0,38 (0,02)

MDA = Malondialdeído; SOD = Superóxido Dismutase / <sup>(a)</sup> Percentual de células marcadas / <sup>(b)</sup> Intensidade Média de Fluorescência

TABELA 3

Correlações entre o *status redox* do tecido renal, parâmetros de função renal e a resposta imune em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina. (\*) = Alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ )

	MDA		Catalase		SOD	
	r	p	r	p	r	p
SOD	0,213	0,241	0,603	<0,001 *	-	-
Catalase	0,382	0,031 *	-	-	-	-
Creatinina Plasmática	0,535	0,009 *	-0,110	0,322	-0,246	0,211
Creatinina Urinária	0,170	0,225	-0,183	0,202	0,453	0,051
Albuminúria	0,124	0,277	0,059	0,385	0,094	0,361
Monócitos CD80 (MIF)	0,411	0,015 *	0,302	0,052	-0,091	0,356
Monócitos CD18 (MIF)	0,254	0,110	0,231	0,123	-0,171	0,249

\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle; MDA = Malondialdeído; SOD = Superóxido Dismutase; MIF = Intensidade Média de Fluorescência

#### Alterações fenotípicas em leucócitos do sangue periférico

Em relação ao estado de ativação celular: *Na Fase Inicial* - as análises por intensidade média de fluorescência (MIF) demonstraram que nos animais do grupo DOX em relação ao grupo CON houve aumento na expressão das integrinas CD18 em linfócitos T citotóxicos (GRAF. 2b) e nas células com fenótipo sugestivo de células NK (GRAF. 3b). Nesta fase, os monócitos dos animais do grupo DOX também evidenciaram aumento na expressão das integrinas CD18 e das moléculas coestimulatórias CD80 (GRAF. 4a e 4b) respectivamente. *Na Fase Intermediária* - animais do grupo DOX comparados ao grupo CON, apresentaram aumento significativo no percentual de linfócitos T citotóxicos positivos para CD18 (GRAF. 2a). Também ocorreu aumento no percentual de células sugestivas de NK positivas para a integrina CD18 (GRAF. 3b). Nesta fase a intensidade média de fluorescência para CD18 nos linfócitos T citotóxicos e nas células sugestivas de NK continuou aumentada (GRAF. 2b e 3b) respectivamente. Nos monócitos a expressão de CD18 continuou aumentada e a expressão de CD80 reduziu um pouco, mas ainda manteve diferença significativa entre os

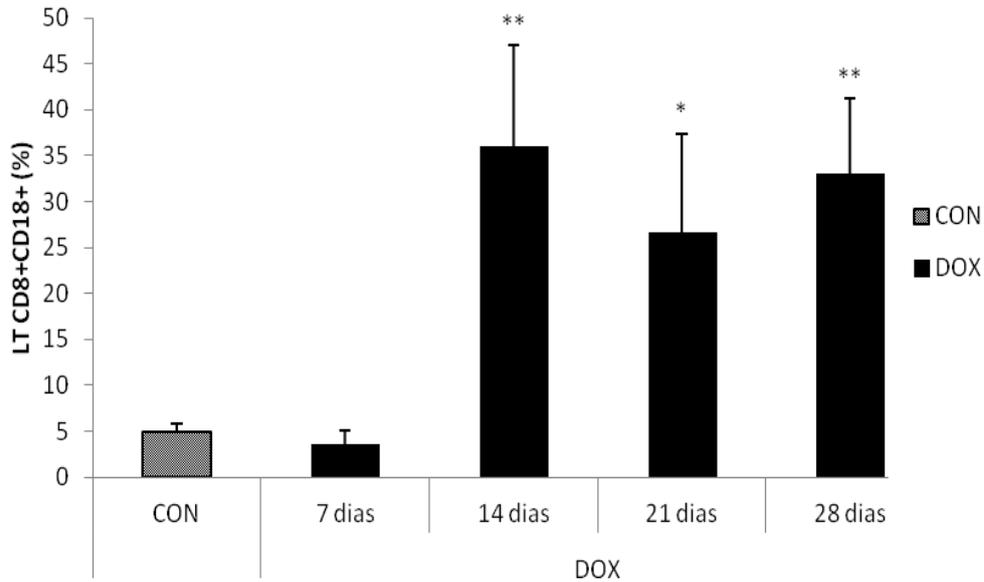
animais do grupo DOX e CON. *Na Fase Tardia* - manteve-se o aumento na intensidade de expressão de CD18 bem como no percentual de células expressando estas integrinas entre os linfócitos T citotóxicos (GRAF.2a e 2b) e as células sugestivas de NK (GRAF. 3a e 3b). No 21º dia ocorreu ligeira redução na expressão de CD18 e de CD80 nos monócitos, quando comparado às fases iniciais da doença, contudo ainda com valores significativamente maiores do que no grupo CON. No 28º dia não se percebeu mais alterações na expressão dessas moléculas na superfície dos monócitos (GRAF. 4a e 4b). Não ocorreram alterações significativas na expressão das integrinas CD18 nos neutrófilos do sangue periférico dos animais do grupo DOX em relação ao grupo CON (GRAF. 5a e 5b), nas diferentes fases da doença.

#### Aumento da Peroxidação Lipídica no tecido renal

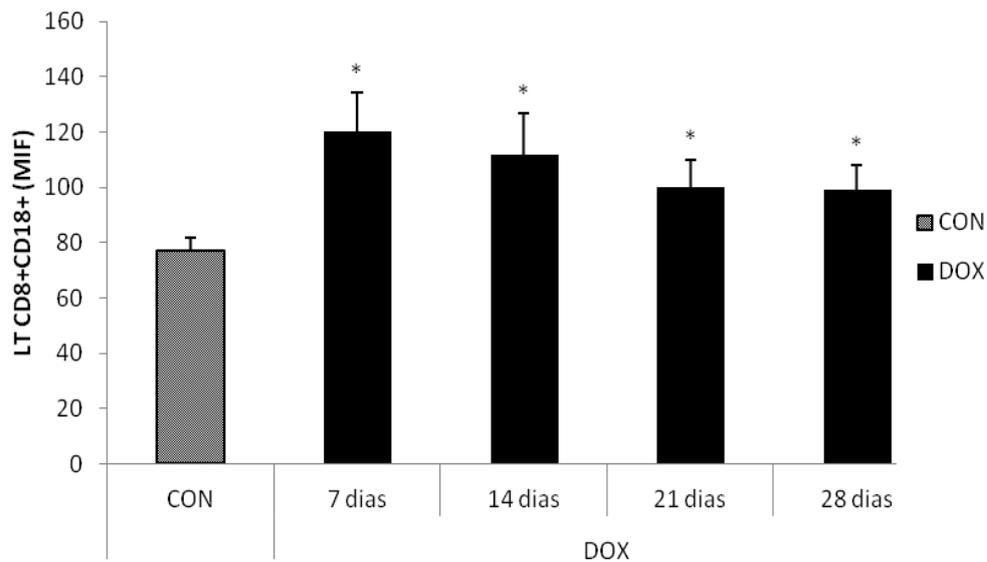
Na fase inicial da doença houve aumento significativo na peroxidação lipídica (MDA) no tecido renal dos animais do grupo DOX em relação ao grupo CON, com redução progressiva na concentração de MDA no tecido renal durante a progressão da doença. Não houve alteração significativa na função antioxidante do tecido renal, pela atividade das enzimas SOD e catalase, entre os grupos DOX e CON (TAB. 2). Análise de correlação demonstrou correlação positiva entre a concentração renal de MDA e parâmetros como atividade da catalase no tecido renal, concentração de creatinina plasmática e expressão de CD80 em monócitos do sangue periférico. Ocorreu, ainda, correlação positiva entre a atividade das enzimas SOD e catalase (TAB. 3).

GRÁFICOS 2 (a, b) - Percentual (a) e intensidade de expressão (b) de CD18 na superfície de Linfócitos TCD8<sup>+</sup> do sangue periférico de ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina, em diferentes fases da doença. (\*) e (\*\*) = Alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$  respectivamente). Grupo CON representa a média de todos os tempos (7, 14, 21 e 28 dias)

(a)

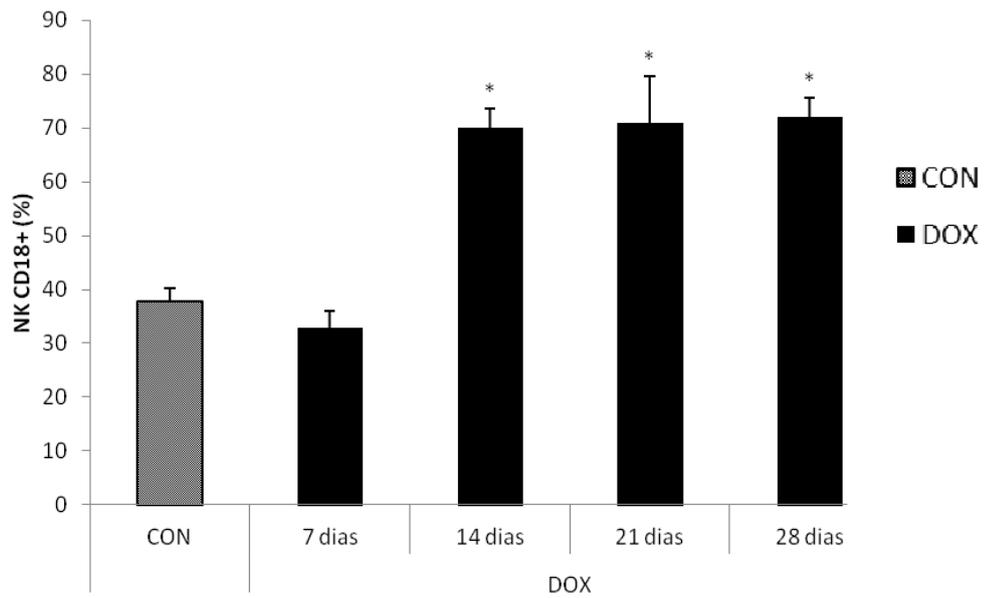


(b)

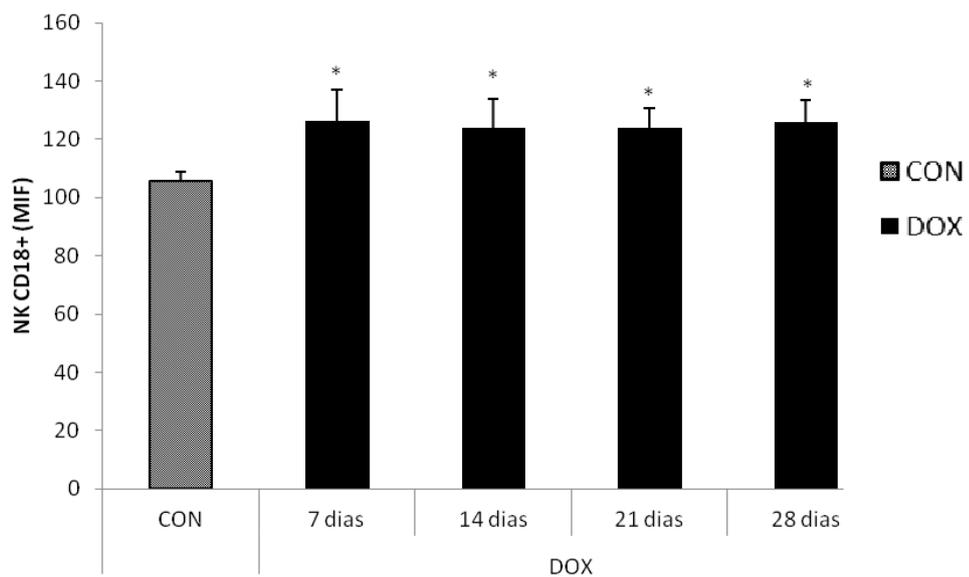


GRÁFICOS 3 (a, b) - Percentual (a) e intensidade de expressão (b) de CD18 na superfície de células sugestivas de NK ( $CD8^{Low}$ ) do sangue periférico de ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina, em diferentes fases da doença. (\*) = Alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Grupo CON representa a média de todos os tempos (7, 14, 21 e 28 dias)

(a)

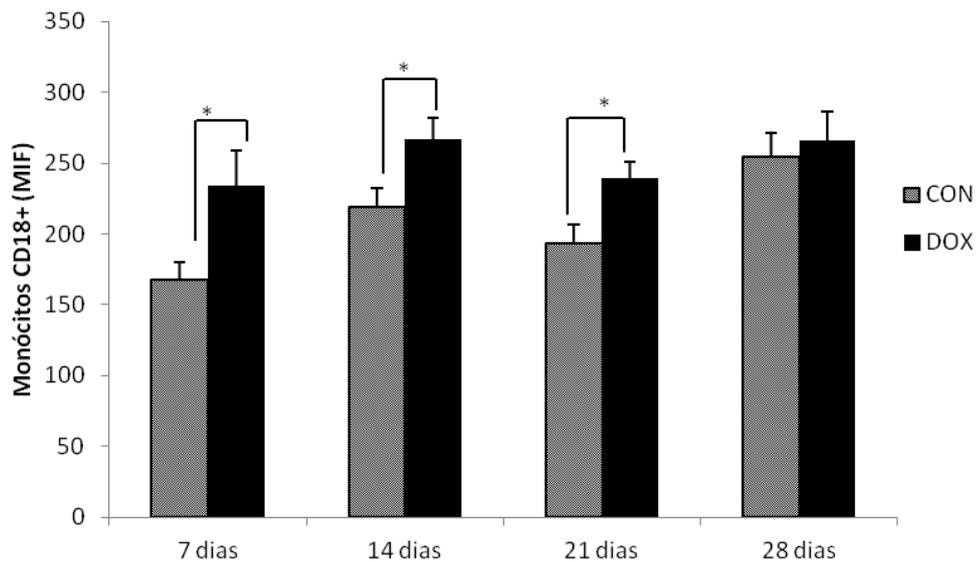


(b)

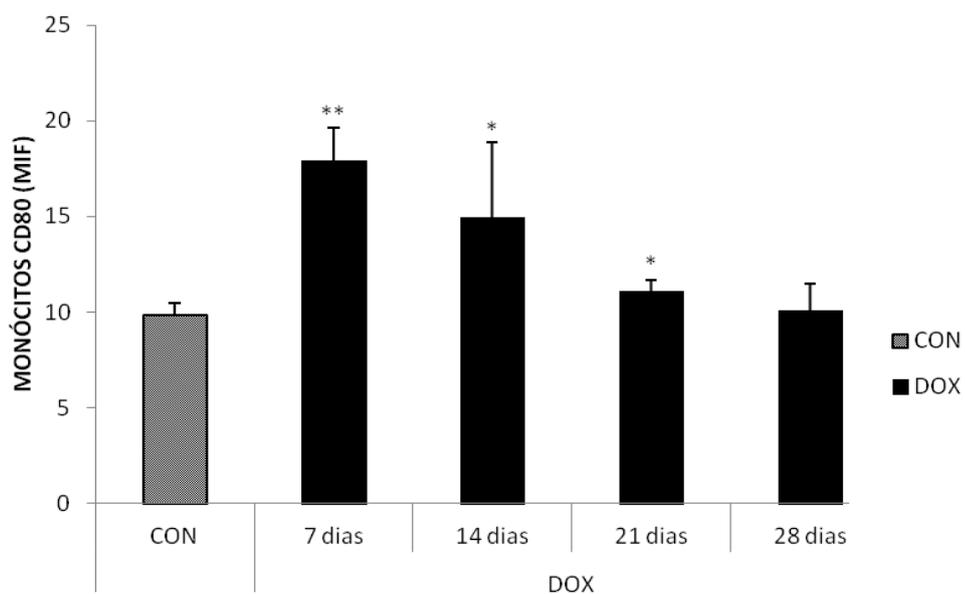


GRÁFICOS 4 (a, b) - Intensidade de expressão de CD18 (a) e CD80 (b) na superfície de Monócitos do sangue periférico de ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina, em diferentes fases da doença. (\*) e (\*\*) = Alterações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). No gráfico b, o grupo CON representa a média de todos os tempos (7, 14, 21 e 28 dias)

(a)

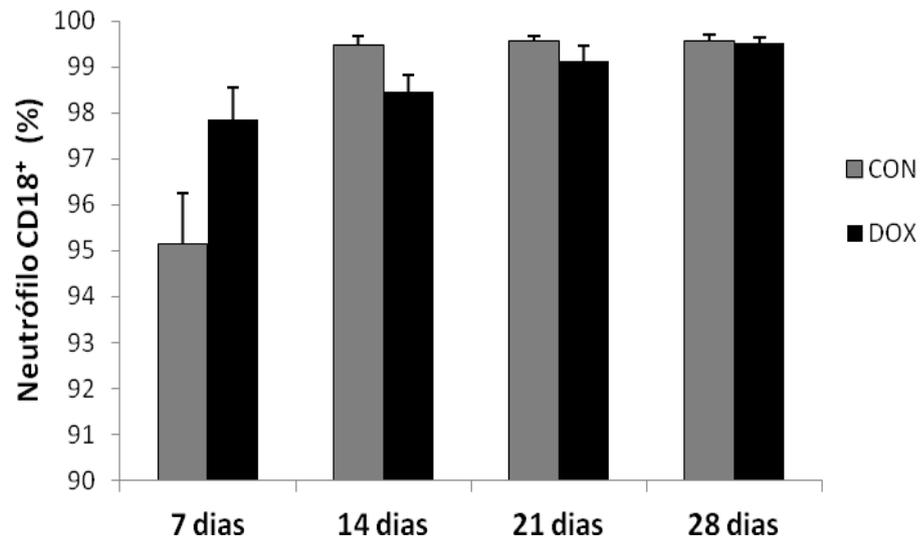


(b)

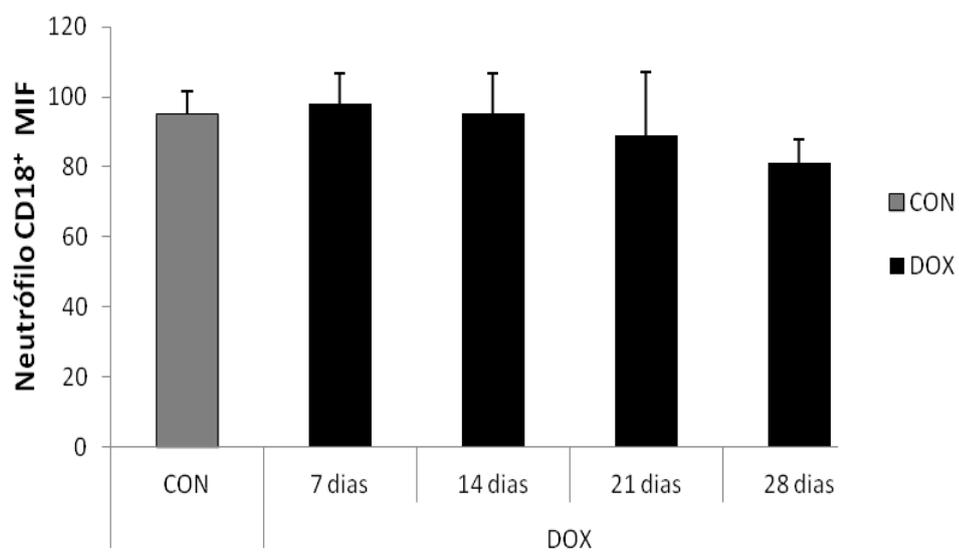


GRÁFICOS 5 (a, b) - Percentual (a) e intensidade de expressão (b) de CD18 na superfície de Neutrófilos do sangue periférico de ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina, em diferentes fases da doença.

(a)



(b)



## Discussão

Modelos experimentais contribuem com a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e propostas terapêuticas para a síndrome nefrótica (SN) (Lee *et al.*, 2006; Eddy *et al.*, 2012), como o modelo de nefropatia pelo quimioterápico doxorubicina (Wang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006; Lee e Harris, 2011). No presente estudo, animais que receberam injeção de doxorubicina apresentaram albuminúria e aumento na razão albumina/creatinina, conforme já descrito na literatura (Bertani *et al.*, 1982; Pippin *et al.*, 2009). A albuminúria é um marcador bioquímico primário da lesão renal (Thomas *et al.*, 1999) e constitui um bom indicador da SN no modelo animal (Pippin *et al.*, 2009). A razão albumina/creatinina na urina também é utilizada como parâmetro de avaliação renal (Chen *et al.*, 1995; Jeansson *et al.*, 2009). Neste estudo, animais que receberam injeção de doxorubicina demonstraram ainda alterações na expressão de moléculas relacionadas à ativação (CD80) e migração (CD18) celular em leucócitos do sangue periférico, bem como aumento na concentração de MDA no tecido renal, sugestivo de maior dano oxidativo tecidual, o qual manteve correlação positiva com a expressão de CD80 nos monócitos e com os níveis plasmáticos de creatinina.

Durante o mecanismo de ativação das células T, são necessários dois tipos de sinais, a ligação entre o receptor das células T (TCR) com o antígeno apresentado pelo complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e, em seguida, o sinal denominado coestimulatório, entre a molécula CD28 presente na superfície das células T e a molécula CD80 na superfície das células apresentadoras de antígeno (Engel *et al.*, 1994; Sayegh e Turka, 1995; Fleischer *et al.*, 1996). A molécula CD80, também denominada B7-1, é uma proteína transmembrana presente na superfície das células apresentadoras de antígeno e que possuem afinidade pelas moléculas CD28 presentes na superfície dos linfócitos T (Engel *et al.*, 1994; Sayegh e Turka, 1995; Fleischer *et al.*, 1996).

As integrinas e as moléculas de adesão intercelular (ICAM) desempenham papel essencial na fixação dos leucócitos às células-alvo e à matriz extracelular (Springer, 1994; Gahmberg, 1997). As integrinas são glicoproteínas transmembranas do tipo ligante-específicas, amplamente distribuídas na superfície celular e com afinidade por proteínas da matriz extracelular, ligantes solúveis e contra-receptores nas células endoteliais (Ruoslahti, 1991; Diamond e Hynes, 1992; Karim e Tommy, 2000). Formam heterodímeros por ligações covalentes entre as subunidades alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) e constituem quatro famílias (Humphries,

*et al.*, 2006). A família beta 2 das integrinas é constituída pela subunidade beta 2 ( $\beta 2$ ), denominada (CD18), em combinação com uma das quatro subunidades alfa, ou seja,  $\alpha L$  (CD11a),  $\alpha M$  (CD11b),  $\alpha X$  (CD11c) ou  $\alpha D$  (CD11d) (Springer, 1994). Após estímulos lesivos sinais quimiotáticos ativam as integrinas e induzem a fixação e rolamento dos leucócitos através da parede vascular (Penberthy *et al.*, 1997). As integrinas beta-2 se ligam às ICAM na superfície das células endoteliais (LI *et al.*, 1995; Ricevuti, 1995). Citocinas e quimiocinas aumentam a expressão de ICAM-1 na superfície do endotélio vascular e ativam as integrinas na superfície dos leucócitos, induzindo fixação e extravasamento celular (Springer, 1994; Carr *et al.*, 1996). Assim, o aumento na expressão das integrinas está diretamente relacionado aos mecanismos de ativação e migração celular (Cavalcanti, 1999).

No presente estudo, na fase inicial da doença, ocorreu redução na contagem global de leucócitos no sangue periférico dos animais do grupo DOX em relação ao grupo CON. Nessa fase o leucograma diferencial evidenciou redução nas subpopulações de monócitos e neutrófilos no sangue periférico. Tais alterações podem estar relacionadas ao efeito mielossupressor agudo do fármaco, que induz leucopenia e neutropenia reversível (Adriamycin, 2012). Outra possibilidade para a redução dessas populações leucocitárias seria o aumento precoce na ativação celular e na capacidade migratória destas células, evidenciadas no presente estudo, pela maior expressão da molécula coestimuladora CD80 e da integrina CD18, principalmente no 7º dia após a injeção da doxorrubicina.

O aumento na concentração de MDA no tecido renal dos animais do grupo DOX na fase inicial da doença sugere um maior dano oxidativo tecidual. Tendo em vista o envolvimento das células fagocíticas e citotóxicas no desenvolvimento da lesão renal na SN (Lama *et al.*, 2002; Benz *et al.*, 2010; Musial *et al.*, 2010), bem como a participação dos macrófagos e neutrófilos na geração de radicais livres (Berens *et al.*, 1998; Akyoul *et al.*, 2007; Bertelli *et al.*, 2010) é provável que, alterações no estado de ativação e no comportamento migratório dos leucócitos possam influenciar o curso da SN, sendo possível a participação destas células no dano oxidativo renal e conseqüentemente na indução da albuminúria na fase inicial da doença. Pacientes com SN apresentaram aumento na produção de espécies reativas de oxigênio no plasma, associado à redução na quantidade de albumina plasmática (Ghodake *et al.*, 2010). Em modelo animal de SN induzida pela doxorrubicina, foi relatado aumento na produção das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARs) (Zima *et al.*, 1998), associado à redução na atividade da catalase no tecido renal (Boonsanit *et*

*al.*, 2006). Recentemente, também em modelo animal de SN induzida pela doxorrubicina, ocorreu associação entre a albuminúria e a peroxidação lipídica no tecido renal (Takiue *et al.*, 2012). Os resultados do presente estudo demonstram picos tanto na produção de MDA quanto na excreção urinária de albumina no 7º dia após a injeção da doxorrubicina, sugerindo assim a possível participação das espécies reativas de oxigênio na alteração inicial da membrana de filtração glomerular.

O dano oxidativo renal também foi associado à menor atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (Boonsanit *et al.*, 2006; Ghodake *et al.*, 2010; Takiue *et al.*, 2012). Em plasma de pacientes com SN, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio foi relacionado à redução na atividade da enzima SOD e na capacidade antioxidante total do plasma (Ghodake *et al.*, 2010). No estudo de Boonsanit e colaboradores, em ratos com SN induzida pela doxorrubicina, ocorreu aumento nos níveis plasmáticos de TBARs e redução nos níveis renais da enzima catalase (Boonsanit *et al.*, 2006). A esclerose glomerular, a albuminúria e a peroxidação lipídica no tecido renal foram mais intensas em camundongos deficientes para a enzima catalase do que nos camundongos selvagens, após injeção de doxorrubicina (Takiue *et al.*, 2012). Contudo, no presente estudo o aumento nos níveis renais de MDA, não induziu alterações significativas na atividade da SOD nem da catalase no tecido renal. Além disso, houve correlação positiva entre a atividade da SOD e da catalase no tecido renal dos animais do grupo DOX, sugerindo, portanto, que a maior produção do MDA não foi devido à redução na atividade antioxidante do tecido renal.

Ainda que os achados do presente estudo indiquem a possível participação dos monócitos/macrófagos no dano oxidativo renal esta situação deve ser avaliada com cautela, uma vez que, apesar de ter ocorrido aumento na ativação dos monócitos no sangue periférico, células reconhecidamente produtoras de espécies reativas de oxigênio, e apesar da literatura indicar a participação de espécies reativas de oxigênio na patogênese da SN (Akyol *et al.*, 2007; Ghodake *et al.*, 2010) não se deve deixar de considerar o mecanismo de ação da doxorrubicina, que também pode induzir a formação de espécies reativas de oxigênio no tecido renal (Barbey *et al.*, 1989), favorecendo a lesão tecidual inicial. Entretanto, também não podemos subestimar a participação da resposta imune e especialmente dos monócitos/macrófagos no mecanismo de lesão renal, uma vez que algumas investigações tem demonstrado que o fenótipo do macrófago, seja M1 ou M2, apresenta relação direta com a piora ou a melhora, respectivamente, das lesões renais em modelo animal de SN induzida pela

doxorubicina (Wang *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2010). Além disso, a maior infiltração de macrófagos no tecido renal em crianças com SN esta relacionada à piora do prognóstico da doença (Benz *et al.*, 2010).

No presente estudo as diferenças na expressão de CD80 e CD18 nos monócitos do sangue periférico foram maiores nas duas primeiras semanas e não apresentaram significância estatística na quarta semana após a injeção. Essa dinâmica de ativação dos monócitos no sangue periférico corrobora alguns trabalhos que evidenciaram acúmulo inicial de macrófagos no tecido renal de animais com SN induzida pela doxorubicina (Vielhauer *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006). Além disso, em modelo animal de SN induzida pelo aminonucleosídeo de puromicina (PAN), houve correlação positiva entre a expressão de CD18/ICAM-1 no tecido renal e o infiltrado local de macrófagos, sendo a cinética de infiltração celular semelhante à cinética de expressão das integrinas no tecido renal, ou seja, intensa na 2ª semana, com retorno aos valores normais na 7ª semana após a injeção (Fernandez *et al.*, 2003).

O aumento no percentual de linfócitos no sangue periférico na fase inicial da doença, em animais injetados com a doxorubicina, ocorreu tanto para os linfócitos T citotóxicos (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) quanto para os T auxiliares (TCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), contudo, o aumento na expressão das integrinas CD18 foi observado nos linfócitos T citotóxicos e nas células sugestivas de NK, mas não nos linfócitos T auxiliares. Além disso, a expressão de CD18 na superfície destas células permaneceu aumentada, durante todo o período do experimento, o que sugere maior atividade migratória para os linfócitos T citotóxicos e células NK, especialmente após o 14º dia, quando ocorreu aumento tanto no percentual de células expressando CD18, quanto na intensidade de expressão desta integrina na superfície celular. Estes resultados estão de acordo com estudos que sugeriram alterações na atividade das células NK (Lama *et al.*, 2002; Musial *et al.*, 2010) e linfócitos T citotóxicos em pacientes com SN (Herrod *et al.*, 1983; Fiser *et al.*, 1991; Lama *et al.*, 2002) e em modelo animal de SN induzida pela doxorubicina (Wang *et al.*, 2000; 2001-b) e, ainda, com o estudo que associou o grau de proteinúria com a intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear e a expressão renal da molécula de adesão ICAM-1, um ligante tecidual para a integrina CD18 (Wu *et al.*, 1996). Outro achado do presente estudo, que sugere maior atividade migratória destes linfócitos, foi a redução no percentual de linfócitos do sangue periférico, após 14 dias de injeção da doxorubicina, o que novamente corrobora estudo anterior que detectou linfócitos

no tecido renal, de animais com SN induzida pela doxorubicina, em fase posterior à chegada dos macrófagos (Wang *et al.*, 2000). O aumento na atividade migratória de linfócitos T citotóxicos e células NK pode estar também relacionado à maior deposição de colágeno no tecido renal na 3ª e 4ª semana após a injeção da doxorubicina, como observado neste estudo (dados não mostrados).

O aumento no percentual de linfócitos, no sangue periférico dos animais que receberam injeção de doxorubicina, verificado na fase inicial da doença pode ter sido somente um reflexo da redução no percentual de monócitos e neutrófilos e não um aumento absoluto de linfócitos. De maneira semelhante, a redução no percentual de linfócitos no 14º dia após a injeção da doxorubicina também pode ter sido somente um reflexo do aumento no percentual de monócitos e neutrófilos. Contudo, a leucocitose presente nos animais do grupo DOX, no 14º dia após a injeção reflete uma provável exacerbação da resposta imune devido à lesão renal induzida pela doxorubicina, uma vez que nesta fase da doença, ocorreu aumento na expressão da molécula CD80 na superfície dos monócitos do sangue periférico. No estudo de Fleischer a análise por citometria de fluxo demonstrou que monócitos do sangue periférico, previamente estimulados em cultura, aumentaram a intensidade média de fluorescência para a molécula CD80 (Fleischer, 1996), o que contribui com a hipótese de maior ativação dessas células no presente experimento. Em modelo animal de glomerulonefrite crônica, ficou evidente que a molécula CD80 possui função lesiva na doença renal, por promover a sobrevivência e a proliferação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> (Odobasic *et al.*, 2005). Em outro estudo, foi sugerido que a proteinúria, em pacientes com SNLM, é provocada pelo aumento na expressão de CD80 nos podócitos (Ishimoto *et al.*, 2011). de acordo com Wilson e colaboradores, a molécula cd80 está relacionada à ativação das células nk (Wilson *et al.*, 1999), o que poderia justificar o aumento na expressão de integrinas CD18 nas células NK no presente estudo, conforme discutido anteriormente.

A participação dos neutrófilos na lesão renal, no modelo animal de SN induzida pela doxorubicina, não tem sido muito investigada, contudo, alguns trabalhos têm mostrado maior atividade oxidativa dos neutrófilos em pacientes com SN (Akyoul *et al.*, 2007; Bertelli *et al.*, 2010), associada à redução na atividade regulatória exercida por outras células sanguíneas (Bertelli *et al.*, 2010). No presente estudo, apesar da redução na subpopulação de neutrófilos na fase inicial da doença, não percebemos alterações significativas na expressão de CD18 na superfície dessas células. Entretanto, a capacidade migratória dos neutrófilos não é

dependente somente da atividade da integrina CD18 (Jannat *et al.*, 2010), mas também de outras moléculas como a glicoproteína ligante para selectina P - tipo 1 (PSGL-1) (Moore *et al.*, 1995; Panés *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 2002), e a L-selectina (Rossi *et al.*, 2002), presentes na superfície dos neutrófilos e que apresentam afinidade por receptores do endotélio vascular.

Poucas investigações têm abordado a expressão de integrinas e moléculas coestimuladoras em leucócitos do sangue periférico de animais com SN induzida pela doxorrubicina. Os achados do presente estudo sugerem um perfil migratório diferenciado das células envolvidas nos eventos de fagocitose e citotoxicidade em diferentes tempos de evolução da doença renal. A ativação intensa dos monócitos, na fase inicial da doença demonstra a importância dessas células no mecanismo de instalação da lesão renal, que inclusive pode apresentar relação com o dano oxidativo renal. Assim, conforme já sugerido por Riyuzo e Soares (2002), pesquisas devem ser direcionadas no sentido de inibir a infiltração inflamatória no tecido renal, a fim de postergar a evolução da SN. Além disso, devido à importância do processo de coestimulação durante a ativação da resposta imunológica (Sharpe, 2009) acredita-se que a caracterização temporal da expressão de diferentes moléculas relacionadas aos mecanismos de ativação e migração celular pode contribuir com futuras terapias de controle imunológico do infiltrado inflamatório no tecido renal, evitando assim a perpetuação do mecanismo de agressão tecidual, nesse modelo animal e futuramente nos pacientes com a SN.

## **Conclusão**

O modelo animal de SN induzida pela doxorrubicina é caracterizado pelo aumento na expressão das moléculas CD80 e CD18 em monócitos e de CD18 em linfócitos e células NK, no sangue periférico, especialmente na fase inicial da doença. O aumento na expressão das moléculas relacionadas à ativação/ migração celular pode contribuir com os mecanismos de injúria renal neste modelo animal de SN, uma vez que, nos animais que receberam injeção de doxorrubicina o dano oxidativo renal apresentou correlação positiva com a expressão de CD80 nos monócitos do sangue periférico e com os níveis séricos de creatinina. Estes achados indicam uma potencial associação entre o aumento na ativação dos monócitos do sangue periférico e a lesão renal em animais com SN induzida pela doxorrubicina. Estudos adicionais que avaliem o efeito do bloqueio das integrinas e moléculas co-estimuladoras podem oferecer novas terapias e oportunidades de tratamento para os pacientes com SN

## Referencias

- Abrantes MM, Oliveira EA, Lamounier JA, Diniz JSS, Cardoso LSB and Gonçalves RJV 2004. Síndrome Nefrótica em Crianças: uma revisão histórica do século XX. *J Bras Nefrol*; 26: 153-64.
- Adriamycin [database on the Internet]. Health Communication Network 2012; Disponível em: [http://www.pfizer.com.au/sites/au/Products/Leaflets/PI\\_Adriamycin\\_212.pdf](http://www.pfizer.com.au/sites/au/Products/Leaflets/PI_Adriamycin_212.pdf). Acessado em 02 de Agosto de 2012.
- Akyol T, Bulucu F, Sener O, Yamanel L, Aydin A, Inal V, Bozoglu E, Demirkaya E, Eken A and Musabak U 2007. Functions and Oxidative Stress Status of Leukocytes in Patients with Nephrotic Syndrome. *Biol Trace Elem Res*; 116:237–247.
- Barreto TO Cleto LS, Gioda CR, Silva RS, Sousa-Franco J and Magalhães JC 2011. Swim training does not protect mice from skeletal muscle oxidative damage following a maximum exercise test. *Eur J Appl Physiol*; 111:1439-6327.
- Benz K, Buttner M, Dittrich K, Campean V, Dotsch J and Amann K 2010. Characterization of renal immune cell infiltrates in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*; 25:1291-1298.
- Berens KL, Verani, RR and Luke DR 1998. Role of neutrophils and macrophages in experimental nephrosis of the rat. *Ren Fail*; 20:53-63.
- Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thoua Y, Mecca G, Remuzzi G and Donati MB 1982. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest*; 46:16–23.
- Bertelli R, Trivelli A, Magnasco A, Cioni M, Bodria M, Carrea A, Montobbio G, Barbano G and Ghiggeri GM 2010. Failure of regulation results in an amplified oxidation burst by neutrophils in children with primary nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol*; 161: 151-158.
- Boonsanit D, Kanchanapangka S and Buranakarl C 2006. L-carnitine ameliorates doxorubicin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrology*; 11: 313-320.
- Cao Q, Wang Y, Zheng D, Sun Y, Wang YA, Lee VWS, Zheng G, Tan TK, Ince J, Alexander SI and Harris DCH 2010. IL-10/TGF- $\beta$ -Modified Macrophages Induce Regulatory T Cells and Protect against Adriamycin Nephrosis. *J Am Soc Nephrol*; 21:933-942.
- Carr MW, Alon R and Springer TA 1996. The C–C Chemokine MCP-1 differentially modulates the avidity of b1 and b2 integrins on T lymphocytes. *Immunity*; 4:179–187.
- Cavalcanti FCB 1997. Revisão/Atualização em transplante renal: moléculas de adesão na isquemia e no transplante de órgãos. *J Bras Nefrol*; 19:98-104.

- Chen A, Wei CH, Sheu LF, Ding SL and Lee WH 1995. Induction of proteinuria by Adriamycin or bovine serum albumin in the mouse. *Nephron*; 69:293–300.
- D'Agati VD, Kaskel FJ and Falk, RJ 2011. Focal Segmental Glomerulosclerosis. *N Engl J Med*; 365:2398-2411.
- Diamond MS and Springer TA 1994. The Dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol*; 4:506-17.
- Eddy AA, López-Guisa JM, Okamura DM and Yamaguchi I 2012. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatr Nephrol*; 27:1233–1247.
- Engel P, Gribben JG, Freeman G, Zhou LJ, Nozawa Y, Abe M, Nadler LM, Wakasa H and Tedder TF 1994. The B7-2 (B70) co-stimulatory molecule of monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentiation antigen. *Blood*; 84:1402-1407.
- Fernandez L, Romero M, Rincón J and Mosquera, J 2003. Increased Expression of CD54, CD18, MHC Class II Molecules, and Proliferating Cell Nuclear Antigen in Acute Puromycin Aminonucleoside Nephrosis. *Nephron Exp Nephrol*; 94:55-65.
- Fiser RT, Arnold WC, Charlton RK, Steele RW, Childress SH and Shirkey B 1991. T-lymphocyte subsets in nephrotic syndrome. *Kidney Int*; 40:913-916.
- Fleischer J, Soeth E, Reiling N, Grage-Griebenow E, Flad H-D and Ernst M 1996. Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunol*; 89:592-598.
- Gahmberg CG 1997. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*; 9:643-650.
- Ghodake SR, Suryakar AN, Ankush RD, Shaikh K and Katta AV 2010. Role of reactive oxygen species in pathogenesis of nephrotic syndrome. *Indian J Clin Biochem*; 25: 82–85.
- Herrod HG, Stapleton FB, Trouy RL and Roy S 1983. Evaluation of T lymphocyte subpopulations in children with nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol*; 52:581-585.
- Humphries JD, Byron A and Humphries MJ 2006. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*; 119:3901-3903.
- Hynes RO 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*; 69:11-25.
- Ishimoto T, Shimada M, Araya CE, Huskey J, Garin EH and Johnson RJ 2011. Minimal change disease: a CD80 podocytopathy? *Semin Nephrol*; 31:320-325.

Jeansson M, Björck K, Tenstad O and Haraldsson B, 2009. Adriamycin Alters Glomerular Endothelium to Induce Proteinuria. *J Am Soc Nephrol*; 20:114–122.

Karim D and Tommy A 2000. Beta-2 integrin signaling in leukocytes. *Front Biosci*:438-451.

Lama G, Luongo I, Tirino G, Borriello A, Carangio C and Salsano ME 2002. T-lymphocyte populations and cytokines in childhood nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis*; 39:958-965.

Lee VWS and Harris DCH 2011. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology*; 16:30–38.

Lee VWS, Wang Y, Qin X, Wang Y, Zheng G, Mahajan D, Coombes J, Rangan G, Alexander SI and Harris DCH 2006. Adriamycin nephropathy in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Nephrol Dial Transplant*; 21: 3293–3298.

Li R, Sie J, Kantor C, Koistinen V, Altieri DC, Nortamo P and Gahmberg C G 1995. A Peptide derived from the intercellular adhesion molecule-2 regulates the avidity of the leukocyte integrins CD11b/CD18 and CD11c/CD18. *J Cell Biol*; 129(4):1143-1153.

Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Fugang L, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF and McEver RP 1995. P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-Selectin. *Cell Biol*; 128:661-671.

Musial K, Ciszak L, Kosmaczewska A, Szteblich A, Frydecka I and Zwoliński D 2010. Zeta chain expression in T and NK cells in peripheral blood of children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*; 25:119–12

Odobasic D, Kitching AR, Tipping PG and Holdsworth SR 2005. CD80 and CD86 costimulatory molecules regulate crescentic glomerulonephritis by different mechanisms. *Kidney Int*; 68:584-594.

Panés J, Perri M and Granger DN 1999. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol*; 126:537-550.

Park E, Kim S, Lee M, Lee HS, Lee I and Sung JK 2003. Protective effects of N-acetylcysteine and selenium against doxorubicin toxicity in rats. *J Vet Med*; 4:129-136.

Penberthy TW, Jiang Y and Graves DT 1997. Leukocyte adhesion molecules. *Crit Rev Oral Biol Med (J Dent Res)*; 8 (4):380-388.

Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC, Durvasula RV, Hauser PV, Kowalewska J, Kroff RD, Logar CM, Marshall CB, Ohse T and Shankland SJ 2009. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am J Physiol Renal Physiol*; 296:213-229.

Rangan GK, Wang Y, Tay YC and Harris DCH 1999. Inhibition of nuclear factor-kb activation reduces cortical tubulointerstitial injury in proteinuric rats. *Kidney Int*; 56:118-34.

Ricevuti AMG 1995. Leukocyte CD11/CCD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica*; 80:161-175.

Riyuzo MC and Soares OV 2002. Revisão: Papel do infiltrado inflamatório na fibrose túbulo-intersticial e evolução das glomerulopatias. *J Bras Nefrol*; 24:40-47.

Rossi LW, Horn NA, Buhre W, Gass F, Hutschenreuter G and Rossaint R 2002. The effect of isoflurane on neutrophil selectin and beta 2-Integrin activation in vitro. *Anesth Analg*; 95:583-587.

Ruoslahti E 1991. Integrins. *J Clin Invest*; 87:1-5.

Sayegh MH and Turka LA 1995. T cell costimulatory pathways: promising novel targets for immunosuppression and tolerance induction. *J Am Soc Nephrol*; 6:1143-1150.

Sharpe A.H 2009. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev*; doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00784.x. Published On line: May 2009.

Souto MFO, Teixeira MM, Penido MGMG and Simões e Silva AC 2008. Fisiopatologia da Síndrome Nefrótica em crianças e adolescentes. *Arch Latin Nefr Ped*; 8:1-10.

Springer TA 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*; 76:301-314.

Takiue K, Sugiyama H, Inoue T, Morinaga H, Kikumoto Y, Kitagawa M, Kitamura S, Maeshima Y, Wang D-H, Masuoka N, Ogino K and Makino H 2012. Acatalasemic mice are mildly susceptible to Adriamycin nephropathy and exhibit increased albuminuria and glomerulosclerosis. *BMC Nephrology*; 13/14:01–10.

Thomas ME, Brunskell NJ, Harris KPJ, BaileYE, Pringgle JH, Furness PN and Walls J 1999. Proteinúria induces tubular cell turnover: a potential mechanisms for tubular atrophy. *Kidney Int*; 55:890-898.

Vielhauer V, Berning E, Eis V, Kretzler M, Segerer S, Strutz F, Horuk R, Grone H-J, Schlondorff D and Anders H-J 2004. CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int*; 66:2264–2278.

Wang Y, Wang YP, Zheng G, Lee VWS, Ouyang L, Chang DHH, Mahajan D, Coombs J, Wang YM, Alexander SI and Harris DCH 2007. Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney Int*; 72:290-299.

Wang Y, Feng X, Bao S, Yi S, Kairaitis L, Tay YC, Rangan GK and Harris DCH 2001. Depletion of CD4 T cells aggravates glomerular and interstitial injury in murine Adriamycin nephropathy. *Kidney Int*; 59:975-984.

Wang Y, Wang YP, Tay Y-C, Harris DCH 2001(b). Role of CD8 cells in the progression of murine Adriamycin nephropathy. *Kidney Int*; 59:941-949.

Wang Y, Wang YP, Tay Y-C and Harris DCH 2000. Progressive Adriamycin nephropathy in mice: Sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int*; 58:1797-1804.

Wilson JL, Charo J, Martin-Fontecha, A, Dellabona P, Casorati G, Chambers BJ, Kiessling L, Bejarano MT and Ljunggren HG 1999. NK Cell Triggering by the Human Costimulatory Molecules CD80 and CD86. *J Immunol*; 163:4207-4212.

Wu H, Wang YM, Wang Y, Hu M, Zhang GY and Knight JF 2007. Depletion of gamma-delta T cells exacerbates murine Adriamycin nephropathy. *J Am Soc Nephrol*; 18:1180-1189.

Wu H, Wang Y, Tay Y-C, Zheng G, Shang C, Alexander SI and Harris DCH 2005. DNA vaccination with naked DNA encoding MCP-1 and RANTES protects against renal injury in Adriamycin nephropathy. *Kidney Int*; 67:2178-2186.

Wu JC, Fan GM, Kitazawa K and Sugisak T 1996. The Relationship of adhesion molecules and leukocyte infiltration in chronic tubulointerstitial nephritis induced by puromycin aminonucleoside in wistar rats. *Clin Immunol Immunopathol*; 79:229-235.

Zima T, Tesar V, Crkovska J, Stejskalava A, Platenik J, Teminova J, Nemecek K, Janebova M and Stipek S 1998. ICRF-187 (dexrazoxan) protects from Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrol Dial Transplant*; 13:1975-1979.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Síndrome Nefrótica (SN) é uma doença multifatorial, ainda sem uma etiologia bem definida. Desde as suspeitas iniciais da participação do sistema imunológico na etiopatogênese da SN diversos trabalhos têm investigado as possíveis alterações na resposta imune nessa doença. O modelo animal de indução da SN pela Doxorubicina tem contribuído bastante com a elucidação dos mecanismos envolvidos na geração e perpetuação da doença. Em roedores, a doxorubicina induz alterações bioquímicas, histológicas e imunológicas bastante semelhantes às encontradas nos pacientes com SNI. Outras vantagens desse modelo são: baixo custo, menor complexidade de manejo, boa reprodutibilidade e possibilidade de se induzir a lesão renal com dose única do fármaco.

Diferentes investigações demonstraram alterações na resposta celular mediada pelo sistema imunológico, em pacientes com SN (Fiser *et al.*, 1991; Lama *et al.*, 2002; Musial *et al.*, 2010; Benz *et al.*, 2010) e também em modelo animal de SN induzida pela doxorubicina (Wu *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000; 2001; 2001-b). Apesar de gerar uma agressão inicial no tecido renal, a doxorubicina é rapidamente removida da corrente sanguínea, sendo parte excretada e parte depositada nos tecidos (Yesair *et al.*, 1972; Wilkinson e Mawer, 1974; Tavoloni e Guarino, 1980). Assim, acredita-se que a alteração na homeostasia do sistema imunológico tenha participação importante na perpetuação da agressão inicial gerada pela doxorubicina, promovendo um estado de cronicidade da doença. Portanto, as investigações acerca das alterações na resposta imune nesse modelo animal tem se mostrado um campo promissor para os estudos sobre a etiopatogenia da SN, com possíveis extrapolações para os pacientes com essa doença.

Nesse contexto inseriu-se este estudo com a utilização do modelo animal de SN induzida pela doxorubicina, a fim de caracterizar o perfil do leucograma nos animais injetados com a doxorubicina, caracterizar o estado de ativação e migração celular, em diferentes fases da doença, através da expressão das moléculas CD80 e CD18, respectivamente, em leucócitos do sangue periférico. Além de avaliar as alterações biométricas, histológicas e bioquímicas, componentes importantes do quadro clínico da SN, bem como o dano oxidativo no tecido renal destes animais. Os resultados obtidos nesta pesquisa foram apresentados e discutidos sob a forma de dois artigos científicos.

No primeiro artigo, foram evidenciados os achados biométricos, histológicos e bioquímicos, os quais estão de acordo com aqueles descritos na literatura, corroborando, portanto, a caracterização do modelo animal de SN induzida pela doxorrubicina. Conforme já descrito em outras investigações, os resultados apresentados nesse estudo evidenciaram alterações bioquímicas de surgimento precoce, tais como proteinúria e dislipidemia. As lesões histológicas tornaram-se intensas a partir do 21º dia após a injeção da doxorrubicina, o que também foi evidenciado em outros trabalhos (Rangan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2011). Observa-se significativa retenção de líquido no tecido renal (edema) nos animais injetados com a doxorrubicina, o que também pode ter contribuído com a piora da lesão renal nesses animais.

No segundo artigo, foram demonstradas as dinâmicas de alterações no leucograma bem como na expressão das moléculas relacionadas à ativação e migração celular nos leucócitos do sangue periférico dos animais com SN induzida pela doxorrubicina. Também foi discutido o aumento do dano oxidativo renal verificado nos animais do grupo DOX. Ocorreram alterações no perfil do leucograma total e diferencial e também no padrão de expressão de CD80 e CD18 em diferentes fases de evolução da doença. Este perfil migratório alterado pode estar contribuindo com a formação do infiltrado inflamatório tubulointersticial e consequente injúria renal, nesse modelo de SN. O aumento na peroxidação lipídica no tecido renal, na fase inicial da doença apresentou correlação positiva com a expressão da molécula CD80 na superfície dos monócitos do sangue periférico e também com os níveis plasmáticos de creatinina, destacando assim uma importante associação entre a agressão tecidual, ativação dos monócitos e um marcador biológico típico da SN. Contudo, a maior peroxidação lipídica detectada no tecido renal na fase inicial da doença, nesta pesquisa, deve ser avaliada com cautela uma vez que, apesar de evidenciar-se aumento na ativação dos monócitos no sangue periférico, células reconhecidamente produtoras de espécies reativas de oxigênio, e apesar da literatura indicar a participação de espécies reativas de oxigênio na patogênese da SN (Akyol *et al.*, 2007; Ghodake *et al.*, 2010) não se pode deixar de considerar o mecanismo de ação da doxorrubicina, que também pode induzir a formação de espécies reativas de oxigênio no tecido renal (Barbey *et al.*, 1989).

Nesta investigação, além das alterações na subpopulação de monócitos do sangue periférico de animais injetados com a doxorrubicina, o leucograma diferencial também mostrou alterações na subpopulação de neutrófilos durante a evolução da SN. A análise da expressão de integrinas CD18 na superfície dos neutrófilos não evidenciou alterações

significativas nos animais injetados com a doxorrubicina, contudo, sabe-se que a capacidade migratória dos neutrófilos não é dependente somente da atividade da beta-integrina CD18 (Jannat *et al.*, 2010), mas também de outras moléculas como a glicoproteína ligante para selectina P - tipo 1 (PSGL-1) (Moore *et al.*, 1995; Panés *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 2002), e a L-selectina (Rossi *et al.*, 2002) todas expressas na superfície dos neutrófilos e que apresentam afinidade por receptores do endotélio vascular.

Atualmente, estão sendo realizadas análises das marcações imuno-histoquímicas para colágeno tipo I e tipo III nas amostras de tecido renal dos animais deste estudo. Resultados iniciais evidenciaram aumento progressivo na deposição do colágeno tipo I no tecido renal dos animais injetados com a doxorrubicina (dados não mostrados), o que está de acordo com as expectativas relacionadas ao processo de fibrose progressiva que ocorre no tecido renal. Serão realizadas também marcações imuno-histoquímicas para macrófagos, linfócitos e neutrófilos no tecido renal desses animais, a fim de verificar a relação temporal entre as alterações na expressão das moléculas de ativação/ migração celular, a presença do infiltrado inflamatório renal e a produção de espécies reativas de oxigênio nas diferentes fases da doença.

Este trabalho apresentou algumas limitações técnicas que devem ser expostas e discutidas, em relação aos resultados obtidos. No processo de caracterização dos leucócitos, outros marcadores (anticorpos) podem ser utilizados para evidenciação das células NK (anti-CD56 e anti-CD16), monócitos (anti-CD14) e neutrófilos (anti-CD16). Nesse sentido, tentou-se ser o mais fidedigno possível com as análises ao se definir a estratégia de identificação das células. Assim, a separação dos subtipos celulares foi realizada com base no perfil de tamanho e granulosidade celular para os neutrófilos (células  $SSC^{int} FSC^{int}$ ) e no perfil de granulosidade e intensidade de expressão dos marcadores CD4 (células  $SSC^{int} CD4^{low}$ ) e CD8 (células  $SSC^{int} CD8^{low}$ ) para monócitos e células NK, respectivamente. Além disso, os resultados encontrados para a expressão das moléculas de ativação e migração celular no presente estudo são condizentes com a dinâmica do infiltrado inflamatório renal para o modelo animal de SN induzida pela doxorrubicina (Wang *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006).

Entre os pontos positivos desta pesquisa, encontram-se os resultados biométricos, histológicos e bioquímicos, que corroboraram as características descritas na literatura para o modelo animal de SN induzida pela doxorrubicina (Bertani *et al.*, 1986; Okuda *et al.*, 1986; Rangan *et al.*, 1999 ). Destaca-se ainda a investigação imunológica que evidenciou aumento

na expressão das moléculas relacionadas à ativação e migração das células envolvidas no mecanismo de lesão renal em diferentes fases da SN, sendo que a dinâmica de expressão dessas moléculas foi condizente com a dinâmica do infiltrado inflamatório renal, já bem descrita por vários autores na literatura (Wang *et al.*, 2000).

É provável que este seja o primeiro estudo, em modelo animal de SN induzida pela doxorrubicina, envolvendo a análise da expressão das moléculas de ativação/ migração celular, em leucócitos do sangue periférico, em diferentes etapas de evolução da SN e correlaciona a expressão dessas moléculas ao status redox do tecido renal e a um marcador bioquímico da lesão renal. Uma vez que a fisiopatologia da SNI ainda não está bem definida, estudos biométricos, bioquímicos e histológicos evidenciando a progressão da doença contribuem com a caracterização do modelo animal e melhor compreensão da história natural da SNI. Acredita-se que a caracterização temporal da expressão de moléculas relacionadas aos mecanismos de ativação e migração celular pode contribuir com futuras terapias de controle imunológico do infiltrado inflamatório no tecido renal, evitando assim a perpetuação do mecanismo de agressão tecidual, nesse modelo animal de SN e futuramente nos pacientes com a SNI.

## REFERÊNCIAS

Adriamycin [database on the Internet]. Health Communication Network 2012; Disponível em: [http://www.pfizer.com.au/sites/au/Products/Leaflets/PI\\_Adriamycin\\_212.pdf](http://www.pfizer.com.au/sites/au/Products/Leaflets/PI_Adriamycin_212.pdf). Acessado em 02 de Agosto de 2012.

Akyol T, Bulucu F, Sener O, Yamanel L, Aydin A, Inal V, Bozoglu E, Demirkaya E, Eken A and Musabak U 2007. Functions and Oxidative Stress Status of Leukocytes in Patients with Nephrotic Syndrome. *Biological trace element research*; 116:237–247.

Barbey MM, Fels LM, Soose M, Poelstra K, Gwinner W, Bakker W, Stolte H 1989. Adriamycin affects glomerular renal function: evidence for the involvement of oxygen radicals. *Free Radc Res Commum*; 7:195-203.

Bertani T, Broggin M, Cutillo F, Remuzzi G and Zoja C 1986. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney international*; 30:488–496.

Benz K, Buttner M, Dittrich K, Campean V, Dotsch J and Amann K 2010. Characterization of Renal Immune Cell Infiltrates In Children With Nephrotic Syndrome. *Pediatr Nephrol*; 25:1291-1298.

Fiser RT, Arnold WC, Charlton RK, Steele RW, Childress SH and Shirkey B 1991. T-Lymphocyte Subsets In Nephrotic Syndrome. *Kidney Int*; 40:913-916.

Ghodake SR, Suryakar AN, Ankush RD, Shaikh K and Katta AV 2010. Role of reactive oxygen species in pathogenesis of nephrotic syndrome. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*; 25:82–85.

Jannat R, Robbins GP, Ricart BG, Dembo M and Hammer DA 2010. Neutrophil adhesion and chemotaxis depend on substrate mechanics. *J Phys Condens Matter*; doi:10.1088/0953-8984/22/19/194117. Published Online: 19 May 2010.

Lama G, Luongo I, Tirino G, Borriello A, Carangio C and Salsano ME 2002. T-Lymphocyte Populations And Cytokines In Childhood Nephrotic Syndrome. *Am J Kidney Dis*; 39:958-965.

Lee VWS and Harris DCH 2011. Adriamycin Nephropathy: A Model Of Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Nephrology*; 16:30-38.

Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Fugang L, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF and McEver RP 1995. P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-Selectin. *Cell Biol*; 128:661-671.

Muñoz M, Rincón J, Pedrañez A, Viera N, Hernández-Fonseca JP and Mosquera J 2011. Proinflammatory Role Of Angiotensin Ii In A Rat Nephrosis Model Induced By Adriamycin.

*J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*; doi: 10.1177/1470320311410092. Published Online: 24 June 2011.

Musial K, Ciszak L, Kosmaczewska A, Szteblich A, Frydecka I and Zwolińska D 2010. Zeta Chain Expression In T And Nk Cells In Peripheral Blood Of Children With Nephrotic Syndrome. *Pediatr Nephrol*; 25:119-127.

Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, Onoyama K, Fujimi S and Fujishima M 1986. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney international*; 29:502–510.

Panés J, Perri M and Granger DN 1999. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol*; 126:537-550.

Rangan GK, Harris DCH, Tay YC and Wang Y 1999. Inhibition of nuclear factor-kb activation reduces cortical tubulointerstitial injury in proteinuric rats. *Kidney international*; 56:118–134.

Rossi LW, Horn NA, Buhre W, Gass F, Hutschenreuter G and Rossaint R 2002. The effect of isoflurane on neutrophil selectin and beta 2-Integrin activation in vitro. *Anesth Analg*; 95:583-587.

Tavoloni N and Guarino AM 1980. Disposition and metabolism of Adriamycin in the rat. *Pharmacology*; 21:244–255.

Wang Y, Feng X, Bao S, Yi S, Kairaitis L, Tay YC, Rangan GK and Harris DCH 2001. Depletion of CD4 T cells aggravates glomerular and interstitial injury in murine Adriamycin nephropathy. *Kidney Int*; 59:975-984.

Wang Y, Wang Yp, Tay Y-C and Harris DCH 2000. Progressive Adriamycin Nephropathy In Mice: Sequence Of Histologic And Immunohistochemical Events. *Kidney Int*; 58:1797–1804.

Wang Y, Wang YP, Tay Y-C and Harris DCH 2001(b). Role Of CD8 Cells In The Progression Of Murine Adriamycin Nephropathy. *Kidney Int*; 59:941-949.

Wilkinson PM and Mawer GE 1974 . The persistence of Adriamycin in man and rats. *British journal of clinical pharmacology*; 1:241–247.

Wu H, Wang YM, Wang Y, Hu M, Zhang GY, Knight JF, Harris DCH and Alexander SI 2007. Depletion of Gama-Delta T cells exacerbates murine Adriamycin nephropathy. *J Am Soc Nephrol*; 18:1180-1189.

Yesair DW, Schwartzbach E, Shuck D, Denine EP and Asbell MA 1972. Comparative pharmacokinetics of Daunomycin and Adriamycin in several animal species. *Cancer Research*; 32:1177–1183.

## 7. PROPOSTAS PARA INVESTIGAÇÕES FUTURAS

Diante das considerações delineadas com base nos resultados deste estudo, novas investigações se fazem necessárias para esclarecer algumas dúvidas sobre os mecanismos envolvendo a participação da resposta imune na inicialização e perpetuação da lesão renal. Sugestões para possíveis investigações, nesse modelo animal de SN, são pontuadas a seguir:

- Estudos que verifiquem a importância do acúmulo de líquido no tecido renal (edema) para o prognóstico da lesão renal.
- Estudos sobre a participação dos Neutrófilos no processo de ativação/migração celular, geração de espécies reativas de oxigênio e consequente na lesão renal.
- Estudos que avaliem os efeitos do bloqueio das integrinas e moléculas coestimuladoras, sobre a evolução da lesão renal.
- Estudos que verifiquem a participação de citocinas e quimiocinas no processo de ativação/adesão/migração leucocitária.

## ANEXO 1

## Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**  
**- CETEA -**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 99/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Análise de parâmetros imunológicos em ratos com Síndrome Nefrótica induzida pela Adriamicina**", que tem como responsável(is) **Ana Cristina Simões e Silva**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **1/ 07/2009**.

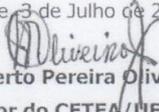
Este certificado expira-se em **1/ 07/ 2014**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 99/2009**, related to the project entitled "**Analysis of immynological parameters in rats with Nephrotic Syndrome induced by Adriamicina**", under the supervisors of **Ana Cristina Simões e Silva**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **July 1, 2009**.

This certificate expires in **July 1, 2014**.

Belo Horizonte, 3 de Julho de 2009.

  
**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Coordenador do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)