

JOSÉ ELPÍDIO BARBOSA

ESTUDO DA NEFROTOXICIDADE DO SORO ANTI-FORSSMAN
EM COBAIAS

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Univer-
sidade de São Paulo para
obtenção do grau de Mestre
em Clínica Médica

Orientador: Prof.Dr. WILLY SARTI

- 1980 -

À meus pais
e irmã

À Regina e
Carolina

À Profa. Nadia Chaibub Krahenbühl

AGRADECIMENTOS

Queremos expressar nossos agradecimentos especiais:
Aos Profs.Drs. Willy Sarti, Ivan Fiore de Carvalho,
Gabriel Bento de Mello, José Alberto Mello de Oliveira,
Ricardo Ribeiro dos Santos, José Oliveira de
Almeida e Uilho Antônio Gomes

Às Sras. Maria Cecilia Rodrigues de Oliveira, Maria
Ignez Braghetto dos Santos, Márcia Martinez Z. Brando,
Edith Werneck e Srta. Margarida Fãvero.

Aos Srs. Sisto Rodrigues, Jorge Visconte, Domingos
DeCaro, Walter Aguillar e Helgio Werneck

e a todos que direta ou indiretamente colaboraram na
elaboração deste trabalho

Muito obrigado.

Convênio "Clínica Médica - FINEP"

B.39.79.349.00.00

Recebeu auxílio parcial da FAPESP -
processo 12-Médicas 76/1178

"O conhecimento científico
é sempre a reforma de uma
ilusão"

Bachelard (1884-1962)

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAL E MÉTODOS	6
1. Produção do antígeno de Forssman	6
2. Produção do soro anti-Forssman (SAF)	6
2.1. Preparo da solução antigênica	6
2.2. Imunização dos animais	6
3. Preparo do soro de coelho normal	7
3.1. Obtenção do soro de coelho normal	8
3.2. Absorção do soro de coelho normal (SCN)	8
4. Caracterização do título hemolítico dos soros	8
5. Determinação da dose letal mínima de SAF para cobaia	9
6. Conjugação dos soros SAF e SCN com isotiocianato de fluoresceína (FITC)	9
7. Protocolo experimental	10
8. Medidas de função renal	14
8.1. Fluxo urinário	14
8.2. Dosagens de sódio e potássio	14
8.3. Dosagem de osmolaridade	15
8.4. Dosagens de inulina e PAH	15
8.5. Cálculos dos parâmetros de função renal	15

	Pág.
9. Estudos morfológicos	15
9.1. Histologia clássica	15
9.2. Imunofluorescência	16
10. Pesquisa de antígeno de Forssman no	
soro de cobaia	18
10.1. Imunodifusão em gel	18
10.2. Imunoeletroforese	18
10.3. Fixação de complemento	19
III. RESULTADOS	20
1. Caracterização dos soros SAF e SCN	20
1.1. Títulos hemolíticos	20
1.2. Determinação da dose letal mínima de	
SAF para cobaias	21
1.3. Capacidade dos anti-soros de se liga	
rem a tecido renal de cobaia	21
2. Pesquisa de antígeno de Forssman no soro	
de cobaia normal	24
3. Estudo da função renal	24
3.1. Medidas de fluxo urinário	25
3.2. Medidas de "clearance" osmolar (C_{osm})	29
3.3. Medidas de reabsorção de água livre	
($T_{H_2O}^c$)	29
3.4. Medidas de "clearance" de água livre	
(C_{H_2O})	29

	Pág.
3.5. Medidas de reabsorção de soluto no segmento diluidor do nefron (RSSD)	33
3.6. Excreção fracional de água (EF_{H_2O})	33
3.7. Excreção fracional de potássio (EF_K)	39
3.8. Excreção fracional de sódio (EF_{Na})	39
3.9. Medidas de filtração glomerular (FG)	39
3.10. Medidas de fluxo plasmático renal (FPR)	40
3.11. Medidas de pressão arterial sistêmica (PA)	40
4. Estudos morfológicos	44
4.1. Histologia clássica	44
4.2. Imunofluorescência	51
IV. DISCUSSÃO	53
V. SUMÁRIO	70
VI. SUMMARY	71
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÊNDICE	

I - I N T R O D U Ç Ã O

FRIEDBERGER (1) em 1909 observou que soro de coelho imunizado com eritrócitos de carneiro, quando injetado em cobaia produzia uma grave lesão nestes animais levando-as com freqüência à morte.

A explicação deste fenômeno surgiu em 1911, quando FORSSMAN descreveu a descoberta de um antígeno que chamou heterófilo (2). Este antígeno estaria presente nos eritrócitos de carneiro e em tecidos de várias espécies animais, entre eles a cobaia. Desta forma, quando se injetava uma suspensão de vários órgãos de cobaia, em coelho, este produzia anticorpos capazes de lisar hemáceas de carneiro.

As ações lesivas produzidas pelo anticorpo de FORSSMAN nos tecidos de animais portadores do antígeno heterófilo foram intensamente estudadas. O próprio FORSSMAN em 1920 (3) descreveu a lesão do tronco cerebral a que denominou "síndrome da carótida". REDFERN em 1926 (4) fez um extenso estudo das alterações geradas pela injeção do anticorpo de Forsman em cobaia. O autor descreveu desde alterações sintomáticas dos animais injetados até os fenômenos vasculo-necróticos observáveis em tecido pulmonar e pele, além da ação do anticorpo na contração do útero isolado de cobaia.

A partir de então os trabalhos de estudo da ação

deste anticorpo em vários tecidos de cobaia foram se somando: púrpura e necrose pancreática, de GRAÑA em 1946 (5), infar - tos intestinais, de LEVINE & WARREN em 1959 (6), glomerulopa - tia, de MAURICE-WILLIAMS e colaboradores em 1961 (7), lesões vasculares na pele, de BERKINSHAW-SMITH e colaboradores em 1962 (8), ultraestrutura das lesões vasculares no pulmão e na pele, de TAICHMAN e colaboradores em 1972 (9, 10).

Em 1956, TANAKA & LEDUC (11), publicaram um trabalho que estudava a presença e distribuição do antígeno de FORSSMAN em vários tecidos de animais como cobaia, camundongo, cão, gato e galinha. Esta publicação foi fundamental e se seguiu de outras que intensificaram os conhecimentos da localização e distribuição do antígeno de Forssman em tecidos e mesmo a nível celular, principalmente em cobaia HAWES & COOMBS em 1960 (12), SPEAR em 1962 (13,14) e SPEAR & KIHARA em 1963 (15).

Estes trabalhos demonstravam a presença do antígeno de Forssman, também, em tecido renal de cobaia. Sua distribuição mostrava maior concentração do antígeno em células dos tubos coletores renais e menor quantidade nos outros segmentos tubulares e glomérulos. A nível celular, o antígeno se encontrava no citoplasma sendo discutível a sua presença na membrana.

Paralelamente a estes trabalhos, desde o início deste século, pesquisadores tiveram sua atenção voltada para o estudo das nefropatias experimentais. Assim já em 1900 LIN-

DEMANN produziu albuminúria e uremia em coelhos após injeção de soro nefrotóxico produzido em cobaia (16). PEARCE em 1903-1904 estudando nefrite nefrotóxica em cães determinou que a córtex renal poderia ser usada como imunógeno (17). MASUGI em 1929, 1933 e 1934 e MASUGI e colaboradores em 1935 publicaram estudos detalhados e fundamentais na nefrite nefrotóxica de ratos e coelhos, relatando sua semelhança com a glomerulonefrite humana e apresentando a possibilidade de a nefrite ser induzida por anticorpos contra tecidos não renais (18, 19, 20, 21).

Seguiram-se, e se seguem até o presente, inúmeros estudos e publicações a respeito das nefropatias humanas e experimentais. Os modelos experimentais de nefrite têm procurado e encontrado sucesso no esclarecimento dos mecanismos de lesão glomerular e ou tubular e na transposição destes conhecimentos ao estudo das doenças renais humanas.

Básicamente duas formas principais de patogênese podem ser definidas nestas nefrites. Uma forma em que a lesão se deve a imune-complexos formados pela interação de antígenos circulantes, próprios ou não próprios do hospedeiro, com anticorpos. Estes complexos solúveis se localizariam nos glomérulos, produzindo o dano. A outra forma envolve a fixação de anticorpos circulantes contra membrana basal glomerular ou tubular, pela administração passiva de anticorpos nefrotóxicos heterólogos ou após imunização do hospedeiro com membrana basal de rim homólogo ou heterólogo resultando na forma-

ção de anticorpos autólogos anti-membrana basal.

De posse destes conhecimentos, aliados à experiência do departamento de Clínica Médica em trabalhos com nefrites experimentais (22,23,24,25,26,27), afigurou-se-nos a possibilidade de desenvolver um modelo de nefropatia que pudesse contribuir para o estudo desta doença em animais ou no homem.

Associamos, então, a capacidade lesiva do anticorpo de Forssman para tecido renal de cobaia com as técnicas de estudo das nefropatias experimentais.

Estariamos, assim, reproduzindo e estendendo o trabalho de MAURICE-WILLIAMS e colaboradores (7), uma vez que não nos deteríamos apenas em estudos morfológicos como aqueles autores. Além disso, diante da presença do antígeno heterófilo em maior concentração nas células dos tubos coletores de cobaia, a provável lesão deste segmento do néfron pela ação do anticorpo de Forssman, possibilitaria estender o modelo experimental para o estudo de tubulopatias.

Este modelo, então, utilizaria um soro nefrotóxico para cobaia, heterólogo e de origem diferente da maioria dos soros utilizados em trabalhos desta natureza neste animal.

Além dos estudos morfológicos, nos propusemos neste trabalho realizar a avaliação funcional das lesões que ocorressem no rim da cobaia.

Desta forma, nossos primeiros objetivos com o presente estudo seriam:

- produzir nefropatia em cobaia utilizando como soro ne-

frotóxico o soro de anti-Forssman.

- ampliar o estudo deste modelo de lesão renal, não só em dados morfológicos mas, também, com a avaliação da função renal destes animais.
- investigar a possibilidade de a lesão renal ser mais ampla, incluindo dano tubular além do glomerular.
- contribuir com o estudo das nefropatias em animais e, se possível, com a transposição destes conhecimentos, pa

II - MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS - Coelhos e cobaias utilizados no presente trabalho provieram do Biotério Central da FMRP-USP.

1. PRODUÇÃO DO ANTÍGENO DE FORSSMAN

O antígeno de Forssman foi preparado a partir de hemácias de carneiro, seguindo técnica descrita por MAYER (35).

2. PRODUÇÃO DO SÔRO ANTI-FORSSMAN (SAF)

2.1. Preparo da solução antigênica

Obtido o antígeno de Forssman, do estroma de hemácias de carneiro, dosou-se sua concentração em nitrogênio, pelo método de Kjeldahl. O valor obtido foi de 0,13gN%. Preparou-se uma suspensão do estroma de hemácias de carneiro, em solução salina isotônica, na concentração de 1mg de nitrogênio por ml de suspensão. Esta suspensão foi utilizada no preparo do SAF.

2.2. Imunização dos animais

Foram imunizados 6 coelhos, fêmeas, seguindo o es-

quema) descrito por MAYER (35):

- 2.2.1. - 0,1 ml da suspensão do antígeno de Forsman, no 1º dia.
- 2.2.2. - 1,0 ml da suspensão antigênica durante 5 dias.
- 2.2.3. - 2,0 ml da suspensão antigênica durante 5 dias.
- 2.2.4. - os animais foram sangrados no 5º dia após a última inoculação, por punção cardíaca.
- 2.2.5. - não houve intervalo maior que 2 dias entre as inoculações.
- 2.2.6. - todas as injeções foram aplicadas endovenosamente na veia marginal da orelha dos coelhos.

Do sangue obtido separou-se o sôro, que foi inativado em banho-maria por 30 minutos a 56°C. O sôro anti-Forsman assim preparado foi congelado até o uso.

3. PREPARO DO SÔRO DE COELHO NORMAL

Sôro de coelho normal foi preparado para ser utilizado nos procedimentos testemunhos do experimento.

3.1. Obtenção do soro de coelho normal

Coelhos normais foram sangrados até à morte por punção cardíaca. Do sangue obtido foi separado o soro. Este soro foi inativado em banho-maria por 30 minutos a 56°C.

3.2. Absorção do soro de coelho normal (SCN)

O soro de coelho normal foi absorvido em estroma de hemácias de carneiro. Assim, este soro foi incubado com estroma de hemácias de carneiro na proporção de 40 ml de soro para 3,0 g do estroma seco. A preparação foi à estufa a 37°C durante 1 hora, com agitação constante. Após a incubação o material foi levado à geladeira onde permaneceu 1 noite a 4°C, em constante agitação.

A suspensão obtida foi centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos*. O sobrenadante foi recuperado e utilizado como soro normal de referência nos experimentos controle.

O SCN foi congelado até o uso.

4. CARACTERIZAÇÃO DO TÍTULO HEMOLÍTICO DOS SOROS

Os soros SAF e SCN foram submetidos à verificação de suas atividades hemolíticas para determinar-se os títulos de sensibilização máxima. A técnica utilizada

* Aparelho de centrifugação I. SORVALL - mod. RC2-B

foi a descrita por ALMEIDA em 1950 (36).

5. DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL MÍNIMA DE SAF PARA COBAIA

Foram utilizadas cobaias macho, de peso variando entre 250 e 300 g. O SAF foi injetado endovenosamente através o seio venoso dorsal do pênis, nas doses de 0,1 ml; 0,2 ml; 0,3 ml e 0,6 ml em grupos de 5 animais. Observou-se, após as injeções, se ocorria morte dos animais e quanto tempo era necessário para o êxito letal.

Em contrapartida, foram injetadas cobaias macho com o SCN, seguindo o mesmo protocolo anterior.

6. CONJUGAÇÃO DOS SÔROS SAF E SNC COM ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÏNA (FITC)

SAF e SCN foram tratados por precipitação com sulfato de amônio para se conseguir preparações ricas em imunoglobulinas. A seguir estas frações de ambos os soros foram conjugadas ao FITC* na proporção de 0,015 mg do fluorocromo diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,5M, pH 9,5, por mg de proteína. Após 1 noite a 4°C as preparações foram submetidas a filtração cromatográfica em Sephadex G-75** para separação do corante livre (37).

* Calbiochem

** Pharmacia Fine Chemicals

7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Utilizou-se cobaias macho pesando cerca de 500g. Os animais foram anestesiados segundo um protocolo que envolvia duas fases: a primeira consistia na injeção intraperitoneal de sulfato de atropina na dose de 0,5 mg/kg de peso corporal; após 15 minutos a segunda fase era realizada com aplicação de injeção endovenosa de Valium[®] * na dose de 0,12 mg/kg de peso corporal adicionada de Nembutal[®] ** na dose de 40 mg/kg de peso corporal pelo seio venoso dorsal do pênis da cobaia. Durante os procedimentos cirúrgicos e experimentais, quando necessário, era administrada nova injeção endovenosa de Valium[®] diluído em solução salina isotônica.

Esta seqüência tinha como objetivo diminuir a possível reação de defesa apresentada pelo animal, que levaria à queda da pressão arterial sistêmica e parada do fluxo urinário ou da filtração glomerular.

Com o animal em sono anestésico iniciava-se o procedimento cirúrgico. Era, a princípio, canulada a traquéia, utilizando-se cânula de polietileno PE-90. A seguir dissecava-se a veia jugular direita e nela se implantava uma cânula de polietileno PE-50. Através esta cânula era infundida uma solução de glicose isotônica*** acrescentada de 17 mEq/l de

* Cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona - Roche

** Pentobarbital sódico - Abott.

*** J.P. - Indústria Farmacêutica.

NaHCO_3^- e 10 mEq/l de KCl (solução balanceada). De início o fluxo de infusão era da ordem de 130 $\mu\text{l}/\text{min}$ e visava a reposição de líquido para compensar perdas cirúrgicas. Para este procedimento utilizou-se uma bomba de perfusão peristáltica, de fluxo regulável*.

No próximo passo, dissecava-se a artéria carótida esquerda, canulando-a com catéter de polietileno PE-10. Em seguida coletava-se uma amostra de 1,0 ml de sangue em tubo heparinizado, que indexávamos So. A cânula era então conectada a um manômetro de mercúrio** para registro periódico da pressão arterial. O catéter arterial era perfundido com solução de heparina*** sempre que se utilizava para coletar amostras de sangue. Esta solução era preparada aspirando-se e expulsando cerca de 0,2 ml de heparina em uma seringa de 5,0 ml, de forma a ficar apenas um filme do anticoagulante em seu interior; a seguir completava-se o volume da seringa com solução salina isotônica.

Dissecava-se, então, a artéria femural esquerda e por ela introduzia-se um catéter de polietileno PE-10 que, atingindo a artéria aorta, era levado até acima da emergência das artérias renais.

O comprimento do catéter, desde o ponto de introdução na artéria femural até sua extremidade distal na artéria aorta, foi calculado em 9 cm em média, para a maioria dos animais. A posição do catéter e seu comprimento foram deter-

* Harvard Apparatus

** C.F. Palmer

*** Ljquemine - Roche

minados em estudo radiográfico com injeção de contraste iodado* pela cânula arterial. Na radioscopia e nas radiografias verificou-se que a extremidade distal do catéter se situava logo abaixo do diafragma e a contrastação da bexiga urinária se dava em poucos minutos. Por este catéter, assim posicionado, era infundido SAF ou SCN na dose de 0,3 ml dos soros, diluídos para 3,0 ml em solução salina isotônica. A infusão era feita por bomba de perfusão peristáltica regulada para um fluxo de 100 μ l/min. A infusão lenta do SAF permitiu a administração de dose próxima à letal sem que houvesse o choque citotóxico. Esta técnica foi por nós modificada a partir de trabalho de SPEAR de 1955 (42).

Terminada a injeção do anti-soro o catéter era removido e a artéria femural ligada.

Dissecava-se, então, os ureteres que recebiam cateterização com tubo de polietileno PE-10. Através estas cânulas ureterais seriam colhidas as amostras de urina. Os animais recebiam, nesta fase, injeção "prime" de uma solução de inulina** a 1,0 g% e ácido p-amino-hipúrico (PAH)*** a 2 mg/ml. O solvente desta solução era o líquido balanceado já referido. O volume da solução "prime" era de 1,25 ml para todos os animais utilizados.

Simultaneamente, a solução de infusão mantida no catéter jugular era substituída por outra que denominamos manutenção A (MA). Esta solução continha 2,3 g% de inulina e 2,4 mg/ml de PAH diluídos em solução isotônica de glicose acres-

* Hypaque - Winthrop Products Inc.

** Carlo Erba

*** Sigma Chemical Company

cida de eletrólitos como a anterior. O fluxo de infusão era mantido em 130 μ l/min.

Trinta minutos após a injeção "prime" iniciava-se o primeiro período experimental (I). Assim, coletava-se urina através os catéteres ureterais num período de 30 minutos. Na metade do período experimental, ou seja 15 minutos após seu início, colhia-se uma amostra de 1,0 ml de sangue pelo catéter da carótida. As amostras de sangue e urina eram indexadas como S_1 e U_1 , respectivamente. No início e no final do período I media-se a pressão arterial sistêmica do animal.

Terminado o período I, a solução de manutenção A era substituída por outra com concentração de inulina e PAH 10 vezes menor (manutenção B). Esta solução de manutenção B tinha seu fluxo de infusão 10 vezes maior que a anterior, ou seja, 1,3 ml/min.

Trinta minutos após o princípio da infusão da solução de manutenção B iniciava-se o segundo período experimental (II). As coletas de sangue (S_2), urina (U_2) e medidas de pressão arterial neste período eram realizadas da mesma forma como no período I. A duração neste período experimental também era de 30 minutos.

As amostras de sangue eram centrifugadas para separação do plasma. Então plasma e urina eram congelados a -20°C até as dosagens.

Findo o segundo período experimental, os animais eram sacrificados por injeção, em dose letal, da solução anestésica. Os rins eram retirados e fixados em solução de forma

lina a 10% ou congelados em nitrogênio líquido e conservados a -70°C , para estudos morfológicos.

Alguns animais eram perfundidos com solução PBS pH 7,4, para lavagem dos rins antes de serem removidos. A perfusão era feita através do ventrículo esquerdo onde entrava a solução PBS e átrio direito por onde saía o fluido de lavagem.

O delineamento gráfico do protocolo experimental se encontra no apêndice.

8. MEDIDAS DE FUNÇÃO RENAL.

8.1. Fluxo urinário

O fluxo urinário nos períodos experimentais I e II foi calculado a partir do volume urinário, determinado por gravimetria e pela duração destes períodos (30 minutos). Considerou-se como fluxo urinário do período, o fluxo médio assim calculado.

8.2. Dosagens de sódio e potássio

As concentrações de sódio e potássio em plasma e urina foram determinadas por fotometria de chama*.

* IL Flame Photometer - Mod. 443

8.3. Dosagem de Osmolaridade

As concentrações osmolares de plasma e urina foram determinadas com um osmômetro "Osmette mod. 2007"*.

8.4. Dosagens de inulina e PAH

As concentrações de inulina e PAH em plasma e urina foram medidas por métodos colorimétricos. Os métodos utilizados nestas dosagens, por serem modificados, serão descritos em apêndice próprio.

8.5. Cálculos dos parâmetros de função renal

Os parâmetros de função renal apresentados nos resultados foram calculados a partir de fórmulas que se encontram relacionadas em apêndice próprio.

9. ESTUDOS MORFOLÓGICOS

9.1. Histologia clássica

Os cortes de rins fixados em solução de formalina a 10% foram incluídos em parafina, cortados em micrôtomos na

* Precision Systems

espessura de 4 μm e corados com hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff (PAS) e coloração tricrômica de Masson.

9.2. Imunofluorescência

Secções transversais dos rins foram congeladas em nitrogênio líquido e conservadas em congelador a -70°C até o processamento para imunofluorescência.

Os espécimes foram cortados em criótomo na espessura de 4,0 μm . Três procedimentos em imunofluorescência foram realizados:

9.2.1. Imunofluorescência direta

9.2.1.1. Cortes de tecido renal de cobaia normal sem nenhum tratamento por anti-soros, foram incubados com SAF e SCN conjugados ao FITC. A incubação foi de 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Os soros conjugados estavam diluídos em azul de Evans 0,01% em proporções iguais, volume a volume. Após a incubação o material foi lavado três vezes em PBS pH 7,2 e uma vez em água destilada. As lâminas foram montadas em glicerina tamponada pH 8,4.

9.2.1.2. - Cortes de rim de cobaia, que receberam tratamento segundo o protocolo experimental já descrito, foram incubados com o soro de cabra caracterizado abaixo. Os rins provinham de animais que receberam SCN ou SAF, por via arterial. Incubação, lavagem e montagem das lâminas procedeu-se como anteriormente descrito.

9.2.2. Imunofluorescência indireta

9.2.2.1. - Incubou-se cortes de rim de cobaia normal, sem nenhum tratamento por anti-soros, com SAF ou SCN não conjugados. A incubação foi em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. O material foi lavado três vezes em solução PBS pH 7,2 e uma vez em água destilada. Estes cortes, assim tratados, foram submetidos a um soro de cabra anti globulina de coelho, absorvido em rim de cobaia. O soro de cabra, conjugado ao FITC, estava diluído em azul de Evans 0,01% na proporção 1:40, volume a volume. Incubação, lavagem e montagem das lâminas foram feitos como descrito anteriormente.

10. PESQUISA DE ANTÍGENO DE FORSSMAN NO SÔRO DE COBAIA

Foram empregados três métodos:

10.1. Imunodifusão em gel

A técnica empregada foi a de Cuchterlony (38). O gel foi preparado com agarose* 1%, em solução de salina fisiológica acrescido de solução tampão de fosfato pH 8,0. O pH final do gel era 7,4. O gel foi transferido para uma placa de Petri e após seu resfriamento foram feitos três poços guardando distância de 0,7 cm entre sí, dispostos como os vértices de um triângulo equilátero. Em um dos poços o considerado central, foi colocado sôro de cobaia normal e nos outros dois poços SAF e SNC respectivamente. A leitura do resultado foi feita após 48 horas.

10.2. Imunoeletroforese

A análise imunoeletroforética foi feita de acordo com a técnica de GRABAR & WILLIAMS (39), conforme modificação proposta por SCHEIDEGGER (40). Empregou-se gel de agarose** em tampão Veronal pH 7,2 e aplicou-se corrente elétrica de 5 mA por lâmina de 2,5 x 7,5 cm. No poço central foi colo

* Sigma Chemical Company
** Sigma Chemical Company

cado sôro de cobaia normal e nos poços laterais SAF e SCN respectivamente.

10.3. Fixação de Complemento

Foi executada uma prova de fixação de complemento em que foram confrontados os antisoros SAF e SCN com sôro normal de cobaia. O teste foi feito com 0,1 ml de solução contendo 6 unidades de complemento. O sôro de cobaia normal forneceria o complemento e o antígeno de Forssman se a reação fosse positiva. A incubação dos soros foi de 60 minutos a 37°C e a da hemólise de 30 minutos a 37°C. A técnica utiliza

III - R E S U L T A D O S

1. CARACTERIZAÇÃO DOS SOROS SAF E SCN

Para a utilização segura do SAF na obtenção de lesão renal e do SCN como seu controle houve a necessidade de definir seus títulos hemolíticos, doses letais e capacidade de se ligar a tecido renal de cobaia.

1.1. Títulos hemolíticos

O SAF, obtido como já descrito, apresentou título hemolítico 1:2000. O soro com este título permitiria obter lesões em cobaias quando volumes relativamente pequenos de soro fossem injetados nestes animais. O SCN foi absorvido em estroma de hemácias de carneiro, portanto antígeno de Forssman, para se subtrair possíveis anticorpos heterófilos naturais. A absorção se mostrou eficaz, uma vez que testa da a capacidade hemolítica do SCN esta se igualou a zero.

1.2. Determinação da dose letal mínima de SAF para cobaias

A dose letal deste SAF foi determinada como sendo 0,2 ml para cobaia de 250 e 300 g, quando o anti-soro era injetado endovenosamente. No teste utilizado, os animais que receberam doses de 0,2 ml, 0,3 ml e 0,6 ml de SAF morreram em choque característico em tempos que variaram de 5 a 20 minutos a algumas horas.

O tempo para a morte da cobaia foi inversamente proporcional à dose do anti-soro. Os animais que receberam 0,1 ml do SAF não morreram, apesar de mostrarem leves sinais da atuação do anti-soro. Os animais que foram submetidos a injeção de SCN, nas doses correspondentes aos que receberam SAF, não apresentaram sinais de lesão por anticorpo heterófilo.

1.3. Capacidade dos anti-soros de se ligarem a tecido renal de cobaia

A capacidade de os soros SAF e SCN se ligarem a tecido renal de cobaia foi verificada através de métodos de imunofluorescência. Assim, pode-se observar

nas Figuras 1A e 1B a presença de fluorescência no glomérulo renal, localizada principalmente no citoplasma das células endoteliais e possivelmente na matriz mesangial. As Figuras 2A e 2B mostram, respectivamente, a presença de material fluorescente nos túbulos coletores. Esta fluorescência é mais intensa que nos glomérulos, e como nestes, está situada fundamentalmente no citoplasma das células. Os núcleos destas células, bem como nos glomérulos, não se apresentam fluorescentes e aparecem como imagens negativas.

Verifica-se, também, fluorescência em vasos, nas células endoteliais e fibras musculares (Figura 3).

Os controles dos testes de imunofluorescência se revelaram não fluorescentes, tanto em relação aos glomérulos quanto aos tubos coletores.

A utilização de todos estes testes, revelou que o SAF empregado era rico em anticorpos hemolíticos, capaz de matar cobaia quando injetado endovenosamente na dose adequada e capaz de se fixar ao tecido renal daqueles animais. Em contrapartida o SCN se mostrou, como soro testemunho, bastante confiável e seguro já que não continha indícios de anticorpos heterófilos.

FIGURA 1A - Rim de cobaia normal. Imunofluorescência direta com soro anti-Forsman marcado com FITC. Região cortical mostrando glomérulos pouco fluorescentes. (124x).

FIGURA 1B - Rim de cobaia normal. Imunofluorescência indireta. Glomérulo mostrando fluorescência no endotélio capilar e na região mesangial. (640x).

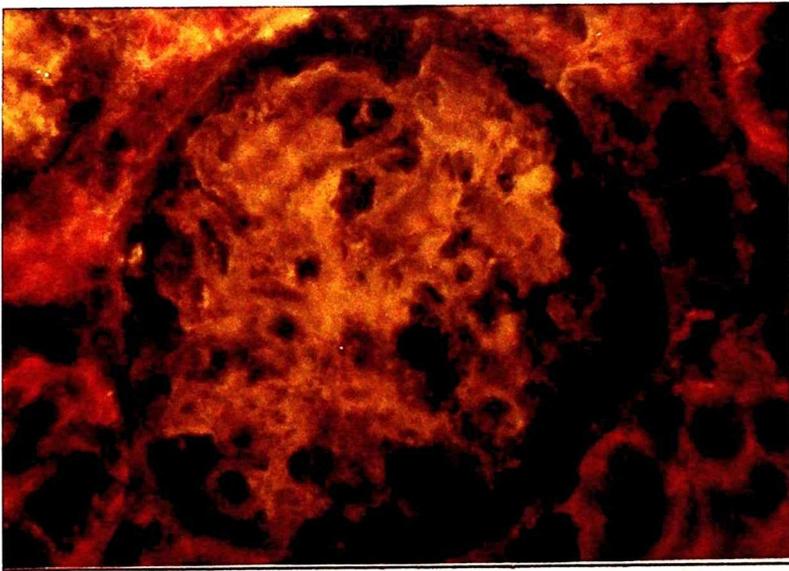
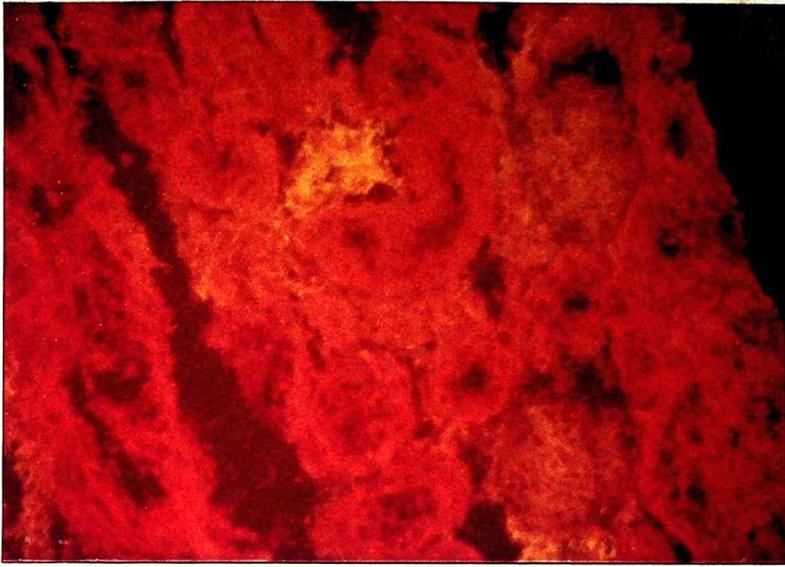
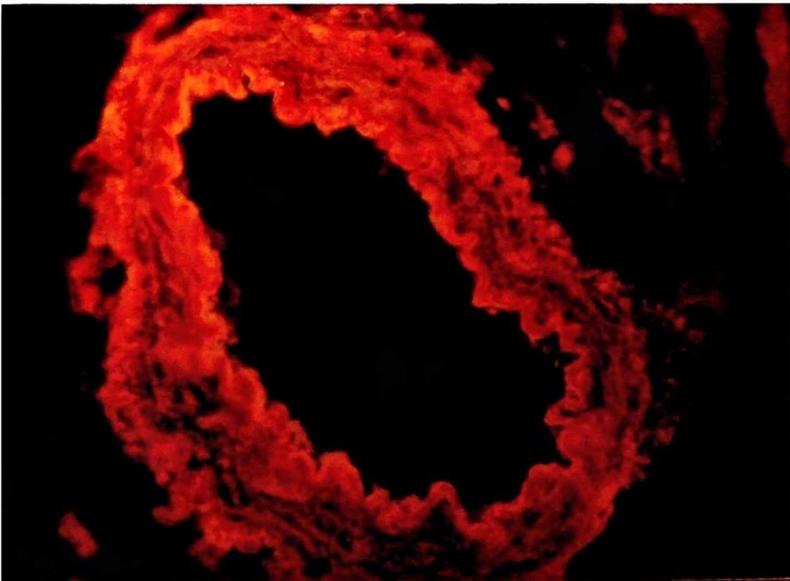
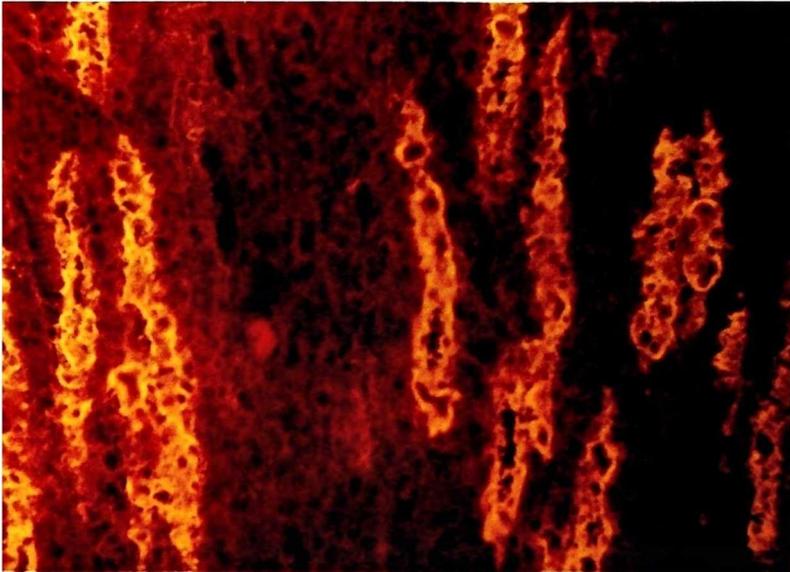
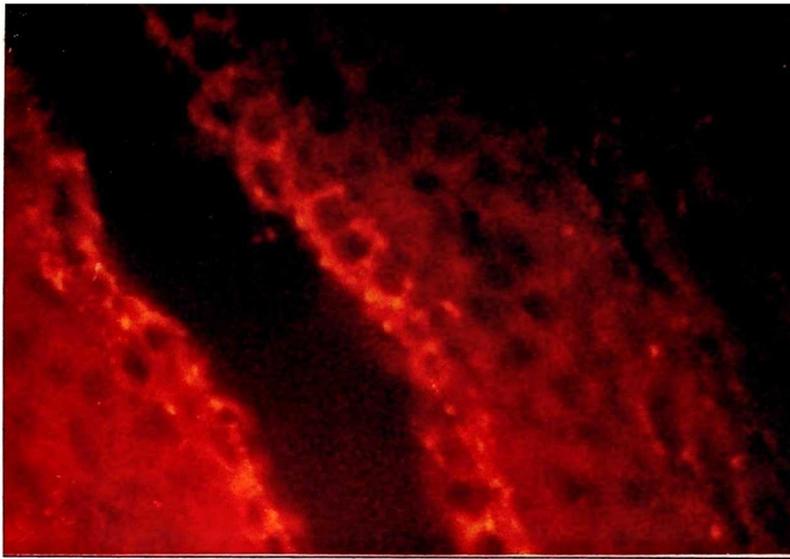


FIGURA 2A - Rim de cobaia normal. Imunofluorescência direta com soro anti-Forsman marcado com FITC. Tubo coletor medular com fluorescência no citoplasma das células. (504x).

FIGURA 2B - Rim de cobaia normal. Imunofluorescência indireta. Tubos coletores medulares com fluorescência no citoplasma das células. (160x).

FIGURA 3 - Rim de cobaia normal. Imunofluorescência indireta. Artéria apresentando fluorescência nas células endoteliais e fibras musculares. (320x).



2. PESQUISA DE ANTÍGENO DE FORSSMAN NO SÔRO DE COBAIA NORMAL

É conhecida a ausência de antígeno de Forssman em eritrócitos de cobais (11), porém a presença deste antígeno no sôro de cobaia normal, em forma solúvel, necessitou ser testada. A presença deste imunógeno no sôro dos animais que receberiam SAF promoveria a interação antígeno-anticorpo e os imunocomplexos formados poderiam ser patogênicos.

Foram realizados 3 testes para esta verificação. A imunodifusão em gel - Ouchterlony - e a imunoeletroforese não evidenciaram linhas de precipitação entre o sôro normal de cobaia e os antisoros SAF e SCN.

O teste de fixação de complemento mostrou como resultado hemólise maior que 90% em todas as diluições, tanto para SAF quanto para SCN.

Com estes resultados verificou-se a ausência de antígeno de Forssman em sôro de cobaia normal em forma solúvel.

3. ESTUDO DE FUNÇÃO RENAL

Os experimentos de acordo com o protocolo experimental, descrito em Material e Métodos, permitiram a avaliação de uma série de parâmetros de função renal.

A coleta destas informações objetivou a identificação de possíveis lesões, provocadas pelo SAF em cobaia, que

pudessem se refletir como alterações de função renal. Assim, os testes efetuados possibilitaram avaliar a integridade ou lesão do nefron em suas diversas unidades, desde glomérulos até tubos coletores.

Os valores encontrados para os parâmetros de função renal analisados nos períodos experimentais I e II são apresentados nas Tabelas 1 e 2 e em forma gráfica.

A Tabela 1 apresenta os valores de função renal para o grupo de animais considerado controle que receberam SCN e, Tabela 2, para os animais injetados com SAF. Cada parâmetro de função renal considerado tem representação gráfica correspondente e os resultados apresentados individualmente. Os conjuntos de medidas foram analisados por método estatístico não paramétrico - teste de Willcoxon-Mann-Whitney (41).

3.1. Medidas de fluxo urinário

Foram efetuadas medidas de fluxo urinário nos períodos experimentais I e II, nos grupos de animais SCN e SAF. Os resultados foram expressos em ml/min e corrigidos pelo peso dos animais.

Não se verificaram diferenças significativas nos fluxos urinários, entre os animais controle e experimentais, em nenhum dos períodos analisados (Figura 4).

TABELA 1 - Parâmetros de função renal das cobaias injetadas com soro de coelho normal (SCN) nos períodos experimentais I e II

Período Experimental Animal	Fluxo Urinário (ml/min/kg)		Cosm (ml/min/kg)	C _{H₂O} (ml/min/kg)		T _{H₂O} ^C (ml/min/kg)	RSSD Z	EF _{H₂O} Z		EF _K Z		EF _{Na} Z		FG (ml/min/kg)	FPR (ml/min/kg)
	1	2		1	2			1	2	1	2	1	2		
35	0,066	2,555	0,321	2,310	0,345	0,254	5,30	0,73	40,49	30,21	84,21	0,72	9,68	9,07	26,34
37	0,067	2,354	0,293	2,166	0,189	0,226	3,91	0,83	42,92	13,99	74,25	0,52	10,9	8,14	22,80
39	0,052	2,332	0,246	2,028	0,304	0,194	5,92	0,72	44,64	18,35	83,04	0,97	9,42	6,80	8,49
43	0,189	3,043	0,376	2,574	0,469	0,187	7,24	1,63	35,21	13,18	59,15	0,96	10,49	11,60	22,00
45	0,036	2,066	0,168	1,594	0,472	0,132	7,46	0,66	45,45	34,13	118,18	0,55	10,00	5,40	16,50

TABELA 2 -Parâmetros de função renal das cobaias injetadas com soro anti-Forsman (SAF) nos períodos experimentais I e II

Período experimental Animal	Fluxo Urinário (ml/min/kg)		Cosm (ml/min/kg)		C_{H_2O} (ml/min/kg)		$T_{H_2O}^C$ (ml/min/kg)		RSSD %		EF_{H_2O} %		EF_K %		EF_{Na}		FG (ml/min/kg)		FPR (ml/min/kg)		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
36	0,061	2,824	0,299	2,570	0,254	0,237	3,55	0,66	54,05	26,01	117,29	0,72	14,97	7,14	5,23	11,16	18,68				
38	0,126	2,414	0,294	2,224	0,190	0,167	3,44	2,11	40,16	34,36	83,13	0,94	5,42	5,99	6,01	18,47	21,25				
40	0,032	2,222	0,117	2,113	0,088	0,084	1,44	0,77	33,78	42,93	86,82	0,30	5,64	4,22	6,66	10,07	19,55				
47	0,485	2,828	0,283	2,828	0,202	0,000	0,00	11,49	63,50	39,08	100,00	1,40	22,25	4,20	4,50	7,20	15,00				
48	0,156	2,360	0,312	2,021	0,329	0,160	5,42	2,54	66,67	44,53	146,67	1,12	15,20	6,10	3,60	18,40	20,10				
49	0,038	1,986	0,173	1,885	0,102	0,135	1,63	0,72	52,63	39,64	152,63	1,15	10,53	5,40	3,80	15,50	17,10				

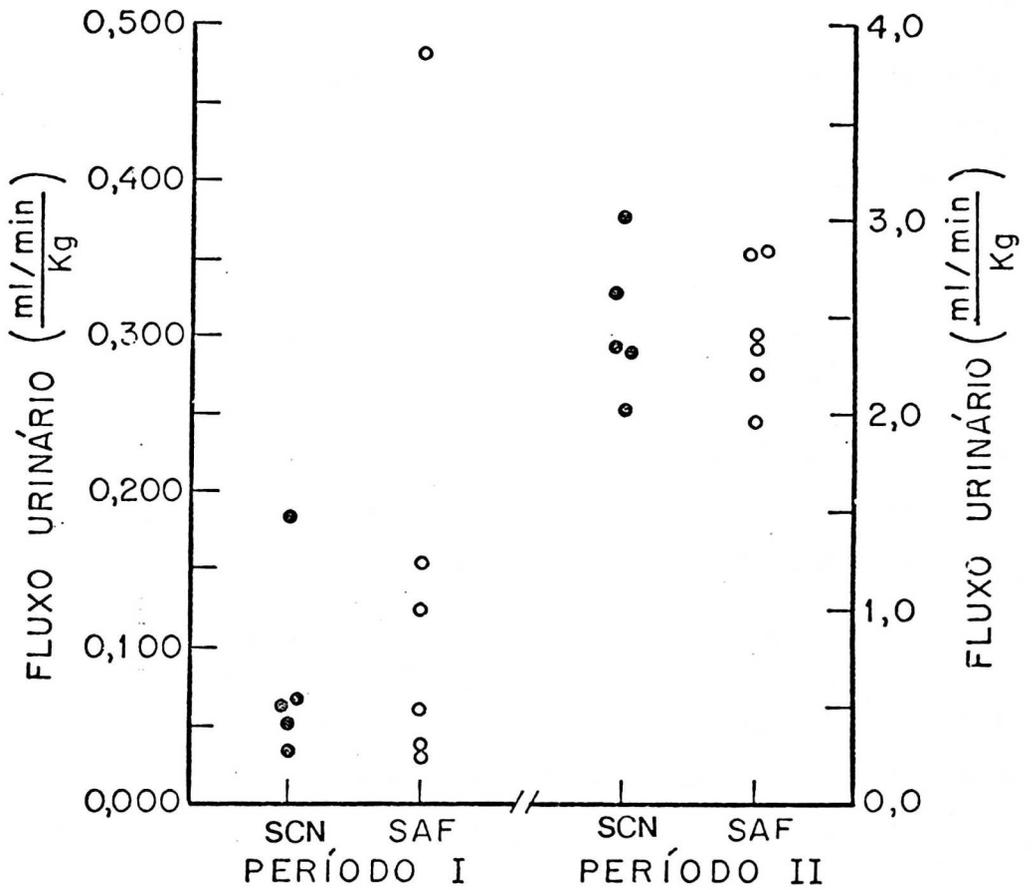


FIGURA 4 - Representação gráfica dos valores de fluxo urinário nos períodos experimentais I e II, para cobaias injetadas com soro de coelho normal (SCN) ou soro anti-Forssman (SAF).

3.2. Medidas de "clearance" osmolar (C_{Osm})

As medidas de C_{Osm} foram apresentadas em ml/min corrigidos pelo peso dos animais. Tem a representação gráfica na Figura 5, que mostrou não haver diferenças significativas entre os valores obtidos.

3.3. Medidas de reabsorção de água livre ($T_{H_2O}^C$)

Valores para $T_{H_2O}^C$ só foram verificados no período experimental I, onde os animais receberam apenas reposição líquida correspondente às perdas cirúrgicas e fisiológicas. A unidade em que se expressou os valores de $T_{H_2O}^C$ foi ml/min. corrigidos pelo peso do animal. Os resultados de $T_{H_2O}^C$, apresentados na Figura 6, apesar de não se mostrarem estatisticamente diferentes, indicam tendência a uma menor reabsorção de água livre nos animais tratados com SAF e uma maior dispersão destes valores.

3.4. Medidas de "clearance" de água livre (C_{H_2O})

Os animais que receberam SCN ou SAF apresentaram C_{H_2O} no período experimental II. Apenas o animal 47, tratado com SAF, teve C_{H_2O} no período experimental I. A Figura 7 mostra o menor C_{H_2O} dos animais experimentais, em relação aos controles. Esta diferença é significativa quando analisada estatisticamente.

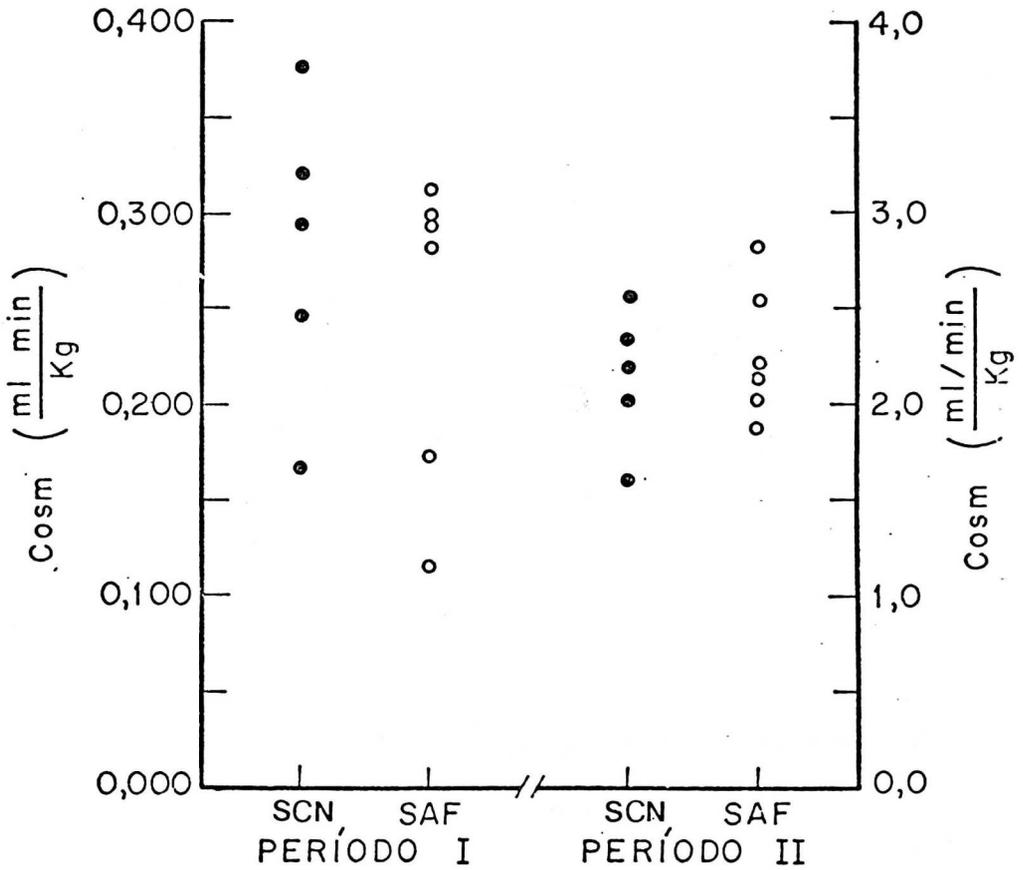


FIGURA 5 -- Representação gráfica dos valores de "clearance" osmolar (Cosm) nos períodos experimentais I e II, para cobaias injetadas com soro de coelho normal (SCN) ou soro anti-Forssman (SAF).

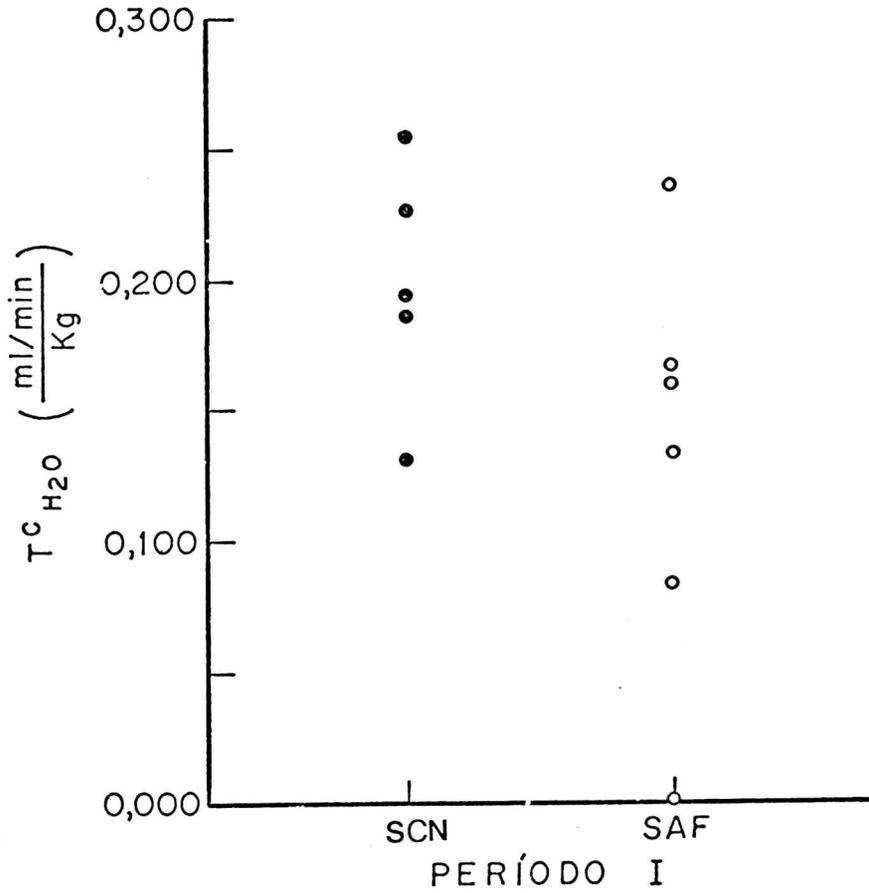


FIGURA 6 - Representação gráfica dos valores de reabsorção de água livre ($T^c_{H_2O}$) no período experimental I, para cobaias injetadas com soro de coelho normal (SCN) ou soro anti-Forssman (SAF).

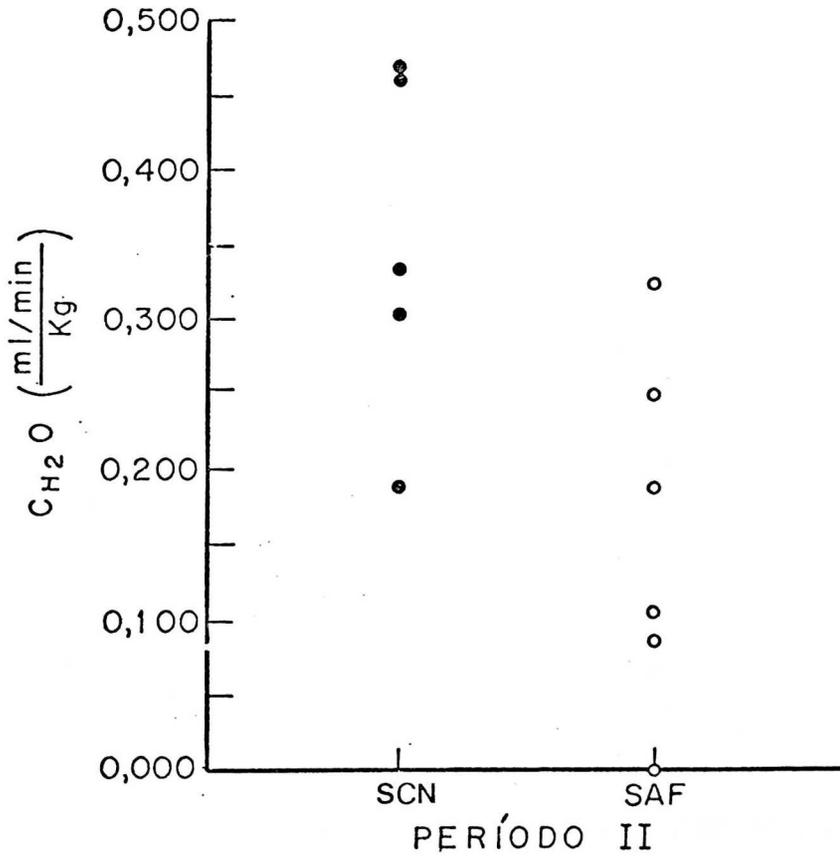


FIGURA 7 - Representação gráfica dos valores de "clearance" de água livre (C_{H2O}) no período experimental II, para cobaias injetadas com soro de coelho normal (SCN) ou soro anti-Forssman (SAF).

ticamente ($P < 5\%$)

Os valores de C_{H_2O} foram expressos em ml/min corrigidos pelo peso do animal.

3.5. Medidas da reabsorção de soluto no segmento diluidor do nefron (RSSD)

Este parâmetro foi calculado para o período experimental II, onde ocorre C_{H_2O} . A Figura 8 expressa graficamente os resultados, mostrando uma significativa diminuição da RSSD nos animais que receberam SAF, quando comparados com os controles ($P < 5\%$). Os valores de RSSD são calculados em porcentagem.

3.6. Excreção fracional de água (EF_{H_2O})

Os resultados obtidos para excreção fracional de água, expressos em porcentagem, revelam uma tendência a maior excreção nos animais tratados com SAF, em relação aos que receberam SCN.

A análise estatística não mostra significância, mas é possível observar-se uma maior dispersão destes valores quando comparados aos controles. Esta tendência é comum aos dois períodos experimentais (Figura 9).

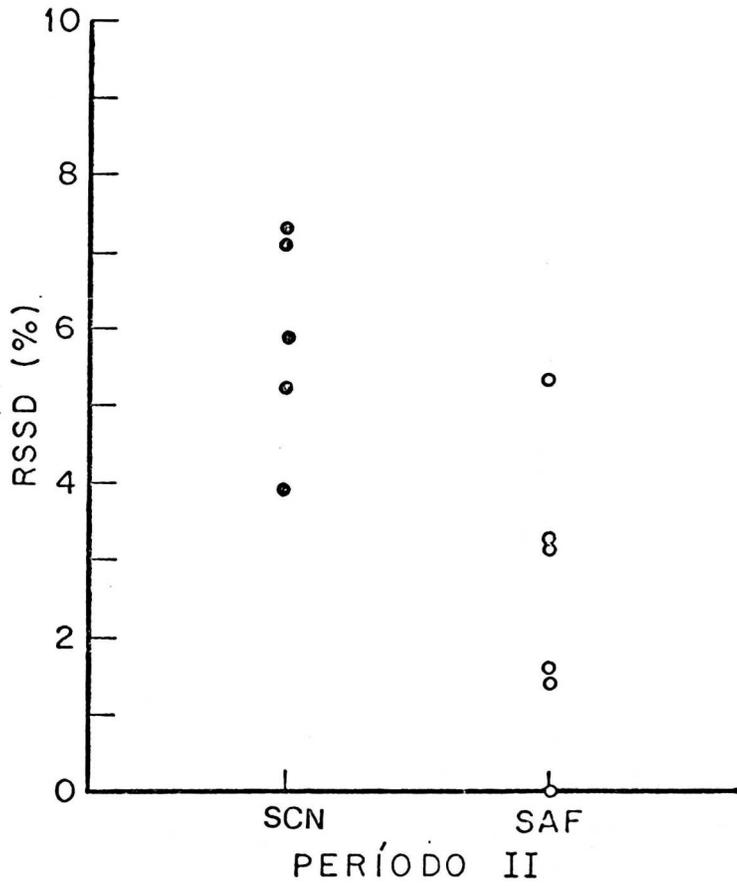


FIGURA 8 - Representação gráfica dos valores da reabsorção de soluto no segmento diluidor do nefron, alça ascendente de Henle (RSSD) no período experimental II, para cobaias injetadas com soro de coelho normal (SCN) ou soro anti-Forssman (SAF).

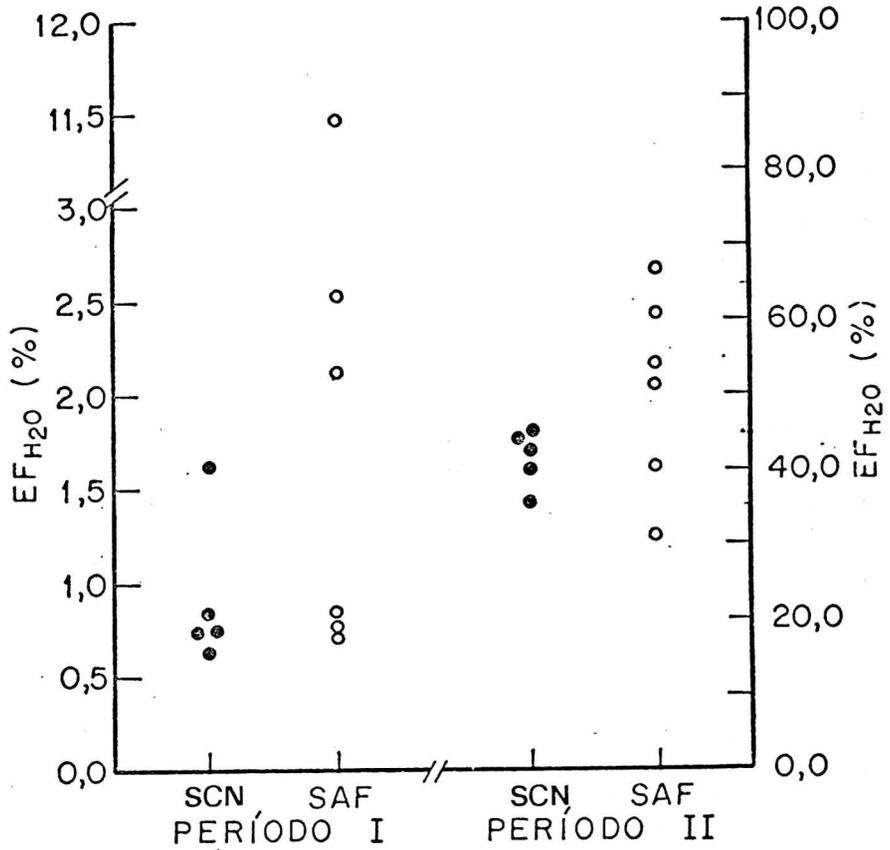


FIGURA 9 - Representação gráfica dos valores de excreção fracional de água (EF_{H_2O}) nos períodos experimentais I e II, para cobaias injetadas com soro de coelho normal (SCN) ou soro anti-Forssman (SAF).

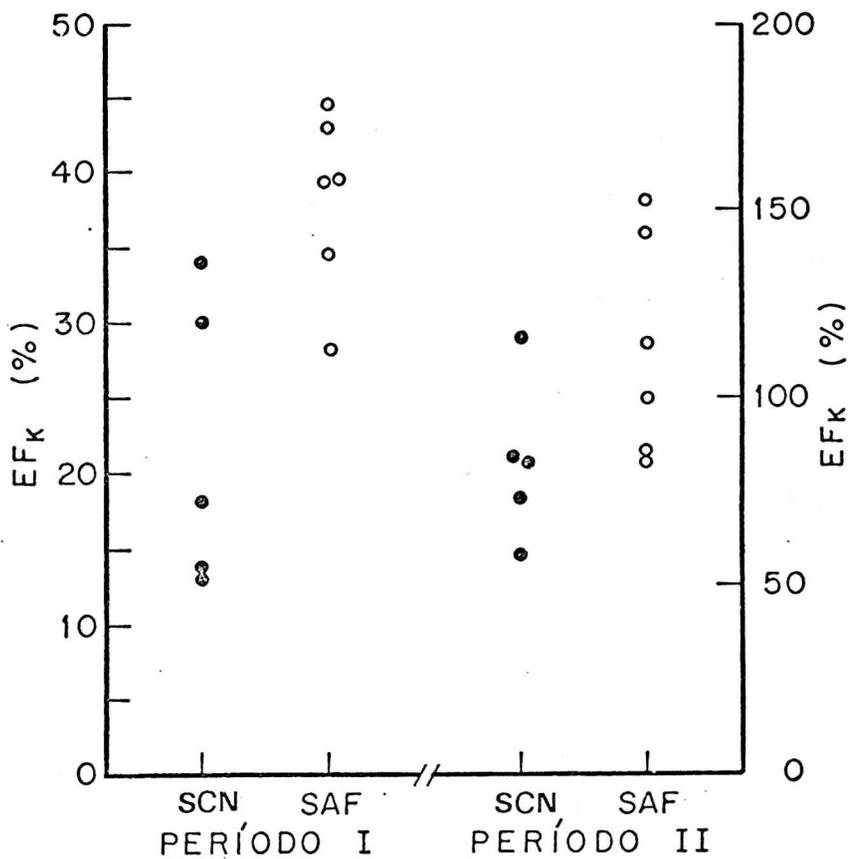


FIGURA 10 - Representação gráfica dos valores de excreção fracional de potássio (EF_K) nos períodos experimentais I e II, para cobaias injetadas com soro de coelho normal (SCN) ou soro anti-Forsman (SAF).

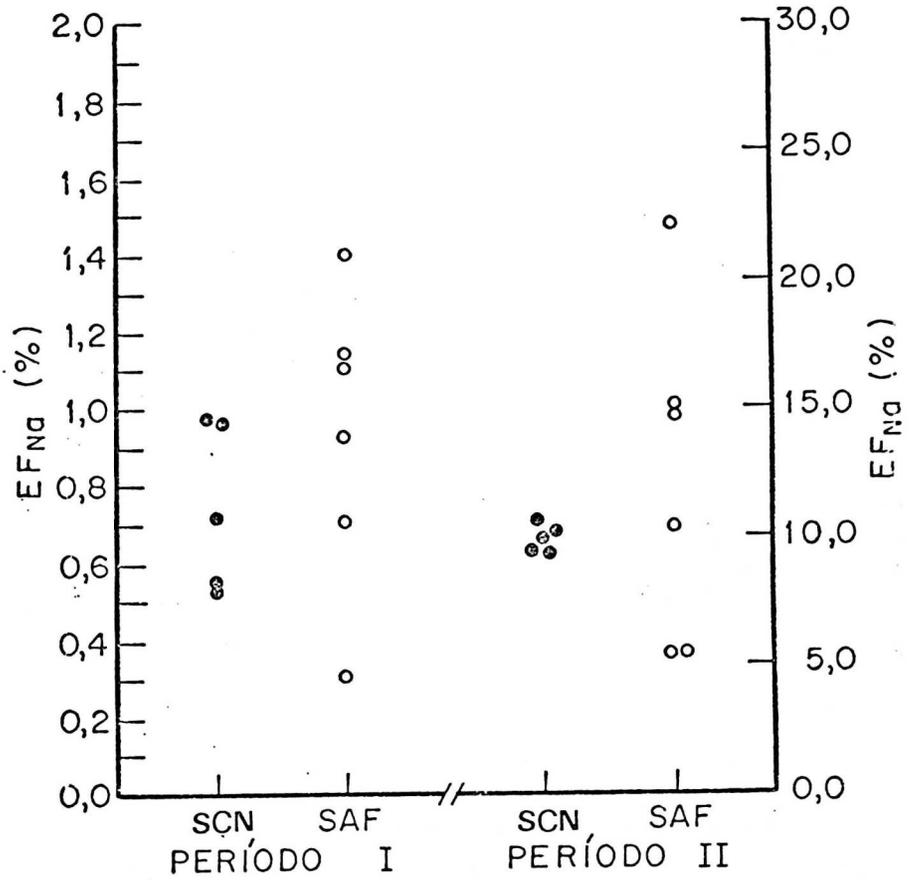


FIGURA 11 - Representação grãfica dos valores de excreção fracional de sódio (EF_{Na}) nos períodos experimentais I e II, para co-baias injetadas com soro de coelho normal (SCN) ou soro an-ti-Forssman (SAF).

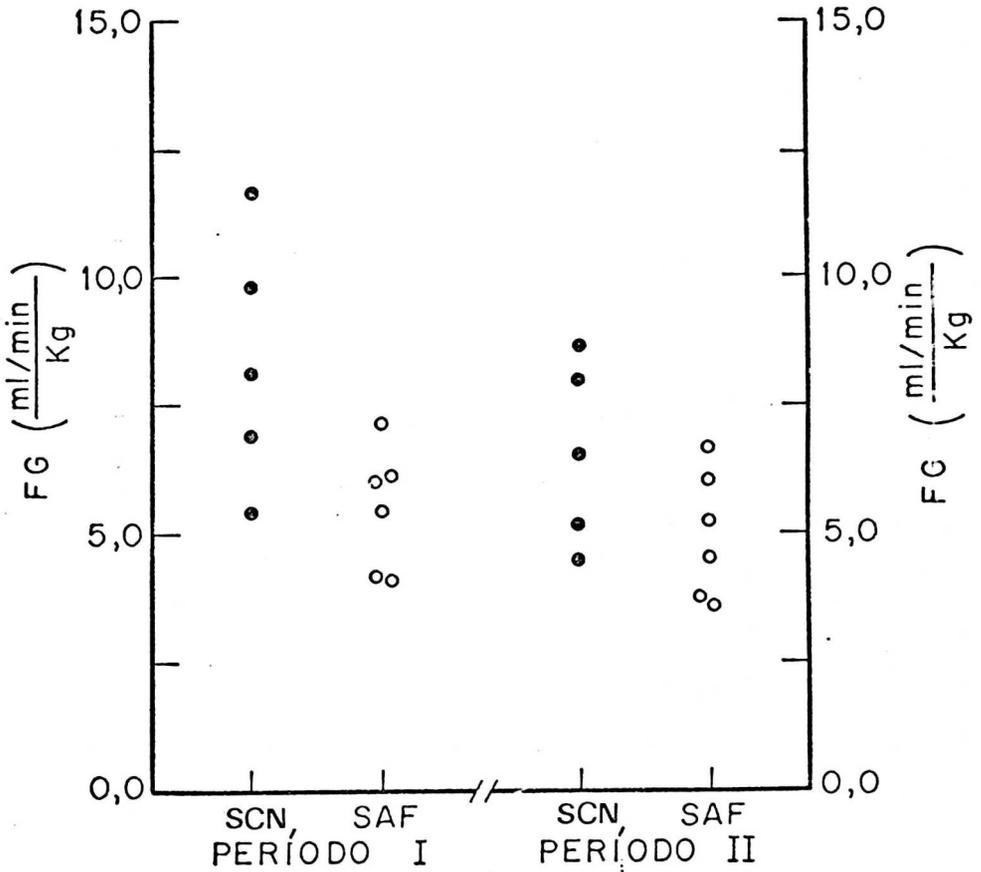


FIGURA 12 - Representação gráfica dos valores de filtração glomerular (FG) nos períodos experimentais I e II, para cobaias injetadas com soro de coelho normal (SCN) ou soro anti-Forsman (SAF).

3.7. Excreção fracional de potássio (EF_K)

Os valores, em porcentagem, para excreção fracional de potássio se encontram representados na Figura 10. No período experimental I ocorre maior EF_K nos animais do grupo SAF em comparação com os animais do grupo SCN. Este aumento é significativo estatisticamente a nível de $P < 5\%$. No período experimental II ainda há maior EF_K nos animais SAF e esta diferença é significativa a nível de $5\% < P < 10\%$.

3.8. Excreção fracional de sódio (EF_{Na})

A excreção fracional de sódio não se mostrou significativamente diferente entre os grupos de animais SAF e SCN. Pode-se observar, contudo, que há maior dispersão dos valores obtidos para EF_{Na} nos animais SAF em relação ao SCN (Figura 11). Os resultados de EF_{Na} foram expressos em porcentagem.

3.9. Medidas de filtração glomerular (FG)

Na Figura 12 se encontram representados os valores para filtração glomerular, em unidade ml/min corrigidos pelo peso do animal.

No período experimental I há uma redução de FG nos animais que receberam SAF, que é estatisticamente significativa.

mente significativa ($5\% < P < 10\%$). No período experimental II a tendência a menor FG nos animais SAF é ainda observada, embora não satisfazendo os mesmos níveis de significância estatística.

3.10. Medidas de fluxo plasmático renal (FPR)

Os resultados obtidos para fluxo plasmático renal, expressos em ml/min e corrigidos pelo peso do animal, não se mostraram diferentes nos animais SAF em relação aos animais SCN. Observa-se, entretanto, uma tendência a um FPR menor no grupo SAF, principalmente no período experimental I (Figura 13).

3.11. Medidas de pressão arterial sistêmica (PA)

As medidas de PA foram realizadas através um manômetro de mercúrio conectado à artéria carótida esquerda. Estes valores, expressos em mmHg, são apresentados nas Tabelas 3 e 4 e graficamente na Figura 14. Não houve diferença significativa entre os níveis de PA nos animais SAF em relação aos SCN, em nenhum dos períodos experimentais. Observa-se apenas uma discreta elevação nos níveis pressóricos dos animais no período experimental II, igualmente nos dois grupos de trabalho.

TABELA 3 - Valores de pressão arterial sistêmica das cobaias injetadas com soro de coelho normal (SCN), nos períodos experimentais I e II.

PAmHg Animal	PERÍODO I	PERÍODO II
35	124,0	132,0
37	112,0	134,0
39	119,0	126,0
43	148,0	160,0
45	141,0	158,0

TABELA 4 - Valores de pressão arterial sistêmica das cobaias injetadas com soro anti-Forssman, nos períodos experimentais I e II.

PAmHg Animal	PERÍODO I	PERÍODO II
36	106,0	128,0
38	118,0	143,0
40	108,0	132,0
47	158,0	173,0
48	128,0	148,0
49	148,0	143,0

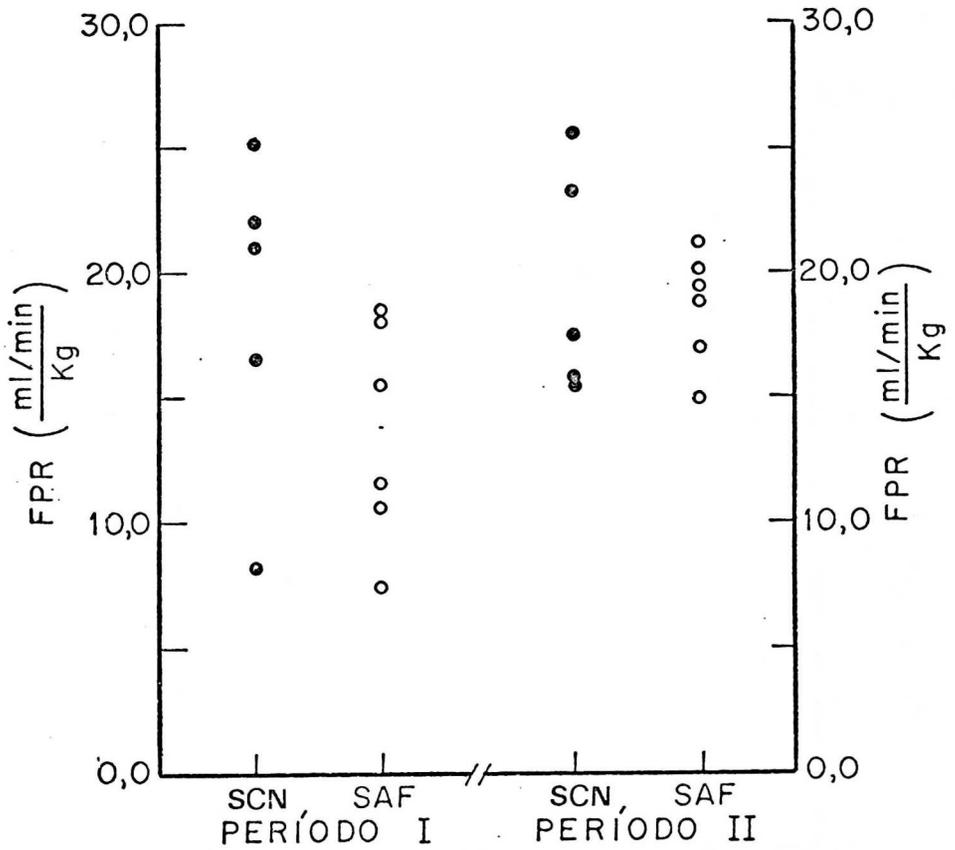


FIGURA 13 - Representação gráfica dos valores de fluxo plasmático renal (FPR) nos períodos experimentais I e II, para cobaias injetadas com soro de coelho normal (SCN) ou soro anti - Forsman (SAF).

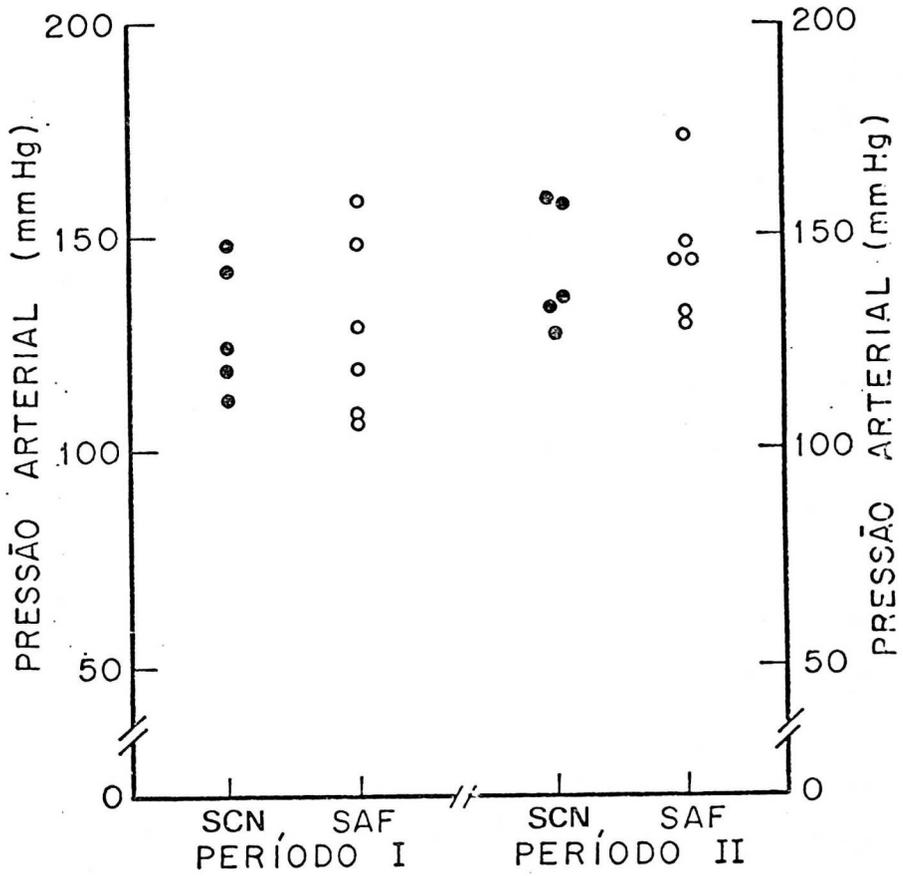


FIGURA 14 - Representação grãfica dos valores de pressão arterial sistêmica (PA) nos períodos experimentais I e II, para cobaias injetadas com soro de coelho normal (SCN) ou soro anti-Forsman (SAF).

4. ESTUDOS MORFOLÓGICOS

Os estudos morfológicos aqui referidos são relativos aos animais que sofreram tratamento segundo o protocolo experimental. Compreenderam estes estudos técnicas de histologia clássica com utilização de colorações de hematoxilina-eosina, PAS e tricrômico de Masson e técnica de imunofluorescência direta.

4.1. Histologia clássica

Foram analisados cortes dos rins dos animais que nos procedimentos segundo o protocolo experimental receberam tratamento com SAF ou SCN.

As preparações coradas pela hematoxilina-eosina permitiram verificar alterações glomerulares, tubulares e de vasos.

Os glomérulos dos animais injetados com SAF apresentaram-se, frequentemente, com aumento de celularidade a custa de células inflamatórias - polimorfonucleares neutrófilos e mononucleares. Os capilares glomerulares estavam com sinais de tumefação de células endoteliais. Na quase totalidade dos glomérulos destes animais o mesângio mostrava-se espessado.

Necrose focal foi achado frequente em glomérulos de todos animais injetados com SAF. O número de glomérulos com necrose focal bem como a intensidade desta lesão, apresentou variações entre os animais que receberam SAF. O número de

glomérulos com necrose focal bem como a intensidade desta le
são, apresentou variações entre os animais que receberam SAF.

Polimorfonucleares neutrófilos foram achados com
frequência na luz dos capilares glomerulares e na matriz me-
sangial. Outras células inflamatórias mononucleares foram
vistas no mesângio, em várias oportunidades.

Deposições de material amorfo acidófilo puderam ser
verificadas em capilares glomerulares e no espaço urinário
da cápsula de Bowman. Neste mesmo espaço, ocasionalmente, no
tava-se a presença de hemácias.

A análise dos tubos renais mostrou discretas altera-
ções. Havia raros cilindros hialinos, material amorfo acidó-
filo na luz tubular e algumas vezes verificava-se degenera-
ção hidrópica de células tubulares em tubos contornados pro-
ximais, distais e coletores.

Achado de moderada frequência foi uma exocitose nas
células de tubulos distais. O citoplasma destas células apre-
sentavam um desprendimento do seu polo apical.

Em um dos animais SAF se verificou a presença de
trombo em artéria arciforme e ramos, estendendo-se até arte-
ríolas interlobulares.

Estas alterações todas se mostraram variáveis em in-
tensidade e frequência nos vários animais SAF.

Os animais que receberam SCN mostraram algumas alte-
rações glomerulares e tubulares. Assim, verificou-se ocasio-

nal presença de material amorfo acidófilo no espaço urinário da cápsula de Bowman e raros polimorfonucleares neutrófilos na luz dos capilares glomerulares. Nos túbulos havia raros cilindros hialinos e material eosinofílico amorfo precipitado, provavelmente proteína. Estes animais não apresentaram tumefação de células endoteliais, necrose focal em glomérulos e espessamento mesangial.

As preparações que foram coradas com PAS e tricômico de Masson permitiram confirmar os achados descritos e acrescentaram novos subsídios.

Assim, os animais SAF apresentaram coloração PAS positiva mais intensa que os SCN, na região mesangial. Eventualmente verificava-se, nos animais SAF, a presença de grânulos PAS positivos no mesângio.

A coloração tricrômica de Masson mostrou que o interstício renal não se alterou em nenhum dos tratamentos, SAF ou SCN.

Foi verificada em glomérulos de animal SAF, a presença de depósitos globulares fucsínófilos no mesângio.

Todas as alterações referidas podem ser observadas nas Figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23.

FIGURA 15 - Rim de cobaia injetada com soro de coelho normal. Estrutura glomerular preservada. H.E. (504x).

FIGURA 16 - Rim de cobaia injetada com soro anti-Forssman. Glomêrulo apresentando necrose focal, reação mesangial, tumefação de células endoteliais e presença de polimorfonucleares neutrófilos. H.E. (504x).

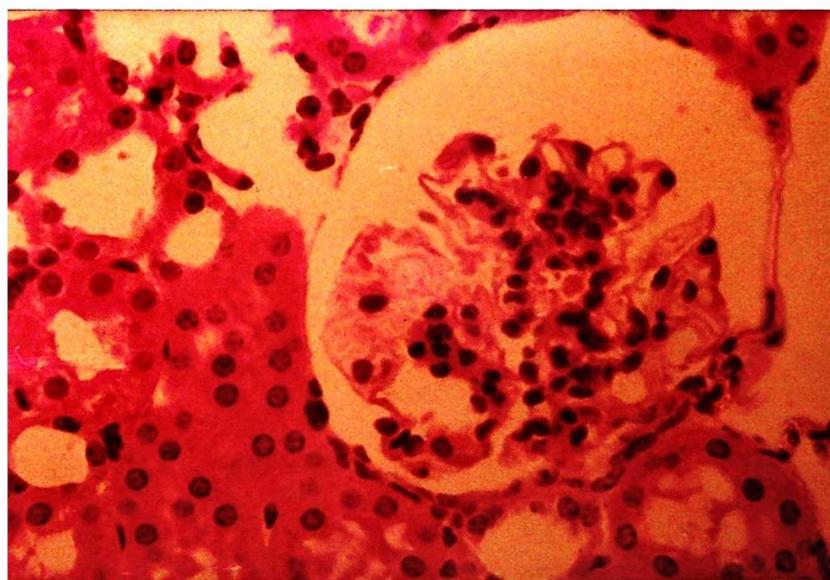
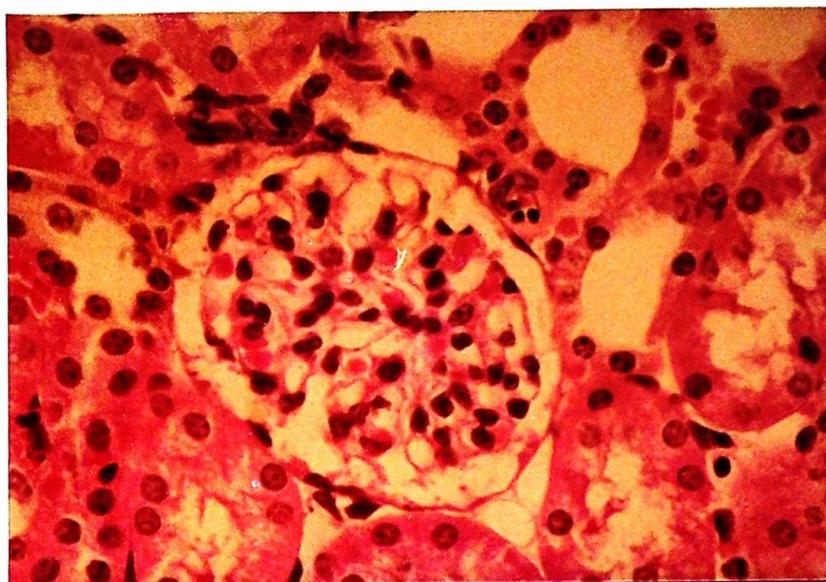


Figura 17 - Rim de cobaia injetada com soro anti-Forssman. Trombo em artéria arciforme. H.E. (200x).

FIGURA 18 - Rim de cobaia injetada com soro anti-Forssman. Região cortical apresentando exocitose do polo apical de células de tubo contornado distal. H.E. (800x).

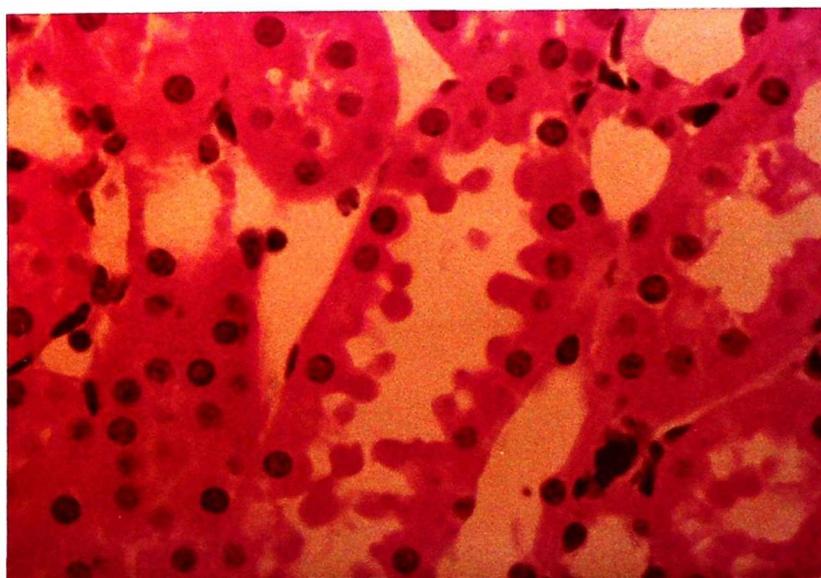
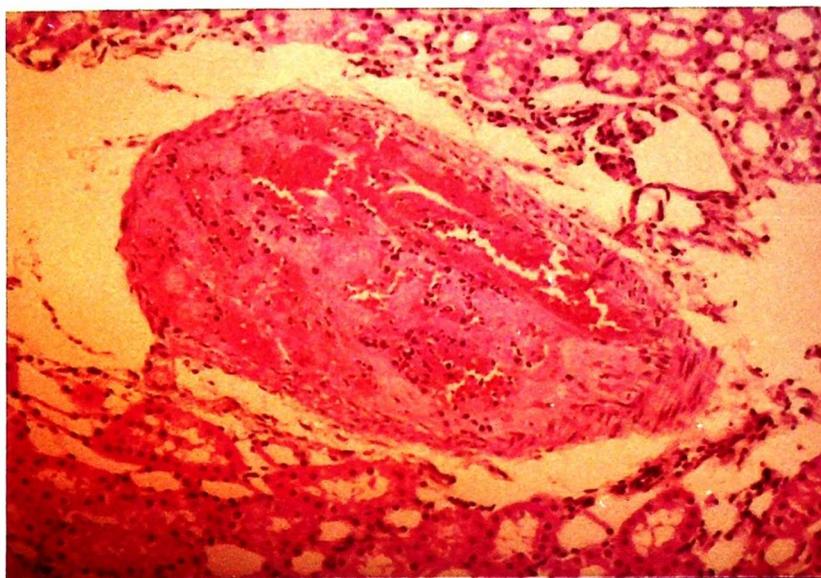


FIGURA 19 - Rim de cobaia injetada com soro de coelho normal. Estrutura glomerular preservada. P.A.S. (504x)

FIGURA 20 - Rim de cobaia injetada com soro anti-Forssman. Glomérulo com reação mesangial. P.A.S. (504x)

FIGURA 21 - Rim de cobaia injetada com soro anti-Forssman. Glomérulo com reação mesangial, apresentando deposições granulares de material PAS positivo (seta). P.A.S. (504x).

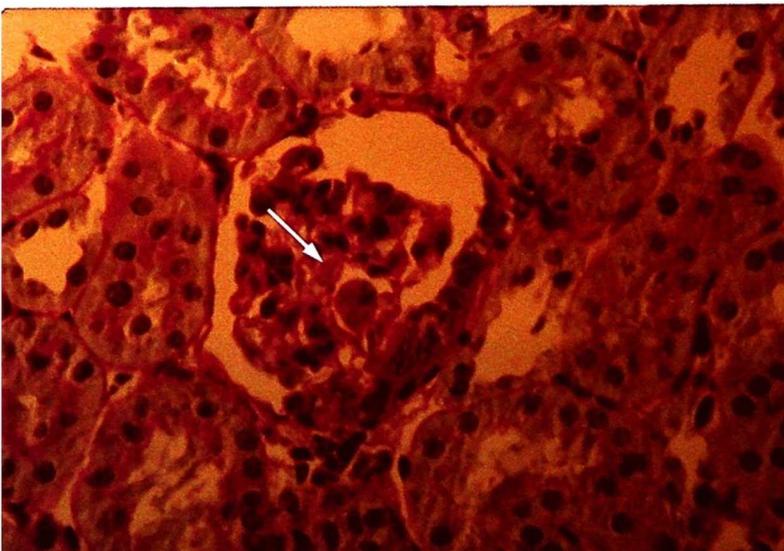
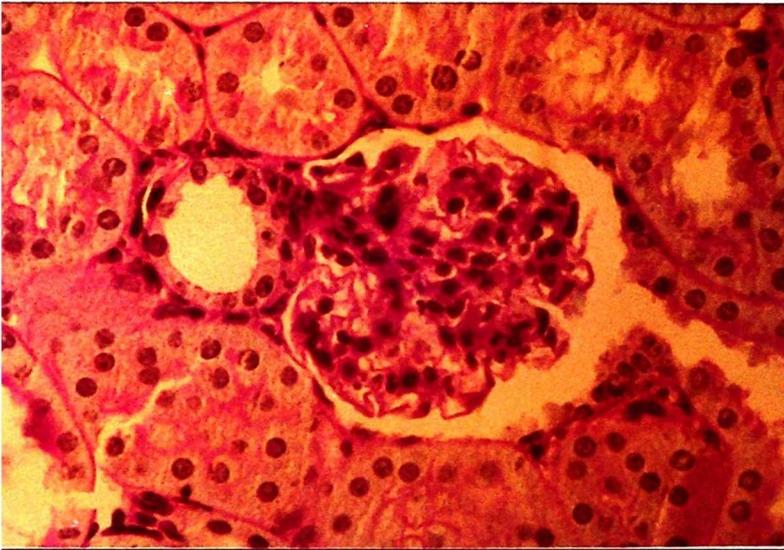
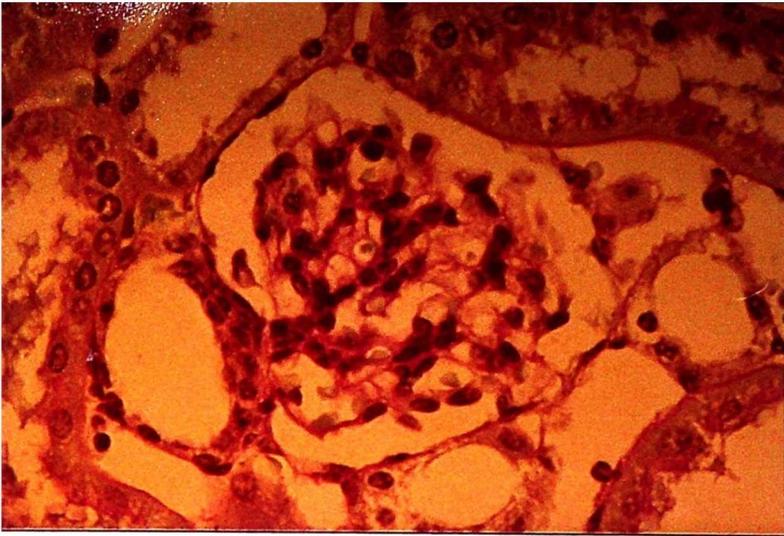
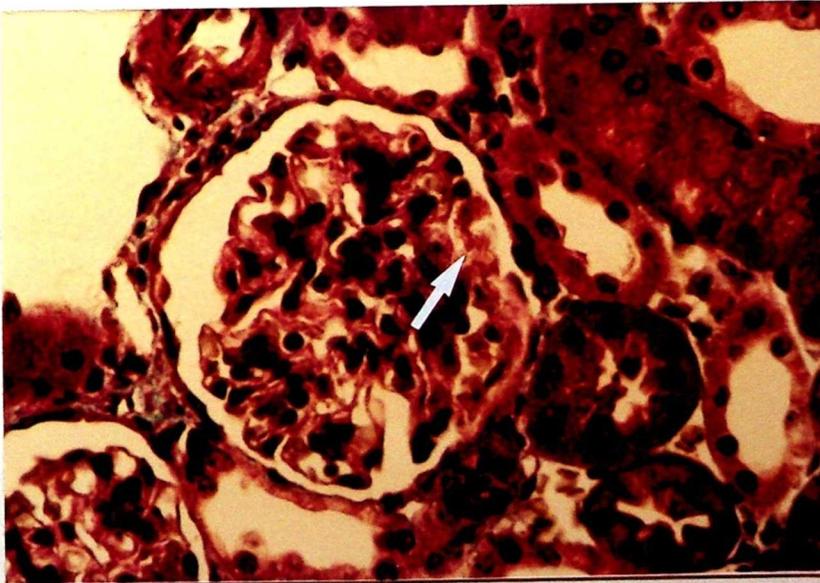
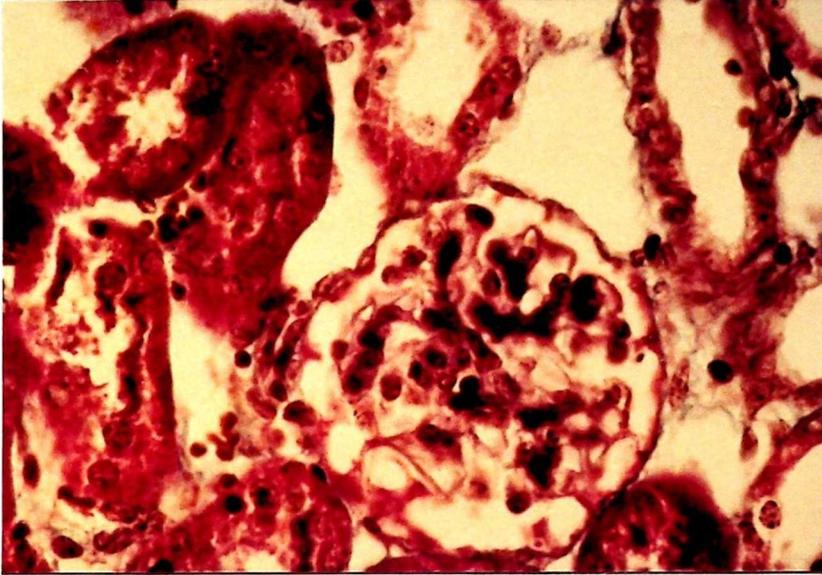


FIGURA 22 - Rim de cobaia injetada com soro de coelho normal. Estrutura glomerular preservada. Tric.Masson. (504x)

FIGURA 23 - Rim de cobaia injetada com soro anti-Forssman. Glomérulo com reação mesangial, apresentando deposições granulares de material fucsino-filo (seta). Tric.Masson. (504x)



4.2. Imunofluorescência

Os animais que receberam SAF e SCN, segundo o protocolo experimental, tiveram seus rins processados para técnicas de imunofluorescência direta, como descrito em Material e Métodos.

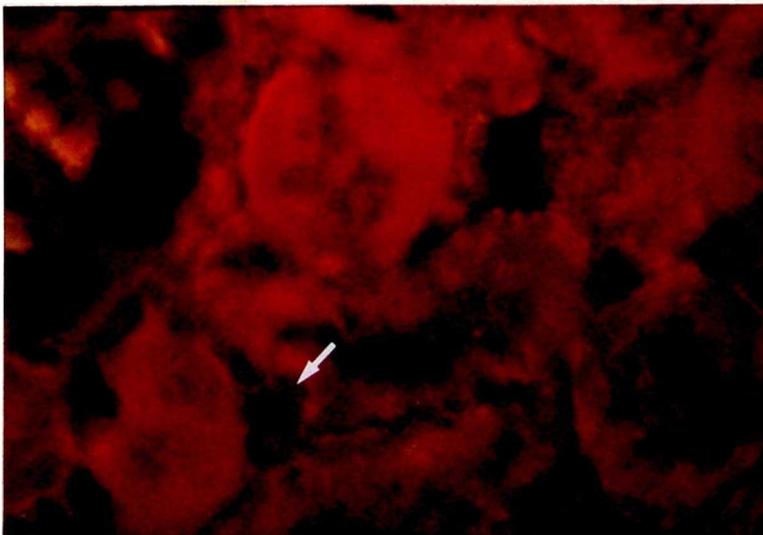
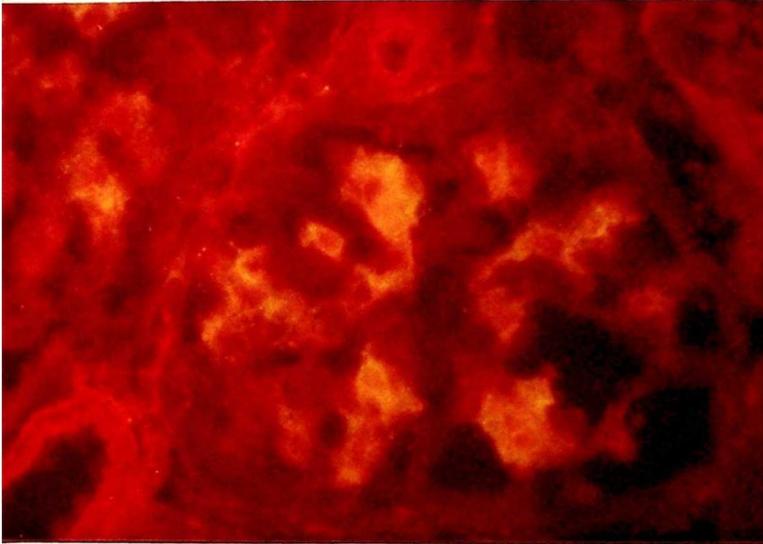
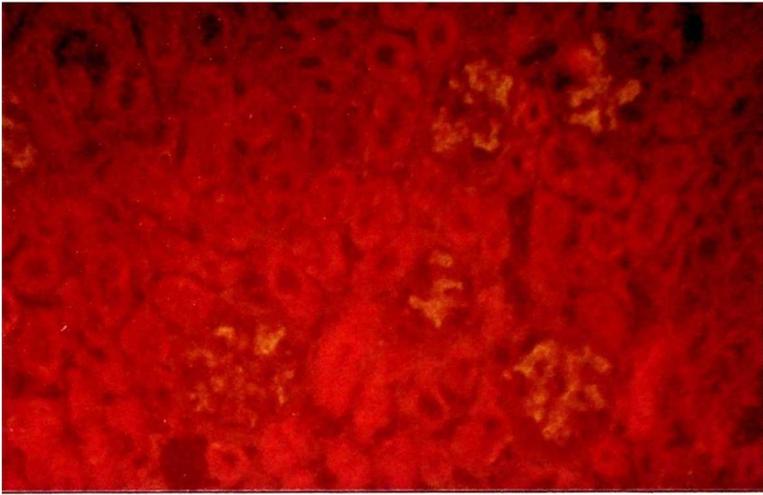
Os animais que receberam SAF apresentaram fluorescência de intensidade moderada nos glomérulos, fundamentalmente na região mesangial (Figuras 24 e 25). Os tubulos renais se mostraram pouco ou nada fluorescentes. Quando positiva a fluorescência se distribuía pela região peritubular, provavelmente no endotélio de vasos intertubulares (Figura 26). Fluorescência em células tubulares foi raramente verificada e de pequena intensidade.

Os cortes de rim dos animais que receberam SNC não fluoresceram.

FIGURA 24 - Rim de cobaia injetada com soro anti-Forssman. Córtex renal apresentando fluorescência na região mesangial dos glomérulos. (160x).

FIGURA 25 - Rim de cobaia injetada com soro anti-Forssman, Glomérulo apresentando fluorescência na região mesangial (660x)

FIGURA 26 - Rim de cobaia injetada com soro anti-Forssman. Região cortical, apresentando fluorescência em capilares intertubulares (seta). (660x)



IV - D I S C U S S Ã O

Trabalhos em nefropatia experimental realizados em cobaia utilizaram soros nefrotóxicos heterólogos (30, 31, 32), membrana basal glomerular e ou tubular heterólogas associadas ao adjuvante completo de FREUND (28, 29, 33, 34) e soro de coelho anti-hemácia de carneiro - SAF (7).

A exemplo do trabalho de MAURICE-WILLIAMS e colaboradores (7) o presente estudo objetivou a obtenção de nefropatia experimental em cobaia a partir da injeção de SAF. A riqueza de antígeno de Forssman e sua distribuição no tecido renal de cobaia (11, 12, 13, 14, 15) levou-nos ao estudo deste modelo de nefropatia experimental. A maior concentração do antígeno de Forssman nos túbulos coletores indicava-nos a possibilidade de se produzir não apenas glomerulopatia, mas também uma tubulopatia experimental.

O passo inicial para esta realização foi o preparo de SAF potente e específico para lesar rim de cobaia e de um soro controle (SCN) que fosse seguro como testemunho. Tal objetivo foi alcançado como demonstraram os resultados apresentados, ou seja, o título hemolítico do SAF igual a 1:2000 enquanto o SCN se igualara a zero; o SAF capaz de matar cobaia quando injetado endovenosamente em dose adequada e o SCN nas mesmas condições, não provocava morte nos animais;

a capacidade de o SAF se ligar ao tecido renal de cobaia, demonstrada através de duas técnicas de imunofluorescência - direta e indireta - ao contrário do SCN. Todos estes dados nos autorizaram a utilizar estes soros com a segurança de que o SAF possuía anticorpos específicos para antígeno de Forssman enquanto o SCN era isento destes anticorpos.

Os nossos achados de imunofluorescência direta e indireta corresponderam aos descritos na literatura (11, 13). Comparando nossos resultados de imunofluorescência, a técnica indireta foi melhor no sentido de demonstrar a presença e distribuição do antígeno de Forssman no rim de cobaia, provavelmente pela potenciação do efeito que a técnica indireta permite.

Com a injeção de anti-soro em cobaia, se esperava que o anticorpo se ligasse ao antígeno no tecido renal. Seria indesejável a complexação antígeno-anticorpo em circulação uma vez que se buscava produzir uma lesão citotóxica e não por deposição de imunocomplexos. Assim, a verificação da presença ou não de antígeno de Forssman em forma solúvel no soro de cobaia normal se fez necessária. Nossa pesquisa em relação a este problema mostrou resultados que sugerem a ausência do antígeno de Forssman livre no soro de cobaias normais.

De posse destes conhecimentos preparou-se o modelo experimental. O protocolo utilizado para o estudo funcional da nefropatia foi fruto de evolução de uma série de tentati-

vas e conhecimentos. Assim, a via de inoculação do SAF nas cobaias se constituiu num problema inicial. As tentativas de utilizar via endovenosa ou intraperitoneal não foram bem sucedidas. Era conhecida a lesão com necrose do corpo peniano quando se injetava SAF no seio venoso dorsal do pênis de cobaia (42). As outras tentativas de injeção endovenosa (veia jugular e intraperitoneal esbarraram na possibilidade de que o anticorpo pudesse ficar complexado ao antígeno presente no pulmão da cobaia ou peritônio, sendo desta forma insuficiente para lesar o rim quando o atingisse

A injeção por via intra arterial se revelou a mais adequada e foi como MAURICE-WILLIAMS e colaboradores (7) incularam o SAF em seus animais. Introduzimos o SAF próximo às artérias renais, na artéria aorta, utilizando como via de acesso a cateterização da artéria femural. Deste modo, diferimos de MAURICE-WILLIAMS e colaboradores quanto à maneira de alcançar a emergência das artérias renais, na aorta, já que aqueles autores iniciaram por cateterizar a artéria carótida esquerda dos animais.

A dose de SAF injetada nas cobaias foi determinada por tentativas, de forma a se obter lesão renal sem que outros aparelhos do animal fossem muito comprometidos. Também a forma de injeção foi estudada, uma vez que a dose de SAF utilizada seria capaz de matar ou lesar gravemente cobaias, de peso semelhante as do experimento, se injetado rapidamente. SPEAR em 1955 (42) procurava a dessensibilização da cobaia ao SAF

com injeções em doses sub-letais repetidas a cada 3 a 6 horas de modo que uma dose supra-letal do soro fosse administrada. MAURICE-WILLIAMS e colaboradores utilizaram em seu experimento SAF em dose letal injetado num período de 2 minutos.

Esta proteção ou hipossensibilização poderia ser de corrente de uma queda em fatores do complemento sérico que estariam envolvidos na patogênese da lesão pelo anticorpo de Forssman. Suportariam esta possibilidade os trabalhos de HYDE de 1927 e 1932 (43, 44) e SPEAR & KIHARA de 1970 (45). SARTI (46) estudando pneumopatias agudas em cobaias, mostrou que a animais parcialmente depletados de complemento sérico (cerca de 1/4 da atividade normal) ainda a apresentavam lesões graves nos pulmões quando injetados com SAF. Com o método de hipossensibilização empregada por SPEAR, MAURICE-WILLIAMS e colaboradores e por nós, os níveis de complemento sérico devem ter caído abaixo dos valores conseguidos por SARTI, impedindo a assim a morte dos animais, porém não necessariamente excluindo a participação do complemento nas lesões que o SAF poderia causar nas cobaias. Em nosso trabalho a dose utilizada, 0,3 ml, próximo à letal para o SAF, foi injetada para uma bomba de infusão peristáltica regulada por um fluxo de 100 µl/minuto. Com isso, adaptávamos os conhecimentos de literatura ao nosso experimento, conseguindo a administração do SAF de forma segura, sem que ocorresse morte dos animais.

Todos os passos do protocolo experimental foram ela

borados para que se obtivesse determinação dos vários parâmetros de função renal que nos permitisse avaliar a lesão de vida ao SAF.

Optamos por um modelo de experiência que poderíamos denominar de agudo pois, a coleta de material para análise de função renal era iniciada 30 minutos após o término da infusão do antisoro.

A expectativa de que lesões renais ocorressem neste experimento agudo se fundamentava na literatura onde trabalhos realizados com anticorpos heterófilos mostraram que minutos após a inoculação do anti-soro já era possível detectar as lesões teciduais por êle provocadas (4, 8, 9, 10).

REDFERN em 1926 (4) já descrevia as principais alterações causadas por anticorpo de Forssman em cobaias como as lesões hemorrágicas do pulmão ou pele, edema, aumento da permeabilidade de membranas celulares e endoteliais e áreas de necrose. Vários outros autores voltaram a descrever estas lesões, em trabalhos que envolveram necrose pancreática (5), infartos intestinais (6), alterações de vasos sanguíneos na pele de cobaias (8) e até a ultraestrutura das lesões provocadas pelo SAF a nível de vasos na pele (10) e pulmões (9) em cobaias.

Estes trabalhos confirmaram as descrições de REDFERN e acrescentaram achados como infiltração de células polimorfonucleares nos sítios de lesão, agregação de leucócitos constituindo verdadeiras massas, lesões degenerativas do endotélio vascular com necrose e fragmentação deste endotélio, vasos obstruídos por trombos ricos em leucócitos e plaquetas,

agregação e degranulação plaquetária e hipocoagulabilidade do sangue.

MAURICE-WILLIAMS e colaboradores (7) investigando a ação do SAF em glomérulos de cobaia descreveram as lesões agudas como necrose das células endoteliais dos capilares glomerulares, identificada como uma massa eosinofílica amorfa que continha alguns núcleos picnóticos.

Nossos achados confirmaram os descritos pelos autores citados. Desta forma, as lesões glomerulares verificados neste trabalho, se constituíram de necroses focais, tumefação da células endoteliais e infiltração de polimorfonucleares neutrófilos e mononucleares na matriz mesangial ou na luz dos capilares (Figura 16). Foi verificada a presença de trombo em artéria arciforme em um dos animais SAF, fato comum nas lesões devidas ao anticorpo heterófilo, como descrito por vários autores (6, 8, 9, 10) (Figura 17).

Destaca-se em nossos resultados o espessamento mesangial com focos de reação do mesângio e deposição de grânulos PAS positivos ou fucsínófilos nesta área, fatos ainda não referidos em trabalhos com anticorpo de Forssman (Figuras 21 e 23).

As alterações tubulares encontradas foram discretas (Figura 18). O fato de as lesões glomerulares superarem em muito a intensidade das lesões tubulares se deve provavelmente à maior intensidade do fluxo sanguíneo na região cor-

tical do rim portanto em glomérulos, em comparação com a região medular e ainda, à grande avidéz pelo anticorpo de Forssman apresentada pelo endotélio vascular. Desta maneira é possível que a maior parte do anticorpo ficou retida nas células endoteliais nos glomérulos e, dado também ao menor aporte sanguíneo da medula renal, o anticorpo de Forssman quando atingiu esta região o fez em pequena quantidade. Em atingindo a medula renal, esta menor quantidade de anticorpo deve ter-se complexado com antígeno presente no endotélio dos capilares intertubulares, produzindo lesões menos graves e talvez não atingindo diretamente as células tubulares. O antígeno de Forssman se encontra principalmente no interior destas células (13, 14, 15). Mesmo lesando o endotélio dos capilares intertubulares, o anticorpo de Forssman entraria em contacto apenas com a face não luminal da membrana das células dos túbulos, onde a presença do antígeno de Forssman não é assegurada. Porém não se exclui a possibilidade de lesões a este nível que possam se expressar por alterações funcionais antes que morfológicas.

Vêm suportar estas hipóteses, além do descrito em histologia clássica, os achados de imunofluorescência dos experimentos *in vivo*. Estes mostraram a deposição tênue de fluorescência nos capilares intertubulares da medula e cortex renal, sem evidenciar esta presença nas células tubulares (Figura 26).

É curioso, porém que a fluorescência verificada em

glomérulos é fundamentalmente mesangial. Não verificamos fluorecência ao longo dos capilares glomerulares ou em membrana basal dos glomérulos em nosso trabalho (Figuras 24 e 25).

É possível que a concentração do anticorpo na região mesangial se deveu à própria atividade desta área que é a de "clarear" o glomerulo de macromoléculas ou imunocomplexos, somada à ruptura ou segmentação que a reação antígeno-anticorpo imporá ao endotélio vascular. Então, o anticorpo de Forssman se ligaria ao antígeno presente em células endoteliais, promoveria a lesão destas células, aumento da permeabilidade capilar e mesmo necrose de áreas do glomérulo facilitando a exposição de complexos ou anticorpo livre ao mesângio. Com a injeção lenta do SAF diluído, pequenas quantidades do anticorpo atingiriam o glomérulo a um tempo, levando a lesão a pequenas áreas do tufo capilar, facilitando a passagem ulterior de anticorpos ao mesângio através os capilares danificados. Um mecanismo adicional, paralelo ou concomitante, seria o de passagem do anticorpo de Forssman, complexo ou não ao antígeno presente no endotélio capilar, através as fenestrações deste endotélio. Estas fenestrações, põem em contato direto a luz capilar com a célula mesangial em regiões onde o mesângio é, na verdade, intracapilar (47).

Os trabalhos de MAUER e colaboradores (48, 49) que estudaram a participação do mesângio e sua cinética de "aclaramento" de macromoléculas em ratos normais e nefríticos encorajou-nos à especulação acima. Vários outros autores vêm

estudando a participação das células mesangiais nas glomerulopatias tanto em animais quanto em humanos (50, 51, 52). A tentativa é de correlacionar alterações estruturais ou cinéticas do mesângio às várias possibilidades de nefropatias com envolvimento glomerular. Além disso, nefropatias que envolvam o mesângio têm sido tentadas (53, 54) tomando promissor o estudo deste modelo de lesão renal.

Assim, permitimo-nos uma nova especulação a partir de nossos resultados. Ficou demonstrado pelos estudos de imunofluorescência indireta *in vitro* que no glomérulo da cobaia a região mesangial apresenta fluorescência (FiguralB). Isto significava que a célula ou matriz mesangial devem possuir antígeno de Forssman. Uma vez que nos experimentos *in vivo* a deposição fluorescente foi fundamentalmente no mesângio, surge-nos a possibilidade de que mais que clarear os complexos imunes ou o anticorpo, a célula mesangial e sua matriz estariam verdadeiramente reagindo com o anticorpo.

Assim, além do fenômeno usual de "limpeza" do glomérulo, estaríamos diante de uma possível agressão à célula mesangial. Para o esclarecimento destas considerações, seria necessário o desenvolvimento de outros estudos que visassem preferencialmente a participação do mesângio na lesão do glomérulo, criando, eventualmente, um novo modelo de nefropatia experimental em cobaia.

Ainda em relação ao mesângio, cabe acrescentar que a assim chamada reação mesangial, foi achado constante nos

estudos histológicos dos animais injetados com SAF. Some-se a isto, ainda, os grânulos PAS positivos ou fucsínófilos presentes na matriz mesangial destes animais, que poderiam estar traduzindo a presença de anticorpo complexado ao antígeno nesta área. Todos estes dados vêm evidenciar a grande participação do mesângio na nefropatia obtida neste trabalho.

Outro evento de importância a ser discutido é a participação do sistema de complemento na nefropatia por nós provocada.

É conhecida a participação do sistema do complemento e dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) em nefropatias experimentais produzidas em ratos ou coelhos.

Em contrapartida, nas nefropatias provocadas em cobaia COUSER e colaboradores (28, 29, 30) e SIMPSON e colaboradores (31) demonstraram a independência do complemento e PMN como mediadores da lesão, provocada por soros nefrotóxicos, na fase heteróloga.

Vários trabalhos estudaram a participação do complemento no choque heterófilo e concluíram pela importância deste sistema na gênese da lesão pelo anticorpo de Forssman (43, 44, 45).

O modelo experimental deste trabalho associa a nefropatia produzida em cobaias, na fase heteróloga, à reação do anticorpo de Forssman neste animal.

Assim é lícito supor que a lesão que ocorre no tecido

do renal destas cobaias seria mediada, ainda que em parte, pelo complemento e PMN. O presente trabalho, porém, não nos autoriza a afirmação categórica desta especulação.

Da mesma forma, pode-se inferir a participação dos processos de coagulação na patogênese desta lesão renal. Tal inferência pode ser suportada, em parte, pelos achados deste trabalho - trombovascular, presença de fibrina em glomérulos - e pelos dados de literatura nos experimentos que utilizaram o SAF e que referiram alterações da coagulação sanguínea (5, 6, 8, 9, 10). Esta possibilidade aproxima o modelo deste trabalho à clássica nefropatia de Masugi no que diz respeito à participação dos mecanismos da coagulação em sua patogênese (55).

Cabe-nos, agora, analisar as alterações de função renal que possam ser expressão das alterações morfológicas descritas e comentadas.

É nítida e estatisticamente significativa a diminuição da reabsorção de soluto no segmento diluidor do nefron, ou seja, a porção ascendente da alça de Henle, nos animais injetados com SAF (Fig. 8). As funções de reabsorção de soluto deste segmento poderiam estar alteradas por dano às suas células ou aos capilares próximos. A lesão celular não pode ser evidenciada nos estudos morfológicos, porém, uma alteração funcional destas células poderia estar ocorrendo sem, ainda, uma expressão morfológica. A lesão vascular com maior certeza deverá estar envolvida neste mecanismo, uma vez que a de-

posição do anticorpo heterófilo no endotélio vascular é um achado constante.

A alteração referida, levaria a uma sobrecarga de sódio ao segmento distal do nefron. Entretanto, a excreção fracional de sódio (EF_{Na}) não se mostrou estatisticamente diferente entre os animais tratados com SAF e seus controles (Figura 11). Porém é perceptível a tendência à maior EF_{Na} nos animais SAF, sendo mais acentuada no período experimental II, quando há a sobrecarga de solução balanceada e, justamente, quando a reabsorção de solutos é menor nestes animais. Além desta tendência, é de se notar a maior dispersão dos resultados nos animais SAF, o que poderia estar traduzindo uma variação na gravidade das lesões renais a que estes animais foram submetidos. É possível, ainda, que em alguma porção do segmento distal do nefron estaria havendo uma compensação para a diminuição da reabsorção de solutos do segmento ascendente da alça de Henle (RSSD).

Esta hipótese é enriquecida com o observado para a excreção fracional de potássio (EF_K) (Figura 10). Esta se apresentou aumentada em ambos os períodos experimentais nos animais SAF. Porém, não se pode afastar a possibilidade de que lesões celulares possam ter levado a um aumento de permeabilidade ao potássio e portanto sua maior excreção.

A excreção fracional de água (EF_{H_2O}) deve ser analisada em duas etapas: na hidropenia relativa do período I e na sobrecarga do período II.

Na primeira situação o hormônio anti-diurético (HAD) deve estar presente no plasma e sua ação, combinada com a agressão pelo SAF deve ser considerada. Assim, percebe-se pela Figura 9 uma grande variabilidade dos resultados nos animais SAF, com uma tendência a ser maior a EF_{H_2O} neste grupo. Esta maior EF_{H_2O} poderia estar expressando uma menor quantidade de HAD nos túbulos coletores.

Esta menor quantidade de HAD seria consequência de um menor aporte sanguíneo à região dos tubos coletores, causada por lesão vascular devida ao SAF ou por dano no sistema nervoso central. Esta última possibilidade é mais remota, uma vez que a injeção do SAF foi feita próximo à emergência das artérias renais, possibilitando que a maior parte deste anticorpo ficasse no tecido renal ou proximidades.

Outra possibilidade de explicação para esta maior EF_{H_2O} no período I seria a de que o mecanismo de ação do HAD na célula do tubo coletor esteja lesado pelo anticorpo. Assim, mesmo em quantidade adequada, o HAD não poderia atuar satisfatoriamente. Esta lesão poderia ser discreta, sem expressão morfológica, mas apenas funcional.

No período experimental II, com sobrecarga hídrica, observou-se uma maior EF_{H_2O} nos dois grupos experimentais quando comparado ao período I. Quando comparamos os dois grupos no mesmo período II, percebe-se uma nítida tendência de o grupo SAF excretar mais água (Figura 9). Nesta condição de sobrecarga hídrica há ausência de HAD. Considerando

esta situação, o segmento coletor do nefron deveria estar mais impermeável a água nos animais SAF. Esta possibilidade seria explicada pela menor concentração de soluto no interstício que seria devida à menor RSSD na porção ascendente da alça de Henle, à maior EF_K e provável maior EF_{Na} ou ainda a uma lesão celular destes tubos. É provável, entretanto, que todos estes mecanismos possam estar se somando.

Continuando a análise da EF_{H_2O} , pode-se considerar que o sistema de permuta no mecanismo de concentração urinária esteja alterado por modificação do fluxo sanguíneo devido a lesão pelo anticorpo de Forssman na vasa recta. Isto desfavoreceria a retirada de água e soluto da membrana, levando a um aumento da EF_{H_2O} .

A análise do "clearance" de água (C_{H_2O}) mostrou uma significativa diminuição deste C_{H_2O} nos animais injetados com SAF (Figura 7). Isto concorda com o já discutido e perfeitamente esperado já que a RSSD é calculada a partir do C_{H_2O} (ver apêndice).

A não alteração dos valores de "clearance" osmolar (C_{osm}) para o grupo de animais SAF, em ambos os períodos, volta a indicar que o nefron, em seus segmentos finais, deveria compensar a queda da RSSD (Figura 5).

Não foi verificada diferença na reabsorção de água livre ($T_{H_2O}^C$) entre os grupos SAF e SCN (Figura 6). Entretanto seria esperada uma queda do $T_{H_2O}^C$ nos animais SAF, em concordância com o ocorrido com a RSSD.

A análise das funções glomerulares mostrou poucas alterações, embora fosse o glomérulo o sítio que evidenciou maiores mudanças morfológicas. Desta forma, a filtração glomerular (FG) apresentou-se diminuída nos animais SAF no período experimental I e com tendência à queda nestes animais no período II (Figura 12). Estas alterações não devem ser atribuídas a variações da pressão arterial sistêmica (PA) ou ao fluxo plasmático renal (FPR) que estiveram inalterados nos dois grupos de animais e em ambos os períodos experimentais (Figuras 13 e 14). Devem, isto sim, ser fruto da própria lesão glomerular causada pelo anticorpo de Forssman

Finalmente, podemos considerar que toda esta graduação de alterações morfológicas e funcionais verificada nos animais SAF seria, realmente, fruto de maior ou menor afluxo do anticorpo de Forssman na circulação renal da cobaia. Para evitar tais variações e saber qual a real quantidade de SAF que circulou pelo rim, seriam necessárias preparações que utilizassem o rim isolado de cobaia.

Assim, o modelo experimental de nefropatia aqui estudado, em que pese as limitações a ele impostas, se mostrou útil, interessante e atingiu objetivos propostos.

Foi possível evidenciar lesões morfológicas e funcionais devidas ao anticorpo de Forssman, permitiu várias especulações a respeito de sua patogênese e, provavelmente, abriu perspectivas de aprimoramento no estudo das nefropatias experimentais e humanas principalmente no que diz respeito à

participação das células mesangiais nestas doenças.

Por último, podemos afirmar que o trabalho respondeu algumas perguntas, reformou algumas ilusões mas fundamentetalmente criou outras tantas.

V - S U M Á R I O

Este trabalho objetivou a produção de nefropatia experimental imunológica em cobaias.

O soro nefrotóxico utilizado para este fim foi o soro anti-Forssman (SAF). Como controle do experimento usou-se soro de coelho normal (SCN).

Cobaias normais foram injetadas por via intraarterial com SAF ou SCN. Seguiu-se um protocolo experimental para avaliação de função renal destes animais. As cobaias, ao fim do experimento foram sacrificadas, seus rins retirados e destinados a estudos morfológicos - histologia e imunofluorescência.

Os resultados permitiram concluir que nefropatia experimental imunológica foi obtida em cobaias pela injeção de SAF, com alterações tubulares e glomerulares que comprometeram a função renal dos animais.

A deposição de anticorpos na região mesangial constituiu um achado que abre perspectivas para a realização de um novo modelo de nefropatia experimental imunológica.

In this paper it is presented the results of a experimental immunological nephropathy produced in guinea pigs by an anti-Forssman rabbit serum. Normal rabbit serum was injected in controls. The sera were administered by intra-arterial route.

The renal function was investigated, the kidneys were collected for histological and immunofluorescence procedures.

An experimental immunological nephropathy was obtained in guinea pigs as it could be showed by tubular and glomerular alterations.

The deposition of antibodies in the mesangial areas is a finding that opens new perspective in the study of experimental nephropathy.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .

- 1 - FRIEDEBERGER, E.: Weitere Untersuchungen über Eiweissana-
phylaxie. Z. Immunitätsforsch. 4: 636, 1910. Apud Redfern,
W.W.: A study of the primary toxicity of heterophile im-
mune rabbit serum for guinea-pigs, and its apparent rela-
tion to the phenomenon of anaphylaxis. Am.J.Hyg. 6: 276,
1926.
- 2 - FORSSMAN, J.: Die Hertsellung hochwertiger spezifischer
Schafthämolyse ohne Verwendung von Schafblut. Biochem.Z.
37: 78, 1911.
- 3 - FORSSMAN, J.: Biochem.Z. 110: 164, 1920. Apud Berkinshaw-
Smith, E.M.I.; Morgan, R.S.; Payling Wright, G.: The action
of Forssman antiserum on the blood vessels of the skin in
guinea-pigs. Brit.J.exp.Path. 43: 665, 1962.
- 4 - REDFERN, W.W.: A study of the primary toxicity of hetero-
phile immune rabbit serum for guinea-pigs, and its appar-
ent relation to the phenomenon of anaphylaxis. Am.J.Hyg.,
6: 276, 1926.
- 5 - GRAÑA, A.: Experimental purpura and pancreatic necrosis
produced by Forssman heterophil antibody. Proc.Staff Meet.
Mayo Clin. 21: 298, 1946.
- 6 - LEVINE, S.; WARREN, B.: Intestinal infarcts produced by
Forssman antibodies. Arch.Path. 68: 119, 1959.
- 7 - MAURICE-WILLIAMS, F.; MORGAN, R.S.; PAYLING WRIGHT, G.:
Glomerular changes in guinea-pig kidneys produced by rab-

- bit anti-sheep-cell serum (Forssman antibody). *J.Path.Bact.* 82: 517, 1961.
- 8 - BERKINSHAW-SMITH, E.M.I.; MORGAN, R.S.; PAYLING WRIGHT, G.: The action of Forssman antiserum on the blood vessels of the skin in guinea-pigs. *Brit.J.exp.Path.* 43: 665, 1962.
- 9 - TAICHMAN, N.S.; CREIGHTON, M.; STEPHENSON, A.; TSAI, C.C.: Heterophile antibodies and tissue injury. I-Ultrastructure of pulmonary vascular lesions produced by Forssman antiserum in guinea-pigs. *Immunology* 22: 93, 1972.
- 10 - TAICHMAN, N.S.; TSAI, C.C.: Heterophile antibodies and tissue injury. II-Ultrastructure of dermal vascular lesions produced by Forssman antiserum in guinea-pigs. *Int.Arch. Allergy* 42: 78, 1972.
- 11 - TANAKA, N.; LEDUC, E.H.: A study of the cellular distribution of Forssman antigen in various species. *J.Immunol.* 77: 198, 1956.
- 12 - HAWES, M.D.; COOMBS, R.R.A. : Cellular distribution of Forssman (membrane) antigen in the guinea-pig determined by the mixed agglutination reaction. *J.Immunol.* 84: 586, 1960.
- 13 - SPEAR, G.S.: Forssman antigen in the guinea-pig: a histology study. *Bull.J.Hopkins Hosp.* 111: 252, 1962.
- 14 - SPEAR, G.S.: Forssman antigen in tissue culture. *Bull.J. Hopkins Hosp.* 111: 307, 1962.
- 15 - SPEAR, G.S.; KIHARA, I.: Forssman antigen in the guinea-pig desensitized to Forssman antibody. An immunofluorescent study. *Bull.J.Hopkins Hosp.* 112: 270, 1963.

- 16 - LINDEMANN,W.: Sur le mode d'action de certains poisons rénaux. Ann.Inst.Pasteur 14: 49, 1900.
- 17 - PEARCE,R.: Univ.Penn.Med.Bull 16: 217, 1903-1904. Apud Unanue, E.R.; Dixon,F.J.: Experimental glomerulonephritis: immunological events and pathogenetic mechanisms. Advan. Immunol. 6: 1, 1967.
- 18 - MASUGI,M.: Trans.Jap.Pathol.Sco. 19: 132, 1929. Apud Unanue,E.R.; Dixon,F.J.: Experimental glomerulonephritis: immunological events and pathogenetic mechanisms. Advan.Immunol. 6: 1, 1967.
- 19 - MASUGI,M.: Beitr.Pathol.Anat.Allegm.Pathol. 91: 82,1933 Apud Unanue, E.R.; Dixon,F.J.: Experimental glomerulonephritis immunological events and pathogenetic mechanisms. Advan.immunol. 6: 1, 1967.
- 20 - MASUGI,M.: Beitr.Pathol.Anat.Allegm.Pathol. 92:429,1934. Apud Unanue,E.R.; Dixon,F.J.: Experimental glomerulonephritis: immunological events and pathcgenetic mechanisms. Advan.Immunol. 6: 1, 1967.
- 21 - MASUGI,M.; SATO,Y.; TODO,S.: Trans.Jap.Pathol.Soc. 25: 211, 1935. Apud Unanue, E.R.; Dixon,F.J.: Experimental glomerulonephritis: immunological events and pathogenetic mechanisms. Advan.Immunol. 6: 1, 1967.
- 22 - LAUS FILHO,J.A.; ANDRADE,Z.A.; OLIVEIRA,H.L.:Lesões pulmonares que acompanham a glomerulonefrite experimental produzida em ratos por soro anti-rim. Rev.Paul.Med. 50: 300, 1957.
- 23 - LAUS FILHO,J.A.; HADLER,W.A.; OLIVEIRA,H.L.: Evolução da nefropatia produzida em ratos por soro anti-pulmão.Rev. Ass.Med.Bras. 7: 119, 1961.

- 24 - LAUS FILHO, J.A.: Nefropatia experimental produzida por soros imunes anti-orgãos. Tese apresentada para concurso de Livre-Docência. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, 1962.
- 25 - OLIVEIRA, H.L.: Ação de anticorpos anti-glomerulares e de adjuvante de Freund no rato. Lesões renais e pulmonares. Tese apresentada para concurso de Cátedra. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 1963.
- 26 - LAUS FILHO, J.A.: Métodos imunológicos de produção de glomerulonefrite experimental. Med.CARL 2: 161, 1963.
- 27 - LAUS FILHO, J.A.; BÖHN, G.; SARTI, W.: Nefropatia evolutiva produzida em camundongo por soro de coelho antiglomerulo de rato. Rev.Ass.Med.Bras. 16: 383, 1970.
- 28 - COUSER, W.G.; STILMANT, M.M.; LEWIS, E.J. : Experimental glomerulonephritis in the guinea-pig. I.-Glomerular lesions associated with antiglomerular basement membrane antibody deposits. Lab.Invest. 29: 236, 1973.
- 29 - COUSER, W.G.; SPARGO, B.H.; STILMANT, M.M.; LEWIS, E.J.: Experimental glomerulonephritis in the guinea-pig. II. Ultrastructural lesions of the basement membrane associated with proteinuria. Lab.Invest. 32: 46, 1975.
- 30 - COUSER, W.G.; STILMANT, M.M.; JERMANOVICH, N.B.: Complement independent nephrotoxic nephritis in the guinea-pig. Kidney Int. 11: 170, 1977.
- 31 - SIMPSON, J.J.; AMOS, N.; EVANS, D.J.; THONSON, N.M.; PETERS D.K.: Guinea-pig nephrotoxic nephritis. I. The role of complement and polymorphonuclear leucocytes and the effect of

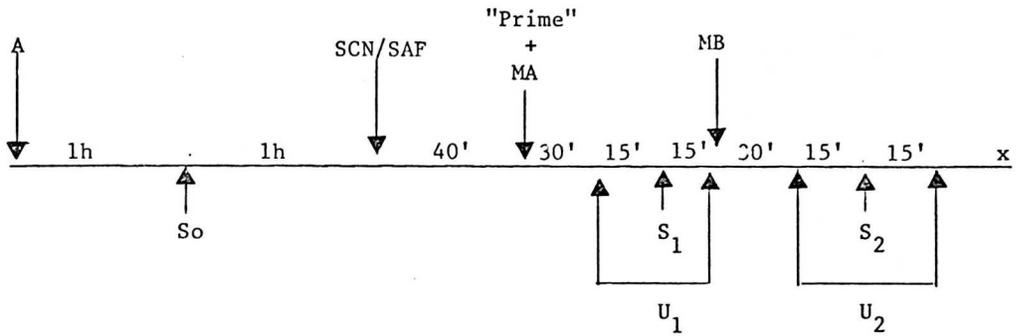
- antibody subclass and fragments in the heterologous phase. Clin.exp.Immunol. 19: 499, 1975.
- 32 - SIMPSON, I.J.; THONSON, N.M.; AMOS, N.; EVANS, D.J.; PETERS D.K.: Guinea-pig nephrotoxic nephritis. II. Autologous phase: complement activation without detectable injury. Clin.exp. Immunol. 28: 146, 1977.
- 33 - STEBLAY, R.W.; RUDOFISKY, V.: Renal tubular disease and autoantibodies against tubular basement membrane induced in guinea-pigs. J.Immunol. 107: 589, 1971.
- 34 - VanZWIETEN, M.J.; BHAN, A.K.; McCLUSKEY, R.T.; COLLINS, A. B.: Studies on the pathogenesis of experimental anti-tubular basement membrane nephritis in the guinea-pig. Am.J. Path. 83: 531, 1976.
- 35 - KABAT, E.A.; MAYER, M.M.: Experimental immunochemistry. Charles C.Thomas, Springfield, USA. 2nd ed.: 150, 1964.
- 36 - ALMEIDA, J.O.: Técnica da reação de Wassermann quantitativa. Emprego do colorímetro fotoelétrico na padronização dos reagentes e na leitura da reação. Hospital, 35: 847, 1950.
- 37 - JOHNSON, G.D.: Immunofluorescence techniques. Chap. 5, Techniques in Clinical Immunology. Ed. R.A.Thompson. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1977.
- 38 - OUCHTERLONY, O.: In vitro method for testing the toxin producing capacity of diphtheria bacteria. Acta.Path.Microbiol.Scand. 25: 186, 1948.

- 39 - GRABAR, P.; WILLIAMS, C.A. Jr.: Biochim. Biophys. Acta 10: 193, 1953; 17: 67, 1955. Apud Kabat, E.A.; Mayer, M.M.: Experimental Immunochemistry. Charles C. Thomas, Springfield USA, 2nd ed., 1964.
- 40 - SCHEIDEGGER, J.J.: Int. Arch. Allergy and Applied Immunol. 7: 103, 1955. Apud Kabat, E.A.; Mayer, M.M.: Experimental Immunochemistry. Charles C. Thomas, Springfield, USA, 2nd ed., 1964.
- 41 - SIEGEL, S.: Nonparametric statistics for the behavioral sciences. McGraw-Hill Company Inc. Philadelphia, USA, 1956.
- 42 - SPEAR, G.S.: Desensitization of the guinea-pig to Forssman antibody. Bull. J. Hopkins Hosp. 96: 199, 1955.
- 43 - HYDE, R.R.: The complement deficient guinea-pig. A study of an inherited biochemical structure in relation to a toxic immune body. Amer. J. Hyg. 7: 619, 1927.
- 44 - HYDE, R.R.: The complement deficient guinea-pig: a study of an inheritable factor in immunity. Amer. J. Hyg. 15: 824, 1932.
- 45 - SPEAR, G.S.; KIHARA, I.: Complement and heterophile shock Hopkins Med. J. 126: 210, 1970.
- 46 - SARTI, W.: Pneumopatia aguda imunológica de cobaias, causada pelos soros anti-pulmão, anti-Forssman e pela anafilaxia ativa. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 1970.
- 47 - MICHAEL, A.F.; KEANE, W.F.; RAY, L.; VERNIER, R.L.; MAUER, S.M.: The glomerular mesangium. Kidney Int. 17: 141, 1980.

- 48 - MAUER, S.M.; FISH, A.J.; BLAU, E.B.; MICHAEL, A.F.: The glomerular mesangium. I. Kinetic studies of macromolecular uptake in normal and nephrotic rats. *J.Clin.Invest.* 51: 1092, 1972.
- 49 - MAUER, S.M.; FISH, A.J.; DAY, N.K.; MICHAEL, A.F.: The glomerular mesangium. II. Studies of macromolecular uptake in nephrotoxic nephritis in rats. *J.Clin.Invest.* 53: 431, 1974
- 50 - DAVISON, A.M.; THONSON, D.; MAC DONALD, M.K.; UTTLEY, W.S.; ROBSON, J.S.: The role of the mesangial cell in proliferative glomerulonephritis. *J.Clin.Path.* 26: 198, 1973.
- 51 - THOMSON, K.J.; TURNER, D.R.: Mesangial cell cytoplasm and glomerular disease. *J.Path.* 120: 229, 1976.
- 52 - KONDO, Y.; SHIGEMATSU, H.; OKABAYASHI, A.: Cellular aspects of rabbit Masugi nephritis. III. Mesangial changes. *Lab. Invest.* 34: 363, 1976.
- 53 - MAUER, S.M.; SUTHERLAND, D.E.R.; HOWARD, R.J.; FISH, A.J.; NAJARIAN, J.S.; MICHAEL, A.F.: The glomerular mesangium. III. Acute immune mesangial injury: a new model of glomerulonephritis. *J.Exp.Med.*, 137: 553, 1973.
- 54 - SEELIG, H.P.; SEELIG, R.; ROTH, E.; ROTH, E.: Antibodies reacting with the glomerular mesangium. Isolation and immunopathology. *Virchows Arch. [Pathol.Anat.]* 366: 313, 1975
- 55 - VASSALLI, P.; McCLUSKEY, R.T.: The pathogenic role of the coagulation process in rabbit Masugi nephritis. *Am.J.Pathol.* 45: 653, 1964.

A P Ê N D I C E

1. DELINEAMENTO GRÁFICO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL



- A - anestesia
- S_n - coletas de sangue
- U_n - coletas de urina
- SNC/SFA - injeção de soro de coelho normal ou soro anti-Forsman
- "Prime" - solução balanceada com inulina e PAH - injeção "prime"
- MA - solução de manutenção A
- MB - solução de manutenção B
- x - sacrifício do animal

2. DOSAGEM DE INULINA UTILIZANDO-SE REAGENTE DE ANTRONA

Reagentes

- 1- 125 ml de H_2SO_4 + 50 ml de H_2O destilada.
- 2- Antrona 200 mg + 100 ml da solução acima de H_2SO_4 .
- 3- Ácido perclórico a 5% (para desproteínização)

Dosagem do plasma

- 250 λ do plasma desproteínizado.
- 3 ml do reagente de Antrona.

Dosagem na urina

- 100 λ de urina diluída.
- 3 ml do reagente de Antrona.
- 150 λ de ácido perclórico.

Para o branco utiliza-se H_2O destilada e, para os padrões, frutose.

As misturas são aquecidas durante 10 minutos a 55°C, esfriadas e a leitura feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 620nm.

3. DOSAGEM DE P.A.H.

Plasma é desproteínizado por adição de solução de $ZnSO_4$ a 10% e NaOH 0,5N. A urina é diluída em H_2O destilada.

Colorimetria

1 ml de filtrado de plasma ou urina diluída. Acrescentar a cada tubo, rigorosamente nesta ordem e respeitando-se os intervalos e tempos indicados:

0,2 ml de HCl 1,2N.

0,2 ml de $NaNO_2$ a 100 mg%. Agitar os tubos.

0,2 ml de sulfonato de amônio a 500 mg%, não antes de 3 minutos e não depois de 5 minutos. Agitar.

0,2 ml de dicloreto de N-1 nãfitiletileno diamino, não antes de 3 minutos e não depois de 5 minutos. Agitar os tubos.

Aguardar 15 minutos e ler em espectrofotômetro em comprimento de onda 535 nm.

4. FÓRMULAS EMPREGADAS NO CÁLCULO DOS PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL

4.1.- Fluxo urinário

$$\text{fluxo urinário} = \frac{\text{Volume de urina}}{\text{Tempo de coleta}} \text{ ml/min}$$

4.2.- "Clearance" osmolar

$$\text{Cosm} = \frac{U \cdot V}{P} \text{ ml/min}$$

onde

U= osmolaridade urinária

P= osmolaridade plasmática

V= fluxo urinário

4.3.- "Clearance" de água livre

$$C_{H_2O} = V - \text{Cosm} \text{ ml/min}$$

onde

V= fluxo urinário

Cosm= "Clearance" osmolar

4.4.- Reabsorção de água livre

$$T_{H_2O}^c = \text{Cosm} - V \text{ ml/min}$$

4.5.- Reabsorção de soluto no segmento diluidor do nefron.

$$\text{RSSD} = \frac{C_{H_2O}}{C_{Na} + C_K + C_{H_2O}} \times 100\%$$

onde

C_{H_2O} = "Clearance" de água livre.

C_{Na} = "Clearance" de sódio.

C_K = "Clearance" de potássio.

4.6.- Excreção fracional da água

$$EF_{H_2O} = \frac{1}{\frac{U_{IN}}{P_{IN}}} \times 100 \%$$

onde

U_{IN} = concentração urinária de inulina.

P_{IN} = concentração plasmática de inulina.

4.7.- Excreções fracionais de sódio ou potássio

$$EF_{Na/K} = \frac{\frac{U_{Na/K}}{P_{Na/K}}}{\frac{U_{IN}}{P_{IN}}} \times 100 \%$$

onde

$U_{Na/K}$ = concentração urinária de sódio ou potássio.

$P_{Na/K}$ = concentração plasmática de sódio ou potássio.

U_{IN} = concentração urinária de inulina.

P_{IN} = concentração plasmática de inulina.

4.8.- Filtração glomerular

$$FG = \frac{U_{IN.V}}{P_{IN}} \text{ ml/min}$$

onde

U_{IN} = concentração urinária de inulina.

P_{IN} = concentração plasmática de inulina.

V = fluxo urinário.

4.9.- Fluxo plasmático renal

$$FPR = \frac{U_{PAH.V}}{P_{PAH}} \text{ ml/min}$$

onde

U_{PAH} = concentração urinária de PAH.

P_{PAH} = concentração plasmática de PAH.

V = fluxo urinário.