Flavia Gomes Machado

**Efeito da administração de sunitinibe como
terapia anti-angiogênica em ratos submetidos à
ablação renal de 5/6**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Zatz

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Machado, Flavia Gomes

Efeito da administração de sunitinibe como terapia anti-angiogênica em ratos submetidos à ablação renal de 5/6 / Flavia Gomes Machado. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientador: Roberto Zatz.

Descritores: 1.Insuficiência renal crônica 2.Endotélio 3.Rim/fisiopatologia
4.Angiogênese

USP/FM/DBD-013/12

Dedicatória

Aos meus pais Maria Antonia e Marco Aurelio dedico tudo que conquistei e tudo que ainda tenho a conquistar. Agradeço imensamente por tudo o que fazem por mim, por tudo que me ensinam e pelo apoio. Certa vez eu ouvi: “você tem pai e mãe te apoiando, então não se preocupe, nada pode te abalar”. Cada dia me encanto mais com essas pessoas tão admiráveis. Amo-os muito mais que tudo!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof Dr Roberto Zatz com quem trabalho há tantos anos e com quem ainda assim me surpreendo a cada dia com sua inteligência e brilhantismo. Seu amor pela ciência é contagiante e hoje vejo que meu amor pela ciência foi alimentado graças ao longo período de trabalho ao seu lado e a nossas acaloradas discussões. Muito obrigada pelos ensinamentos e por toda a paciência e bom humor que teve todo o tempo.

À Dra Clarice Fujihara pela colaboração e inestimável contribuição neste estudo e na minha formação. A ela um dia eu disse e hoje repito: "valorizo imensamente tudo que aprendi ao seu lado e com certeza ainda tenho muito que aprender". A Dra. Clarice é uma pesquisadora competente com quem vivenciei experiências importantes, que me proporcionam grandes lições. Muito obrigada por tudo!

À Patrícia Semedo Kuriki pela colaboração, ajuda e cuidado na realização dos experimentos de expressão gênica. Agradeço muito sua paciência e disponibilidade para nossas discussões e para me ensinar e ajudar no que foi preciso.

Ao Prof Dr Niels Olsen Saraiva Câmara pela valiosa parceria neste estudo, por discutir inúmeras vezes os meus dados e por suas valiosas sugestões. O Prof. Niels é um pesquisador que admiro imensamente pela competência, inteligência e simplicidade.

À Dra Denise Malheiros pelos conselhos e discussões, pela colaboração e por me ensinar tanto, afinal a cada vez que examino uma lâmina ao seu lado me surpreendo por receber uma verdadeira aula particular. Muito obrigada por, pacientemente, analisar as lâminas incontáveis vezes e por discutir os achados. Agradeço imensamente sua ajuda em todos os momentos.

À Dra Vanda Jorgetti pelas sugestões e avaliação deste estudo. Muito obrigada pelo carinho, incentivo e apoio que foram imprescindíveis para que eu me dedicasse ao meu estudo.

Ao Prof Dr Antonio Carlos Seguro pelos importantes conselhos e sugestões.

Ao Dr Marcos Dall'Oglio por ajudar a obter a droga utilizada neste estudo.

À Simone Costa pela grande contribuição em todas as etapas deste estudo e pela constante ajuda. À Cristiene Okabe por toda ajuda em tudo que foi necessário durante o desenvolvimento deste estudo, ajuda imprescindível e impossível de listar. Grandes amigas e parceiras. Agradeço imensamente pela amizade, pelo incentivo constante e por estarem sempre ao meu lado. O trabalho é muito mais leve quando temos pessoas como vocês ao lado. Simplesmente obrigada por tudo!

À Camilla Fanelli pelas discussões, sugestões e imensa ajuda nos experimentos. Agradeço pelo incentivo, pela força e por sempre estar disposta a discutir e testar novas estratégias. Temos tantas histórias para contar e sei que ainda há muitas por vir e tanto a trabalhar. Muito obrigada!

À Dra Daisa David pelos ensinamentos, colaboração e discussões.

À Pâmela, Margarete, Carla, Letícia, Irene, Victor, Neto, Raquel e Bia pela constante e valiosa ajuda e companheirismo. Muito obrigada pessoal!

Aos meus colegas de laboratório e de pós-graduação que sempre ajudam uns aos outros, são pacientes, parceiros e que tornam o trabalho mais agradável.

À Claudia Sena pelo apoio técnico, ajuda e cuidado na realização de muitas dosagens desse estudo.

À Grasiela Barlette pelo carinho e cuidado no preparo dos cortes histológicos.

À Janice Pião pela cuidadosa manutenção do biotério e pela divertida companhia de tantas horas.

À Bianca e Vivian pelo cuidado na manutenção do biotério e dos animais utilizados nesse estudo.

À Flavia Roza pela parceria e colaboração que foram imprescindíveis no início do estudo.

Ao Wagner por sempre estar pronto a ajudar e pelo cuidado com todos os detalhes que são tão importantes.

À Luciene dos Reis, sempre tão disposta a ajudar e a explicar tudo o que for preciso.

À Denise, Pedro e Eliana pela assistência com toda a parte burocrática.

Ao meu irmão Cesar e à Carla que sempre estão ao meu lado me apoiando e torcendo por mim. Agradeço imensamente pelo carinho e por tudo que fazem. Aos meus amores Matheus e Caio que mesmo nas horas mais difíceis não encontram nenhuma dificuldade em colocar um sorriso no meu rosto. À Conceição que sempre me apoiou e por quem tenho tanto carinho. À minha família, que compreende tantos sobrenomes e é tão forte e tão unida. A cada dia sou mais feliz por fazer parte dessa família. Aos meus queridos amigos Kelly, Patrícia, Vanessa e Thiago que me apoiam e incentivam tanto e que sempre tentam encontrar uma maneira de ajudar. Sou privilegiada por tê-los ao meu lado.

*"Enquanto todo mundo espera a cura do mal
E a loucura finge que isso tudo é normal
Eu finjo ter paciência.
O mundo vai girando cada vez mais veloz
A gente espera do mundo e o mundo espera de nós
Um pouco mais de paciência.
Será que é tempo que lhe falta pra perceber
Será que temos esse tempo pra perder
E quem quer saber
A vida é tão rara."*

Lenine e Dudu Falcão

"Nós animais somos as máquinas mais complicadas e mais perfeitamente elaboradas em todo o universo conhecido. Dessa forma, fica difícil entender como alguém desejaria estudar outra coisa!"

Richard Dawkins

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo	10
2. MÉTODOS	11
2.1 Obtenção do modelo experimental	11
2.2 Grupos experimentais	12
2.3 Esquema do protocolo experimental	13
2.4 Obtenção do tecido renal e de amostras de sangue	13
2.5 Determinação da concentração urinária de albumina	15
2.6 Histologia	15
2.7 Histomorfometria renal	16
2.8 Imuno-histoquímica	16
2.9 Isolamento de glomérulos para análise da expressão gênica..	22
2.10 Reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa em tempo real (Real time RT-PCR)	23
2.11 Creatinina sérica	27
2.12 Análise estatística.....	27
3. RESULTADOS	28
4. DISCUSSÃO	35
5. CONCLUSÕES	45
6. ANEXOS	46
6.1 Tabelas	47
6.2 Figuras	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
%INT	Área intersticial fracional
An	Microaneurisma
ANOVA	Análise de variância
APAAP	Fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina
cDNA	DNA complementar
CMC	Carboximetilcelulose
DRC	Doença renal crônica
EP	Erro padrão
GS	Glomerulosclerose
Ht	Hematócrito arterial
MØ	Macrófagos
MCP-1	Proteína quimioatratora de monócitos-1
Nx	Ablação renal de 5/6
PC	Pressão sistólica caudal
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PD-ECGF	Fator de crescimento de célula endotelial derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

PE	Peso corpóreo
PIGF	Fator de crescimento placentário
RT	Transcriptase reversa
S	Sham
Scr	Concentração de creatinina sérica
Su	Sunitinibe
TBS	Solução salina tris-tamponada
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
U _{alb} V	Albuminúria de 24 horas
V	Veículo
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular
VEGFR	Receptor do VEGF
VG	Volume glomerular
VPF	Fator de permeabilidade vascular
WT-1	Proteína do tumor de Wilms
ZO-1	Zonula occludens 1

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Número de animais utilizados em cada análise	47
Tabela 02.	Resultados obtidos aos 7 dias de tratamento	48
Tabela 03.	Resultados obtidos aos 45 dias de tratamento	48
Tabela 04.	Parâmetros intersticiais avaliados aos 7 dias	49
Tabela 05.	Parâmetros intersticiais avaliados aos 45 dias	49
Tabela 06.	Análise da morfologia glomerular aos 7 dias	50
Tabela 07.	Análise da morfologia glomerular aos 45 dias	50
Tabela 08.	Parâmetros glomerulares avaliados aos 7 dias	51
Tabela 09.	Parâmetros glomerulares avaliados aos 45 dias	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 01.	Gráfico do peso corpóreo	52
Figura 02.	Gráfico da pressão sistólica caudal	53
Figura 03	Gráfico da excreção urinária de albumina	54
Figura 04	Gráfico da concentração sérica de creatinina	55
Figura 05	Gráfico do hematócrito arterial	56
Figura 06	Microfotografias representativas do interstício renal	57
Figura 07	Gráfico da área intersticial fracional	57
Figura 08	Microfotografias da marcação para macrófagos	58
Figura 09	Gráfico da infiltração macrofágica intersticial	58
Figura 10.	Microfotografias da marcação para PCNA em túbulos	59
Figura 11.	Gráfico da proliferação de células tubulares	59
Figura 12.	Microfotografias da marcação para PCNA no interstício	60
Figura 13.	Gráfico da proliferação de células intersticiais	60
Figura 14.	Microfotografias da marcação para JG-12 intersticial	61
Figura 15	Gráfico da densidade de capilares peritubulares	61
Figura 16	Microfotografias da marcação para hipóxia	62
Figura 17.	Gráfico da classificação morfológica dos glomérulos	63
Figura 18.	Microfotografias representativas da morfologia glomerular	64
Figura 19.	Gráfico do volume glomerular	65
Figura 20.	Microfotografias da marcação para PCNA nos glomérulos	66
Figura 21.	Gráfico da proliferação de células glomerulares	66

Figura 22.	Microfotografias da marcação para ZO-1	67
Figura 23.	Gráfico da ZO-1 glomerular	67
Figura 24.	Microfotografias da marcação para WT-1	68
Figura 25.	Gráfico do número de podócitos	68
Figura 26.	Microfotografias da marcação para JG-12 glomerular	69
Figura 27.	Gráfico da área endotelial glomerular	69
Figura 28.	Gráfico da expressão do VEGF em homogenato de rim	70
Figura 29.	Gráfico da expressão de VEGFR1 em homogenato de rim	71
Figura 30.	Gráfico da expressão de VEGFR2 em homogenato de rim	72
Figura 31.	Gráfico da expressão de VEGFR3 em homogenato de rim	73
Figura 32.	Gráfico da expressão de VEGF em glomérulos isolados	74
Figura 33.	Gráfico da expressão de VEGFR1 em glomérulos isolados	75
Figura 34.	Gráfico da expressão de VEGFR2 em glomérulos isolados	76
Figura 35.	Gráfico da expressão de VEGFR3 em glomérulos isolados	77

RESUMO

Machado, F.G. – *Efeito da administração de sunitinibe como terapia anti-angiogênica a ratos submetidos a ablação renal de 5/6* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. xxxp.

O papel da angiogênese na patogênese da doença renal crônica é incerto. De um lado, a formação de neovasos no tecido renal pode amenizar a rarefação capilar e a consequente hipóxia. De outro, a neoangiogênese podem suprir o tecido renal de células pró-inflamatórias. Investigamos o efeito do tratamento com sunitinibe (Su), um inibidor dos receptores do VEGF, no modelo de ablação renal de 5/6 (Nx) em ratos. Foram estudados os grupos: S+V, ratos submetidos a cirurgia simulada (S) e tratados apenas com veículo (V); S+Su, ratos S tratados com Su, 4 mg/kg/dia; Nx+V, ratos Nx tratados com V; e Nx+Su, ratos Nx tratados com Su. A administração de Su não provocou qualquer alteração no Grupo S. Sete e 45 dias após a remoção de massa renal, houve expansão do interstício cortical, associada a uma rarefação dos capilares peritubulares e a uma disseminação da hipóxia tecidual, normalmente confinada à região medular externa. Su não agravou essa expansão intersticial. A rarefação capilar e os sinais de hipóxia tampouco foram afetados, sugerindo pouca ou nenhuma atividade angiogênica nesse modelo. Su exacerbou a glomerulosclerose (GS) observada nos animais Nx. Esse efeito não pode ser explicado por uma redução no número ou na integridade dos podócitos, que não diferiram entre os grupos Nx+V e Nx+Su. Da mesma forma, não se encontraram evidências de que o agravamento da GS pelo Su nos ratos Nx tenha sido causado por hipertrofia do tufo glomerular ou proliferação exagerada de suas células. Entretanto, o tratamento de ratos Nx com Su associou-se ao desenvolvimento de microtrombos glomerulares, cuja organização pode explicar o agravamento da GS observado com a droga. Su não afetou a porcentagem de área endotelial no glomérulo, sugerindo que seu possível dano ao endotélio foi eminentemente funcional. A inibição do VEGF tem pouco efeito sobre ratos normais, mas pode afetar seriamente os glomérulos se administrada a animais com dano renal prévio.

SUMMARY

Machado, F.G. – *Effect of sunitinib administration used as an antiangiogenic therapy in 5/6 renal ablation rats*. [Thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2012. xxxp.

The role of angiogenesis in the pathogenesis of chronic kidney disease is unclear. Neovessel formation could ameliorate renal damage by mitigating capillary rarefaction and hypoxia. On the other hand, neoangiogenesis could facilitate the access of inflammatory cells to the renal tissue. We investigated the effect of treatment with sunitinib (Su), an inhibitor of VEGF receptors, in the 5/6 renal ablation model (Nx). Adult male Munich-Wistar rats were distributed among groups S+V, rats submitted to sham surgery (S) and treated with vehicle (V); S+Su, S rats treated with Su, 4 mg/kg /day; Nx+V, Nx rats treated with V; and Nx+Su, Nx rats treated with Su. Administration of Su caused no change in Group S. Seven and 45 days after renal mass ablation, there was expansion of the cortical interstitium associated with rarefaction of peritubular capillaries and dissemination of tissue hypoxia, which was confined to the outer medulla in S rats. Su did not worsen interstitial expansion, nor did it affect capillary rarefaction or hypoxia, suggesting that little angiogenic activity exists in this model. Nx animals exhibited glomerulosclerosis (GS), which was aggravated by Su. This effect could not be explained by changes in the number or vitality of podocytes. Worsening of GS by Su treatment could not be ascribed to tuft hypertrophy or hyperplasia, but was associated with the formation, and possible organization, of glomerular microthrombi. Su did not affect the fractional endothelial area in the glomerulus, suggesting functional damage of endothelial cells, rather than reduction of their number. VEGF inhibition has little effect on normal rats, but can seriously affect the glomerular endothelium in animals with previous renal injury.

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) e a consequente necessidade de terapia renal substitutiva representam um grave problema de saúde pública nos dias de hoje. Por essa razão, é cada vez mais importante compreender os mecanismos que levam a esse distúrbio, para assim buscar novas terapias.

A redução da massa renal em 5/6 (Nx) é um dos modelos experimentais mais utilizados para estudar a nefropatia progressiva. Consiste na retirada cirúrgica de um rim, sendo o rim remanescente submetido a infarto de 2/3 de sua massa através da ligadura de 2 ou 3 ramos da artéria renal. Esse modelo caracteriza-se por hipertensão glomerular e sistêmica (1-4), assim como por albuminúria intensa (5). Observa-se também um grande infiltrado inflamatório, fibrose intersticial e atrofia tubular (6), além de uma intensa proliferação celular (7, 8), entre outros eventos comumente associados às nefropatias crônicas. A perda progressiva de néfrons agrava ainda mais o processo, levando à substituição do parênquima renal por tecido fibroso o que determina a perda progressiva da função renal e leva a uma mortalidade de mais de 20% dos animais 90 dias após a nefrectomia. Estudos prévios realizados com o modelo Nx mostraram ainda alterações importantes da microvasculatura renal, além de um aumento da rotatividade das células endoteliais (tanto nos capilares glomerulares como nos peritubulares) em relação ao observado em animais

saudáveis. Esses estudos mostram um pico de proliferação das células endoteliais glomerulares por volta da segunda semana após a nefrectomia, seguido de uma redução significativa da proliferação dessas células, acompanhada de uma diminuição do número de alças capilares, que se torna proeminente quatro semanas após a cirurgia (9, 10). Em relação às células endoteliais peritubulares, foi demonstrado que o pico de proliferação celular ocorre na primeira semana após a nefrectomia e que, passado esse período, há uma queda contínua da atividade proliferativa dessas células, acompanhada por rarefação de capilares peritubulares (9).

As alterações da microvasculatura renal, bem como as mudanças no ritmo de proliferação das células endoteliais dos capilares renais, não são características exclusivas do modelo Nx. Estudando pacientes portadores de DRC de diferentes etiologias, Bohle et AL (11) observaram a existência de uma correlação negativa entre a área de parênquima renal ocupada por capilares peritubulares e a concentração sérica de creatinina, indicando uma associação entre a rarefação capilar e a perda de função renal. Além disso, dados recentes da literatura apontam para uma redução importante na densidade de capilares peritubulares em pacientes portadores de lesões tubulointersticiais crônicas (12). Assim sendo, é possível que a perda progressiva da microvasculatura renal participe de alguma maneira da progressão da DRC; possivelmente correlacionando-se com o desenvolvimento de fibrose glomerular e túbulo-intersticial, embora relações de causa e efeito ainda não possam ser estabelecidas (13).

A ocorrência de angiogênese em tecidos não embrionários é bem descrita em situações de recuperação de injúria tecidual pós-traumática, bem como nas vizinhanças de determinados tipos de tumores sólidos. No entanto, até o presente momento, pouco se sabe sobre a ocorrência de angiogênese no rim adulto e qual seria o seu papel tanto na manutenção da função renal normal como em sua recuperação em situações patológicas.

Alguns estudos clínicos e experimentais têm fornecido respaldo à teoria de que a angiogênese ocorre no rim adulto e exerce um papel fundamental no processo de restauro e reorganização tecidual na vigência de injúria renal. Kang et al demonstraram que a administração de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), um dos mais importantes fatores pró-angiogênicos, a ratos submetidos a nefrectomia de 5/6 resultou na preservação do número de capilares glomerulares e no aumento da densidade de capilares peritubulares no parênquima renal, além de prevenir a expansão da área intersticial ocupada por fibrose (14). Em pacientes com DRC, Eardley et al observaram que a densidade de capilares periglomerulares correlacionou-se inversamente tanto com o índice histológico de dano crônico como com os níveis urinários de MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein 1*) e com a intensidade do infiltrado macrofágico intersticial (15). Nesse mesmo estudo os autores observaram que a expressão do VEGF no tecido renal correlacionou-se diretamente com a densidade de capilares peritubulares; sugerindo que a atividade pró-angiogênica do VEGF exerceu um papel renoprotetor. Em um estudo de glomerulonefrite experimental, a administração de VEGF reduziu a extensão

das lesões glomerulares, em especial das células endoteliais, bem como a inflamação renal (16-18). Inversamente, o bloqueio do VEGF em animais acarretou o desenvolvimento de albuminúria (19), inflamação e esclerose glomerulares (19, 20), bem como o agravamento de lesões endoteliais glomerulares preexistentes. Esses achados sugerem que o VEGF exerce um importante papel na manutenção da estrutura glomerular: de um lado, contribuiria para a integridade das células que compõem os glomérulos; de outro, impediria a rarefação da microvasculatura peritubular, evitando ou atenuando o desenvolvimento de hipóxia tecidual e de fibrose intersticial (21).

Em contraste com as evidências de um efeito benéfico do VEGF, alguns achados experimentais sugerem um efeito oposto. De acordo com esse ponto de vista, a ocorrência de angiogênese no parênquima renal poderia contribuir para o estabelecimento de uma reação inflamatória crônica na região, especialmente nos casos em que já existe uma lesão renal de base. Dessa forma, o aumento do número de capilares peritubulares atuaria como via de acesso para células inflamatórias e citocinas, suprimindo o tecido renal de monócitos/macrófagos e linfócitos. Konda et al mostraram uma correlação direta entre a extensão de parênquima renal ocupado por fibrose e a densidade de capilares peritubulares na região cortical renal (22, 23). De modo semelhante, também foram demonstradas correlações positivas entre o número de células T e o número de microvasos, assim como entre este último e a quantidade de células mononucleares positivas para PD-ECGF (*platelet-derived endothelial*

cell growth factor), um fator mitógeno para células endoteliais derivado de plaquetas humanas (17). Adicionalmente, estudos empregando o modelo de ablação renal de 5/6 demonstraram que o tratamento com um anticorpo capaz de neutralizar a atividade do VEGF limitou o aparecimento de albuminúria e a hipertrofia glomerular (24), que é um dos mecanismos de adaptação à perda progressiva de néfrons (25). O mesmo tratamento aplicado a animais uninefrectomizados demonstrou que a hipertrofia se desenvolve de forma dependente do VEGF (26).

Há evidências, ainda, de que o VEGF contribui para a disfunção e hipertrofia glomerulares observadas em modelos experimentais de nefropatia diabética (27). Sabe-se que dentre os fatores implicados na patogênese desse processo, o ambiente hiperglicêmico tem um papel central (28), estimulando a produção de VEGF (29), bem como a de citocinas e fatores de crescimento que favorecem a inflamação e a deposição de matriz extracelular (30). A administração de diferentes fatores anti-angiogênicos como a endostatina (31), a tunstatina (32) e a angiostatina (33) a camundongos diabéticos durante as primeiras semanas após a indução da doença preveniu o aumento da albuminúria e a elevação da creatinina sérica, bem como a hipertrofia glomerular, a deposição de colágeno e a infiltração de macrófagos nos glomérulos (31, 32). A administração de terapias anti-angiogênicas a animais diabéticos tem mostrado resultados positivos (34), enquanto alguns tratamentos que têm como alvo principal o VEGF reduziram a albuminúria, impediram o aumento do volume glomerular (27) e amenizaram os danos glomerulares, como

expansão mesangial, alterações dos processos podocitários e espessamento da membrana basal glomerular (35). Outro achado consistente com o conceito de que a angiogênese participa da perpetuação da DRC é o de que os macrófagos são capazes de produzir uma série de fatores pró-angiogênicos, como PD-ECGF (36) e TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*), além do próprio VEGF (37-39).

Depreende-se desses resultados conflitantes que o papel da angiogênese na DRC é atualmente incerto e que um esforço considerável ainda é necessário para elucidá-lo. Para tanto, é preciso testar a ação de drogas com atividade anti-angiogênica em modelos experimentais de nefropatia crônica. Uma vez que o principal e mais potente fator pró-angiogênico é o VEGF, este desponta como principal alvo das terapias destinadas a coibir a formação de neovasos.

O VEGF teve sua primeira descrição na década de 1980 (40), sendo inicialmente denominado VPF (*vascular permeability factor*) e tornando-se conhecido como um mediador específico da alta permeabilidade de vasos sanguíneos associados a tumores malignos. No final daquela década, chegou-se a sua purificação e clonagem e foi descrita sua potente atividade mitogênica, específica para células endoteliais (41-44). A família do VEGF consiste em seis glicoproteínas conhecidas como VEGF-A, -B, -C, -D, -E e o PlGF (*placental growth factor*), sendo o VEGF-A a forma mais bem caracterizada, usualmente designada apenas como VEGF. São conhecidas várias isoformas do VEGF, derivadas de *splicing* alternativo e denominadas de acordo com o número de aminoácidos que as compõem: VEGF₁₁₀,

VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆. Nos roedores, as isoformas diferem das humanas por possuir um aminoácido a menos. As isoformas predominantes e mais importantes são o VEGF₁₂₁ e o VEGF₁₆₅.

Para exercer seus efeitos, o VEGF liga-se a dois receptores tirosina quinase (RTK – *receptor tyrosina kinase*), o VEGFR1 (ou Flt-1) e o VEGFR2 (ou Flk-1, em humanos denominado KDR). A resposta à ativação do VEGFR1 está relacionada exclusivamente à angiogênese, enquanto a ativação do VEGFR2 promove também a formação de capilares linfáticos (linfangiogênese) (45, 46). No entanto, a maioria das ações atribuídas ao VEGF é mediada pelo VEGFR2, enquanto o papel do VEGFR1 ainda não está completamente esclarecido. O VEGF também pode ligar-se às neuropilinas 1 e 2, que têm como principal função intensificar a sinalização do VEGFR2 (47). Uma importante variação do VEGFR1 é o sFlt-1, derivado de *splicing* alternativo. Essa molécula não possui a porção transmembrana nem o domínio tirosina kinase intracelular, mas, ainda assim, é capaz de se ligar ao VEGF com a mesma afinidade e especificidade do receptor completo, atuando como um *decoy* e exercendo um potente e seletivo bloqueio competitivo da ação do VEGF. Por outro lado, o sFlt-1 também é capaz de formar dímeros com os receptores VEGFR1 e VEGFR2, impedindo a ativação da porção intracelular destes últimos (48, 49).

No tecido renal, a produção de VEGF ocorre predominantemente nos podócitos, nas células do túbulo distal e coletor e, de forma menos intensa, nos túbulos proximais (50). O VEGF produzido pelos podócitos pode exercer, além de seus efeitos parácrinos, uma ação autócrina, influenciando

substancialmente a sobrevida e a integridade do próprio podócito e a da membrana diafragmática (51).

Muitos medicamentos atualmente utilizados no tratamento de neoplasias têm como principal mecanismo de ação a inibição da atividade do VEGF. O bevacizumab; um anticorpo monoclonal recombinante humano anti-VEGF, promove a redução do VEGF solúvel no plasma, impedindo sua ligação com qualquer um de seus receptores. O VEGF-Trap é uma molécula artificial que também atua como um receptor solúvel, ligando-se a todas as isoformas do VEGF-A. Recentemente, desenvolveu-se uma estratégia alternativa para deter a ação do VEGF, através da inibição do domínio tirosina quinase de seus receptores. Existem atualmente várias drogas capazes de exercer esse efeito, como o sunitinibe, o sorafenibe, o AG 013736 e o vatalanibe (52). O malato de sunitinibe (SU11248; Sutent[®]; Pfizer Inc, New York, NY, USA) foi aprovado pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) em 2006 para o tratamento do carcinoma celular renal avançado e do tumor estromal gastrointestinal (*GIST*, na sigla em inglês). O malato de sunitinibe é um potente inibidor tirosina-quinase de amplo espectro, que além de atuar sobre os receptores 1 a 3 do VEGF (VEGFR1-3), também age sobre o PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) α e β , o FLT3 (*fetal liver tyrosine kinase receptor 3*) e o KIT (*stem-cell factor receptor*) (52-54). Sua atividade anti-neoplásica se dá sobre células tumorais cuja sinalização para proliferação e sobrevida é dependente desses receptores. Além disso, seu efeito inibitório sobre os receptores do VEGF lhe

confere uma importante ação anti-angiogênica, que age indiretamente sobre os tumores limitando-lhes o aporte sanguíneo (54, 55).

Com base nas considerações acima, o presente estudo visou avaliar o possível efeito terapêutico da inibição da angiogênese, em um modelo experimental de nefropatia crônica progressiva, através da administração do malato de sunitinibe, que designaremos por Su daqui em diante.

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi o de avaliar se a administração de malato de sunitinibe previne ou retarda a progressão da nefropatia crônica induzida pela remoção de 5/6 da massa renal, partindo da hipótese de trabalho de que a neoangiogênese participa da patogênese da DRC por facilitar o influxo de células inflamatórias ao parênquima renal.

2. MÉTODOS

No presente estudo utilizamos ratos da cepa Munich-Wistar obtidos de uma colônia dessa linhagem de ratos estabelecida no biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $60 \pm 5\%$ e ciclo claro/escuro de 12/12h.

2.1 Obtenção do modelo experimental

Os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e rompun (10 mg/kg), intramuscular, após o que foi efetuada uma laparotomia mediana sob assepsia. Foi removido o rim direito e foram infartados 2/3 da massa renal esquerda através da ligadura de 2 a 4 ramos da artéria renal correspondente, chegando-se assim a uma redução de 5/6 da massa renal total. Após a cirurgia os animais foram mantidos em gaiolas aquecidas por 24 horas e medicados com enrofloxacino.

Droga

Malato de sunitinibe: Sutent[®] (Pfizer). Malato de sunitinibe diluído (imediatamente antes do uso) em carboximetilcelulose (CMC) 0,5% em volume de 2 ml/kg de peso corpóreo e administrado por gavagem

intragástrica única diária, ao longo de todo o estudo, na dosagem de 30 mg/m² de superfície corpórea, equivalente a 4 mg/kg/dia. Essa dosagem foi calculada com base na maior dosagem utilizada na prática clínica, que é de 50 mg/dia, que equivale aproximadamente a 30 mg/m² de superfície corpórea (assumindo uma superfície corpórea média de 1,73 m² em adultos).

2.2 Grupos experimentais

- **S+V:** 35 animais que foram submetidos a manipulação do pedículo (Sham) sem retirada da massa renal e receberam CMC apenas.
- **S+Su:** 35 animais Sham que receberam malato de sunitinibe 4 mg/kg/dia.
- **Nx+V:** 50 animais submetidos a cirurgia de retirada de 5/6 da massa renal e receberam CMC apenas.
- **Nx+Su:** 52 animais Nx que receberam malato de sunitinibe 4 mg/kg/dia.

2.3 Esquema do Protocolo Experimental

Aos 7 e aos 45 dias os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para a coleta da urina de 24 horas para a medida de albuminúria através da técnica de imuno-difusão radial (56). Nesses mesmos dias, determinamos também a pressão caudal, utilizando um método opto-eletrônico (BP 2000 Blood Pressure Analysis Syste, Visitech Systems, Apex, North Carolina, Estados Unidos).

2.4 Obtenção do tecido renal e de amostras de sangue

Após 7 ou 45 dias um grupo de animais (24 do grupo S+V, 24 do grupo S+Su, 32 do grupo Nx+V e 33 do grupo Nx+Su) foi anestesiado conforme descrito acima. A aorta foi rapidamente canulizada e amostras de sangue foram obtidas para determinação do hematócrito arterial (Ht) e da concentração sérica de creatinina (Scr). Em seguida, o tecido renal foi rapidamente perfundido *in situ*, sob pressão idêntica à respectiva pressão arterial, com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% e, em seguida, com

solução fixativa de Dubosq-Brazil (ácido pícrico em álcool etílico 80%, formaldeído 38% e ácido acético glacial). Após a perfusão, o rim foi pesado, incluído em parafina e preparado utilizando técnicas sequenciais convencionais, para o estudo histológico e imuno-histoquímico.

Uma segunda coorte de animais (7 do grupo S+V, 8 do grupo S+Su, 11 do grupo Nx+V e 12 do grupo Nx+Su) foi anestesiada como descrito anteriormente aos 7 e 45 dias após a ablação renal. O tecido renal foi então retirado e rapidamente congelado em nitrogênio líquido, sendo armazenado a -80°C para posterior análise da expressão gênica. Outro contingente (2 do grupo S+V, 2 do grupo S+Su, 3 do grupo Nx+V e 3 do grupo Nx+Su) foi submetido, aos 7 dias, a idêntico procedimento para análise de expressão gênica em glomérulos isolados.

Um terceiro lote de animais (um rato S+V, um S+Su, 4 ratos Nx+V e 4 Nx+Su) recebeu aos 45 dias após a ablação renal, uma injeção única endovenosa de 60 mg/kg de cloridrato de pimonidazol (HypoxypTM-1, Burlington, MA, USA), uma molécula que se distribui amplamente pelo organismo e adere a determinadas proteínas celulares quando a pressão parcial de oxigênio vigente é inferior a 10 mmHg a 37 ° C. Quarenta e cinco minutos após a administração, os animais foram anestesiados para remoção do tecido renal que, posteriormente, foi incluído em parafina para revelação através de um kit apropriado (HypoxypTM-1, Burlington, MA, USA).

A Tabela 1 mostra em detalhe a composição dos diversos grupos experimentais e sua distribuição para as análises morfológicas e de expressão gênica.

2.5 Determinação da concentração urinária de albumina

A albuminúria de 24 horas ($U_{alb}V$) foi quantificada pelo método de imunodifusão radial (56) na urina de 24 horas coletada em gaiolas metabólicas. A reação imunológica processou-se em gel de agarose a 2% com tampão tris-barbital e anticorpo anti-albumina de rato (Cappel, Ohio, EUA). Após 24 a 48h, as áreas dos halos formados nas placas foram lidas com régua apropriada para o cálculo da concentração de albumina.

2.6 Histologia

Os tecidos renais foram fatiados em 2-3 segmentos coronais, de 4-5 mm de espessura, e pós-fixados em formaldeído a 10% em tampão fosfato. Após a fixação, os tecidos foram mantidos por 14 horas em processador automático de tecidos (Jung Histokinette 2000, Leica Instruments GmbH, Alemanha) para desidratação, diafanização e impregnação com parafina. O tecido renal assim incluído foi cortado com micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) e os cortes, de 4 μ m de espessura, foram montados sobre lâminas silanizadas, para melhor aderência, e corados pela reação de Tricrômio de Masson para a quantificação das lesões glomerulares e para determinar a fração da área cortical ocupada por tecido intersticial.

2.7 Histomorfometria renal

A análise das lesões glomerulares foi realizada pela avaliação de todos os perfis glomerulares encontrados no corte histológico. Cada glomérulo foi classificado em “normal”, para glomérulos sem qualquer lesão aparente; “esclerosado”, para glomérulos que apresentavam qualquer grau de lesão glomerular esclerosante (oclusão de alças capilares por material hialino e/ou formação de sinéquias com o folheto parietal da cápsula de Bowman); “trombosado”, para os glomérulos que apresentavam um ou mais microtrombos no interior de alças capilares, associados ou não a lesões esclerosantes; e “aneurismático”, para os glomérulos que apresentavam um ou mais microaneurismas. A fração da córtex renal ocupada por tecido intersticial (%INT), corado positivamente pelo tricrômio de Masson, foi quantificada por um método de contagem de pontos em 25 campos microscópicos consecutivos, num aumento final de 400x com uma ocular graticulada de 100 pontos.

2.8 Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada para a avaliação da infiltração de macrófagos no interstício renal, para a identificação dos capilares glomerulares e peritubulares, para a pesquisa de células em atividade proliferativa, para avaliar o número e a integridade dos podócitos e para a localização do HypoxyprobeTM-1 infundido antes da retirada do tecido renal (para avaliação de hipóxia tecidual).

Após 30 minutos em estufa a 60°C, as lâminas contendo os cortes de tecido renal foram desparafinizadas através de uma sequência de 3 banhos de xilol e reidratadas com uma bateria de banhos em concentrações decrescentes de etanol em água destilada: etanol 100% (2 banhos), etanol 96%, etanol 80% e água destilada. Para todos os marcadores utilizamos solução salina tris-tamponada (TBS) 0,05M de Tris e 0,15M de cloreto de sódio pH 7,6. Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida para evitar o ressecamento dos cortes. Para todas as marcações, a recuperação antigênica foi realizada com calor úmido em solução de ácido cítrico 10mM de pH 6,0, a 98°C em panela a vapor por 30 minutos (nas reações para identificação de macrófagos, de *zonula occudens-1*, de células em proliferação e da hipóxia tecidual) ou em panela de pressão por 4 minutos (nas reações para identificação de podócitos e de endotélio vascular). Com exceção da marcação para macrófagos, o bloqueio da peroxidase endógena foi obtido pela incubação com uma solução de Peróxido de Hidrogênio em Álcool Metílico durante 30 minutos. Após os procedimentos de desparafinização, recuperação antigênica e bloqueio da peroxidase endógena (quando aplicável) os experimentos foram realizados conforme descrito a seguir.

Ao final das reações os tecidos renais foram contracorados com hematoxilina de Mayer e montados entre lâmina e lamínula com utilização de glicerol de Kaiser em gelatina (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Infiltração de macrófagos

Para a detecção de macrófagos (MØ), obteve-se inicialmente o bloqueio da marcação inespecífica utilizando soro não imune de coelho (Dako, Dinamarca). Em seguida, os tecidos foram incubados durante 18 horas com anticorpo primário anti-ED-1 desenvolvido em camundongo (Serotec, MCA341R Oxford, Reino Unido). Após essa etapa, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo desenvolvido em coelho (Dako, Carpinteria, CA, EUA) e em seguida com o complexo (APAAP) fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina (Dako, Carpinteria, CA, EUA). Para a revelação, utilizamos o substrato cromogênico Fast-Red (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). A quantificação da infiltração por MØ na córtex renal foi realizada pela contagem de células positivas para ED-1, sob aumento de 400X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 0.13 mm².

Identificação de capilares glomerulares e peritubulares

Os vasos sanguíneos foram identificados pela presença do antígeno aminopeptidase-P (JG-12) que é expresso exclusivamente por células endoteliais vasculares. Neste caso, o bloqueio da marcação inespecífica foi conseguido utilizando soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) diluído em uma solução de leite desnatado a 2%. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário, dirigido contra o antígeno JG-12 de ratos e desenvolvido em camundongos (BenderMed Systems Inc, Burlingame, CA, USA), também ele diluído em leite. Após 18 horas de

incubação, os tecidos foram lavados com TBS e submetidos a bloqueio pós-primário e amplificação de sinal utilizando um *kit* comercial (Novolink® para Peroxidase, Novocastra ® Newcastle upon Tyne, Reino Unido). A revelação foi realizada com o cromógeno DAB (Dako, Carpinteria, CA, Estados Unidos).

Para estimar a densidade de capilares no tecido renal, foram efetuadas duas diferentes análises quantitativas: 1) medida da porcentagem da área glomerular ocupada por endotélio e 2) determinação da densidade de capilares peritubulares na córtex renal. Para a primeira dessas análises, utilizamos o programa Image-Pro® Plus versão 7.0 para Windows® (Media Cybernetics, Estados Unidos). Para a segunda, efetuamos a contagem do número de capilares observados por campo na córtex renal. O número médio de perfis capilares por mm² foi obtido após a contagem de 25 campos microscópicos.

Identificação de células em proliferação

As células em atividade proliferativa foram identificadas pela presença do antígeno nuclear de células em proliferação (*proliferating cell nuclear antigen*, PCNA) utilizando o método de imunoperoxidase e o polímero Envision® para Peroxidase (Dako, Carpinteria, CA, Estados Unidos).

Para o bloqueio da marcação inespecífica, foi utilizado soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) diluído em uma solução de leite desnatado a 2%. Logo em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário anti-PCNA desenvolvido em camundongo (Dako,

Carpinteria, CA, EUA) também diluído em leite. Após 18 horas de incubação foi aplicado o polímero Envision™ aos tecidos. A revelação foi realizada com o cromógeno DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA).

A quantificação das células positivas para PCNA foi realizada pela contagem das mesmas na córtex renal, sob aumento de 400X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 0.13 mm².

Densidade de podócitos por glomérulo

A identificação de podócitos foi realizada através da pesquisa do antígeno WT-1 (*Wilms' tumor protein 1*). As lâminas foram submetidas a bloqueio de marcação inespecífica com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) diluído em uma solução de leite desnatado a 2% e, em seguida, com anticorpo primário anti-WT-1 humano desenvolvido em camundongo (Dako, Carpinteria, CA, EUA). Após 18 horas de incubação, os tecidos foram lavados com TBS e submetidos a bloqueio pós-primário e amplificação de sinal utilizando um *kit* comercial (Novolink® para Peroxidase, Novocastra® Newcastle upon Tyne, Reino Unido). A revelação foi realizada com o cromógeno DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA). A quantificação foi realizada pela contagem do número de células positivas por glomérulo em 25 glomérulos por rato.

Expressão do antígeno ZO-1

A integridade podocitária e de suas conexões foi avaliada através da pesquisa da expressão do antígeno ZO-1 (*zonula occludens-1*). Para tanto, as lâminas foram submetidas ao bloqueio de marcação inespecífica utilizando soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) diluído em uma solução de leite desnatado a 2% e, em seguida, com anticorpo primário anti-ZO-1 desenvolvido em coelho (Zymed Laboratories, EUA). Após 18 horas de incubação, os tecidos foram submetidos a bloqueio pós-primário e amplificação de sinal utilizando um *kit* comercial (Novolink® para Peroxidase, Novocastra ® Newcastle upon Tyne, Reino Unido). A revelação foi realizada com o cromógeno DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA). Para a avaliação da porcentagem da área glomerular ocupada por ZO-1 utilizamos o programa Image-Pro® Plus versão 7.0 para Windows® (Media Cybernetics, Estados Unidos).

Identificação das áreas renais em hipóxia

Após os procedimentos de desparafinização, recuperação dos antígenos e de bloqueio da peroxidase endógena, descritos anteriormente, cortes de 4µm foram submetidos ao bloqueio de marcação inespecífica com soro não imune de cabra (Vector Lab, Burlingame, EUA) durante 30 min e incubados com anticorpo primário anti-pimonidazole desenvolvido em coelho (*PAb 2627, kit Hypoxyprobe™_1*). Após 18 horas de incubação, os tecidos foram submetidos a bloqueio pós-primário e amplificação de sinal utilizando

um *kit* comercial (Histofine, Nichirei Bioscience Inc, Tóquio, Japão). A revelação foi realizada com o cromógeno DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA).

2.9 Isolamento de glomérulos para análise da expressão gênica

Com o objetivo de quantificar a expressão do VEGF e seus receptores 1, 2 e 3 exclusivamente nos glomérulos, um grupo de animais foi anestesiado conforme descrito anteriormente 7 dias após a ablação renal e submetido a uma laparotomia mediana. A aorta abdominal foi canulada e o rim esquerdo perfundido "in situ" a uma pressão igual à sistêmica, inicialmente com tampão PBS (phosphate buffered saline) em pH 7,4 e em seguida com uma solução de microesferas (Dynabeads[®]) suspensas em PBS. Cerca de $4 \cdot 10^7$ microesferas foram infundidas em cada animal. Em seguida, o rim foi rapidamente retirado e cortado em fragmentos de volume não superior a 1 mm^3 . Esses fragmentos foram transferidos para um tubo Falcon, ao qual foram adicionados 45 ml de tampão PBS gelado. Após breve homogeneização, essa solução foi passada através de uma peneira de aço inoxidável com malha de $60 \mu\text{m}$. O material que atravessou a peneira foi recolhido em um novo tubo Falcon ao qual se adicionou tampão PBS gelado até completar o volume da solução para 50 ml.

O tubo Falcon contendo a amostra foi mantido em repouso sobre uma estante, na posição vertical, a 4°C , durante 20 minutos, para fracionamento, por decantação, de sua porção mais densa, composta por glomérulos com microesferas aprisionadas em suas alças capilares. A fase menos densa foi

cuidadosamente removida, restando apenas cerca de 2 ml no fundo do tubo. O material decantado foi acondicionado em tubos Eppendorf e, após breve homogeneização, esses tubos foram submetidos durante cerca de 2 minutos a um campo magnético apropriado para a separação de partículas de ferro (Dynal® Biotech, Oslo, Noruega). A seguir, todo o líquido contido nos tubos foi descartado e os glomérulos aderidos à parede do tubo foram ressuspensos em 1 ml de tampão PBS gelado. Para verificação do grau de pureza dos extratos, uma amostra de cerca de 50 µl foi corada com azul de metileno e observada ao microscópio. Os extratos que continham apenas glomérulos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posterior análise da expressão gênica pela técnica de RT-PCR em tempo real. Os extratos contaminados com restos tubulares ou vasculares foram descartados.

2.10 Reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa em tempo real (Real time RT-PCR)

Para análise do RNA, amostras de tecido renal e de extrato de glomérulos foram inicialmente homogeneizadas e manipuladas segundo o método TRizol® (Invitrogen®, Grand Island, NY, EUA) de extração de RNA total de extração e purificação de RNA total. Um fragmento de aproximadamente 50 mg da amostra foi triturado com o homogenizador Polytron® (Kinematica, Luzern, Alemanha) e ressuspensado em 1 ml de TRizol (Invitrogen®, Grand Island, NY, EUA). O método utiliza solução

monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, que lisa e dissolve componentes celulares mantendo a integridade do RNA. Às amostras de tecido renal dissolvidas em Trizol[®] e foi adicionado clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha), na proporção de 0,2 ml de clorofórmio para 1ml de TRizol[®] (Invitrogen[®], Grand Island, NY, EUA). As amostras foram centrifugadas a 12.000 g a 4°C para a obtenção de duas fases, uma orgânica e outra aquosa, onde se concentra o RNA. O RNA foi reconstituído através da adição de isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) na proporção de 0,5 ml de isopropanol em 1 ml de TRizol[®]. Em seguida foi realizada a centrifugação a 12.000 g para a obtenção do RNA no precipitado. Após o isolamento, o RNA foi lavado com etanol a 75% e novamente centrifugado a 10.500 g. O pellet de RNA formado foi ressuspendido em água bidestilada livre de RNase e DNase (Gibco[®], Grand Island, NY, EUA). Após esta etapa, quantificamos o RNA diluído, utilizando o espectrofotômetro Nanodrop (ND-1000 UV-Vis, Thermo Fisher, Wilmington, DE, EUA). Amostras de RNA só foram utilizadas quando a relação entre as leituras em comprimentos de onda de 260/280nm e 260/230 foi superior a 1,8. O RNA total foi estocado a -80°C até o uso.

Síntese do DNA complementar (cDNA)

O RNAm foi separado do RNA total obtido através da utilização de primers Oligo-dT (Invitrogen) que se ligam à cauda poli-A do RNAm. Dois µg de RNA total foram tratados com DNase I (1U/mL) e incubados por 15 minutos a 25°C. Adicionamos a seguir 2 µl de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ *Primer**

(0,1mg/ml) à solução e a incubamos a 65°C por 10 minutos e posteriormente a 4°C por 5 minutos. A seguir, adicionamos 1 µl de BSA Acetilada (20mg/mL) (Promega, Madison, WI, EUA); 10 µl de 5X *First Strand Buffer* (Invitrogen®); 10 µl de desoxinucleotídeo trifosfato 10 mM (dNTP Promega) e 2µl de M-MLV *Reverse Transcriptase* (200 U/ml - Invitrogen). Essa solução foi incubada a 37°C por 1 hora, a 65°C por 10 minutos e a 4°C por 5 minutos.

PCR de tempo real

Para amplificar os transcritos gênicos, utilizamos *primers* TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e alguns *primers* que foram projetados baseando-se na sequência conhecida de bases nitrogenadas descritas no GenBank, sendo posteriormente processados pelo programa Primer Express da *Applied Biosystems* para adequá-los à técnica de PCR em tempo real. Cada reação foi desenvolvida em triplicata, com volume final de 10 µl. Para reações nas quais utilizamos *primers* TaqMan, adicionamos 5 µl de Mix TaqMan, 0,5 µl de primer, 1 µl de cDNA completando com água até 10 µl. Já para as outras reações, utilizamos SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Reino Unido), sendo que as condições de amplificação foram previamente padronizadas para cada transcrito. Em cada ensaio, foram utilizados controles positivos e negativos. A reação foi desenvolvida em aparelho ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Uma relação comparativa entre os ciclos da reação (CT) foi usada para determinar a expressão gênica em relação ao controle

HPRT ou GAPDH (gene *housekeeping*, calibrador). Dessa maneira, níveis arbitrários de RNAm são expressos como uma diferença de “n” vezes em relação ao calibrador. Para cada amostra, os valores (C_T) dos genes-alvo são normalizados e o valor usado para demonstrar a expressão relativa dos genes alvo é calculado utilizando a expressão $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (descrita por Livak, K em Applied Biosystems User Bulletin #2).

Primers utilizados

- PRIMER SENSE VEGFr2 - KDR:

5'ACTACACGGTCATCCTCACCAATC 3'

- PRIMER ANTISENSE VEGFr2- KDR:

5'AGGAGAGATCAAGGCTTTCTCACC 3'

- PRIMER SENSE VEGFr 1 - FLT1:

5'GACAAGGGACTCTACACTTGTCGT 3'

- PRIMER ANTISENSE VEGFr 1 – FLT1:

5'CGATGCTTCACGCTGATAAATCCC 3'

- PRIMER SENSE VEGFr 3/Flt4:

5'AAGGAAGCTTCTTCACCCAGCATC-3'

- PRIMER SENSE VEGFr 3/Flt4

5'GGCAAATGTCTTACAGGGTGTCCA-3'

- HPRT – Taqman: Rn01527838_g1

- VEGF A – TaqMan: Rn00582935_m1

2.11 Creatinina sérica

Para a dosagem, por colorimetria, da concentração da creatinina (S_{cr}) em amostras obtidas imediatamente antes da perfusão dos tecidos renais, foi utilizado um kit disponível comercialmente (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil).

2.12 Análise estatística

Os resultados deste estudo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de dois fatores: natureza do tratamento e tempo de tratamento, com comparações pareadas entre grupos pelo método de Bonferroni (57). Os resultados obtidos nos estudos de expressão gênica foram analisados através do método ANOVA de um fator com comparações pareadas entre grupos pelo método de Tukey (58). Todos os resultados estão representados como média $\pm$ erro padrão (EP).

3. RESULTADOS

No presente estudo, foi observada a morte de apenas um animal nefrectomizado após cerca de 20 dias de tratamento com malato de sunitinibe. Não houve mortalidade nos demais grupos experimentais.

Os resultados referentes a peso corpóreo (PE), pressão caudal (PC), albuminúria de 24 horas (UalbV), concentração de creatinina sérica (Scr) e hematócrito arterial (Ht) 7 e 45 dias após a ablação renal são apresentados nas Tabela 2 e 3 e nas Figuras 1 a 5. Todos os animais ganharam peso ao longo do estudo (Figura 1). No entanto, os animais nefrectomizados, tratados ou não, sempre cresceram menos do que os controles. O tratamento com Su não afetou significativamente o PE dos animais nefrectomizados ($p>0,05$), porém os animais S+Su apresentaram PE significativamente menor do que o respectivo grupo não tratado ao final do período de estudo ($p<0,05$).

Durante todo o período do estudo, os animais do Grupo S+V e S+Su não apresentaram, como esperado, qualquer alteração significativa da PC (Figura 2). Em contraste, os animais nefrectomizados já apresentavam, 7 dias após a remoção de massa renal, uma elevação significativa da pressão arterial, que se agravou após 45 dias. O tratamento com Su não agravou a hipertensão nos animais Nx, ($p>0,05$). Quanto à UalbV (Figura 3), o tratamento com Su não resultou em qualquer alteração nos animais S. Já os animais Nx apresentaram uma elevação acentuada da UalbV em relação ao

Grupo S ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre animais nefrectomizados tratados e não tratados.

Os animais S não apresentaram alterações quanto à Scr quando tratados com Su ($p > 0,05$) (Figura 4). Quanto aos animais Nx, houve um aumento significativo da Scr comparados ao Grupo S, que se manteve aos 45 dias. O tratamento com Su levou a uma elevação adicional da Scr aos 45 dias.

Com relação ao Ht (Figura 5), os animais do grupo S não apresentaram alterações e o tratamento com Su não alterou de forma significativa esse parâmetro. No entanto, os animais submetidos a nefrectomia de 5/6 apresentaram uma redução significativa no Ht após 45 dias de tratamento, a qual foi agravada pelo tratamento com Su ($p < 0,05$).

Os resultados referentes à expansão da área intersticial da córtex renal (Figuras 6 e 7) estão apresentados nas Tabelas 4 e 5. Pudemos verificar que, aos 7 dias, os animais nefrectomizados apresentaram um pequeno aumento numérico em relação aos animais S ($p > 0,05$) e que o tratamento com Su não levou a qualquer alteração desse parâmetro ($p > 0,05$). Aos 45 dias, os animais Nx apresentaram um aumento acentuado da %INT comparados aos animais S ($p < 0,05$). Novamente, não houve diferença estatística entre os grupos Nx+V e Nx+Su ($p > 0,05$), indicando que o tratamento com Su não interferiu com a %INT.

A intensidade da infiltração de MØ na região intersticial da córtex renal está representada nas Figuras 8 e 9 e nas Tabelas 4 e 5. Não houve diferença significativa entre os grupos S+V e S+Su. Os animais Nx, tratados

ou não, exibiram apenas um aumento numérico aos 7 dias, comparados aos respectivos controles. Após 45 dias, os animais nefrectomizados apresentaram um intenso infiltrado macrofágico quando comparados aos animais S ($p<0,05$) e também em relação ao observado aos 7 dias ($p<0,05$). O tratamento com Su não alterou a densidade dessa infiltração nos animais Nx ($p>0,05$).

A análise da pesquisa quantitativa de células tubulares e intersticiais positivas para o PCNA está representada nas Figuras 10 a 13 e nas Tabelas 4 e 5. A proliferação de células tubulares e intersticiais foi semelhante entre os animais do grupo S+V e os do grupo S+Su, tanto aos 7 quanto aos 45 dias de tratamento. Nos ratos Nx ocorreu um aumento acentuado do número de células positivas para PCNA aos 7 dias após a ablação renal. Aos 45 dias, essa atividade proliferativa se reduziu, mantendo-se porém elevada comparada ao Grupo S. O tratamento com Su não modificou esse parâmetro.

Os resultados referentes ao número de capilares peritubulares na córtex renal, avaliado pela expressão do antígeno JG-12, específico para o endotélio, estão representados nas Figuras 14 e 15 e nas Tabelas 4 e 5. A partir dos 7 dias após a nefrectomia os animais Nx passaram a apresentar uma redução significativa do número de capilares peritubulares em comparação com o Grupo S ($p<0,05$). Essa redução foi progressiva, sendo que após 45 dias da nefrectomia, a densidade de capilares peritubulares foi significativamente menor em comparação ao observado aos 7 dias ($p<0,05$). O tratamento com Su não resultou em uma alteração significativa seja nos

animais S ou nos animais Nx indicando que, mesmo sob bloqueio dos receptores para o VEGF, não houve rarefação de capilares peritubulares nos animais S, nem agravamento da mesma nos nefrectomizados.

.A hipóxia tecidual, demonstrada pela presença do pimonidazole, restringiu-se à região medular externa nos ratos S (Figura 16), corroborando observações anteriores (59). O tratamento com o Su não resultou em qualquer alteração desse padrão. A nefrectomia de 5/6 resultou em uma subversão desse padrão, com disseminação da hipóxia por todo o tecido renal. Esse perfil não se alterou quando os ratos nefrectomizados foram tratados com Su.

Nas Tabelas 6 e 7 e nas Figuras 17 e 18 estão representados os resultados referentes à morfologia glomerular. Aos 7 dias, os ratos dos grupos S+V e S+Su não apresentaram alterações glomerulares - 100% de seus glomérulos foram classificados como normais. Aos 45 dias, os animais do grupo S+V continuaram com 100% de seus glomérulos classificados como normais. Esse quadro se repetiu no Grupo S+Su, apesar da presença de um pequeno número de glomérulos com microaneurismas ($p>0,05$). Aos 7 dias de tratamento, os animais Nx, tratados ou não, apresentaram uma pequena quantidade de glomérulos não classificados como normais. No entanto, não houve diferença estatística quando comparados a seus respectivos grupos controle ($p>0,05$ vs. respectivo S). No entanto, aos 45 dias, os animais nefrectomizados tratados com Su apresentaram uma elevação significativa da frequência de glomérulos esclerosados ($p<0,05$ vs.

Nx+V) e também aumentou significativamente a porcentagem dos glomérulos que apresentavam microtrombos ($p < 0,05$ vs. Nx+V).

Os resultados referentes ao volume glomerular estão descritos nas Tabelas 8 e 9 e graficamente representados na Figura 19. Aos 7 dias, os animais Nx, tratados ou não, não apresentavam aumento significativo do volume glomerular em comparação com os animais S. Após 45 dias, os animais Nx+V desenvolveram, corroborando estudos anteriores, uma acentuada hipertrofia glomerular. O tratamento com Su atenuou o desenvolvimento de hipertrofia glomerular, levando a uma diferença significativa com o Grupo Nx+V, embora os tufo glomerulares nesse grupo continuassem maiores do que no Grupo S+V.

Aos 7 dias, os ratos Nx+V apresentaram apenas um aumento numérico na proliferação de células glomerulares (Figuras 20 e 21 e Tabelas 8 e 9), enquanto nem mesmo essa tendência foi observada no Grupo Nx+Su. Aos 45 dias, os valores obtidos para os 4 grupos foram muito semelhantes.

Os animais do grupo S+Su não apresentaram diferença na porcentagem da área glomerular positiva para ZO-1 comparados ao grupo S+V, tanto aos 7 quanto aos 45 dias após a ablação renal, indicando preservação da integridade dos podócitos (Figuras 22 e 23 e Tabelas 8 e 9). No entanto, os animais nefrectomizados apresentaram uma redução significativa da marcação para ZO-1 a partir de 7 dias após a redução da massa renal, o que é compatível com lesão podocitária. O tratamento com Su não resultou em alteração adicional da expressão de ZO-1, não havendo

diferença significativa entre os animais Nx+V e Nx+Su nem aos 7 nem aos 45 dias de tratamento.

O número de podócitos por glomérulo, avaliado por meio da detecção do antígeno WT-1, reduziu-se significativamente no Grupo Nx 45 dias após a ablação renal (Figuras 24 e 25 e nas Tabelas 8 e 9). O número de podócitos não foi alterado pelo tratamento com Su, tanto nos animais S quanto nos Nx.

A área glomerular ocupada por endotélio, avaliada por meio da detecção do antígeno JG-12, está representada nas Figuras 26 e 27 e nas Tabelas 8 e 9. Os animais do grupo S+Su não apresentaram diferença quanto à área endotelial glomerular comparados ao respectivo grupo não tratado ($p>0,05$), indicando pouca ou nenhuma interferência do tratamento com Su nos animais S. Quanto aos animais nefrectomizados, observamos apenas uma diferença numérica em comparação com o Grupo S 7 dias após a ablação ($p>0,05$). No entanto, essa diferença tornou-se significativa aos 45 dias, indicando perda progressiva de capilares glomerulares. O tratamento com Su não alterou de forma significativa a área endotelial glomerular nos animais Nx, tanto aos 7 quanto aos 45 dias.

A expressão gênica do VEGF e de seus receptores 1, 2 e 3 (VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3), foi avaliada por RT-PCR em tempo real aos 7 e aos 45 dias (homogenato de tecido renal) e aos 7 dias (extrato de glomérulos isolados). Os resultados estão representados graficamente nas Figuras 28 a 35. Os resultados obtidos da expressão do VEGF e de seus receptores 1, 2 e 3 em homogenato de tecido renal foi bastante semelhante. Aos 7 dias os animais Nx+V não apresentaram diferença na expressão do VEGF e de

seus receptores comparados aos ratos S (tratados ou não com Su). No entanto, os animais nefrectomizados tratados com Su apresentaram uma menor expressão do VEGF no tecido renal aos 7 dias, comparados aos não tratados. Após 45 dias, os ratos Nx+V e Nx+Su apresentaram uma expressão reduzida do VEGF e de seus receptores, sendo que não foi observada uma diferença significativa entre esses dois grupos. O tratamento com Su nos animais S não resultou em uma alteração na expressão desses genes comparado ao grupo S+V.

Em glomérulos isolados, a expressão do VEGF e de seus receptores - mostrou-se reduzida, 7 dias após a ablação renal, nos animais Nx, comparados aos S. O tratamento com Su não alterou a expressão desses genes, seja nos ratos S, seja nos Nx.

4. DISCUSSÃO

O VEGF é atualmente considerado como um elemento crucial para a neoangiogênese, seja em processos fisiológicos, como a cicatrização de ferimentos, ou patológicos, como a angiogênese associada ao microambiente de tumores malignos e, portanto, à sua nutrição. Além desse efeito sobre a proliferação de células endoteliais, o VEGF também contribui para a homeostase das mesmas, impedindo sua apoptose mesmo em situações de estresse (60, 61). Nos rins, o VEGF é produzido pelos podócitos, exercendo sobre as células endoteliais glomerulares um típico efeito parácrino (50, 62), e também por células do epitélio tubular (63, 64).

Em consonância com essa ação salutar atribuída ao VEGF, a administração de inibidores de sua atividade para o tratamento de neoplasias tem como principal efeito colateral o desenvolvimento, em alguns pacientes, de hipertensão arterial (52, 65, 66) e de proteinúria (52, 67) que, após a interrupção do tratamento, retornam a valores próximos aos basais (68). No presente estudo, não observamos hipertensão ou proteinúria nos ratos controle (S) que receberam tratamento com o sunitinibe em dose semelhante, em mg/m^2 , à dose máxima utilizada em seres humanos. No entanto, essa ausência de efeitos é apenas aparente. Em primeiro lugar, o grupo S+Su exibiu uma taxa de crescimento corpóreo significativamente mais baixa do que a dos animais não tratados, indicando que a droga exerceu, sim, um efeito biológico. Em segundo lugar, em consistência com observações clínicas (69, 70), a administração do sunitinibe aos animais Nx

resultou em redução do hematócrito, o que não chega a surpreender, considerando o envolvimento do VEGF na hematopoiese (71, 72). Nos animais Nx, espera-se efetivamente que esse efeito seja mais intenso, devido à própria redução da massa renal, com diminuição da produção de eritropoietina, e também à baixa expressão renal do VEGF nesse grupo.

Apesar de sua conhecida ação anti-angiogênica, o sunitinibe não teve um efeito detectável, em ratos controle, sobre a densidade de células endoteliais, seja nos glomérulos ou nos capilares peritubulares. Esse achado sugere que a atividade angiogênica no tecido renal normal é inexistente, ou tão baixa que não pode ser detectada por métodos convencionais.

Confirmando achados anteriores (2, 7), observamos nos ratos Nx um pico de proliferação de células túbulo-intersticiais, detectado 7 dias após a ablação renal. A natureza das células intersticiais envolvidas nesse processo proliferativo foi apenas parcialmente determinada. Sabe-se que, nessa fase precoce do modelo Nx, ao menos parte dessas células em multiplicação é representada por células epiteliais tubulares e miofibroblastos (73). A contribuição de células endoteliais a esse processo também é provável. Em estudos anteriores, demonstrou-se que, na primeira semana após a ablação renal de 5/6, a quantidade de células endoteliais peritubulares positivas para PCNA apresenta-se acentuadamente elevada em comparação com o normal, decrescendo acentuadamente no decorrer dos dias e semanas subsequentes, em concomitância com a rarefação de capilares no interstício renal (9, 10). No presente estudo, no entanto, foi possível observar no interstício cortical de ratos Nx, já aos 7 dias após a ablação renal, uma

redução modesta, mas significativa, da densidade de células positivas para o antígeno JG-12, específico para células endoteliais vasculares. Esses resultados são consistentes com a verificação de que a expressão renal do VEGF, bem como a de seus receptores, estava baixa nos ratos Nx uma semana após a ablação renal, também em corroboração a estudos anteriores (9, 15, 74) e sugerem que a participação de células endoteliais no surto de proliferação intersticial observado no 7º dia após a cirurgia é pouco relevante.

A precoce rarefação capilar observada nos ratos Nx é em princípio compatível com a hipótese de que a consequente hipóxia exerce um papel relevante na patogênese da fibrose intersticial associada a esse modelo. Estudos anteriores demonstraram, por meio de indicadores de sofrimento tecidual, que tal hipóxia realmente ocorre no modelo Nx (75, 76), iniciando-se poucos dias após a ablação renal e persistindo até fases avançadas da nefropatia associada (75, 76). Em consonância com esses resultados, foi possível demonstrar no presente estudo uma progressão acentuada da rarefação capilar 45 dias após a ablação renal e, através do uso do pimonidazol, a presença, nessa fase tardia, de hipóxia disseminada pelo parênquima renal, subvertendo o padrão normal, em que a relativa desproporção entre aporte e consumo de oxigênio é confinada à região medular externa. Inúmeras evidências têm sido relatadas de que uma redução nas tensões de oxigênio no tecido renal exerce um papel importante na patogênese da DRC. A oxigenação do parênquima renal reflete um balanço existente entre o consumo e o suprimento de oxigênio. A demanda

de oxigênio reflete o intenso transporte ativo de solutos, principalmente eletrólitos, efetuado pelas células epiteliais tubulares. No modelo Nx, o aumento da taxa de ultrafiltração através dos néfrons remanescentes promove um aumento proporcional da carga filtrada de solutos e exacerba essa necessidade de oxigênio. Por outro lado, é limitado o fornecimento de oxigênio à região medular externa, que contém dois segmentos do néfron extremamente ativos, a pars recta do túbulo proximal e parte da porção espessa ascendente da alça de Henle. Essa limitação se deve a algumas características anatômicas da microvasculatura renal. Devido à sua disposição em “U”, ocorre nos vasos retos uma difusão passiva da porção descendente, relativamente rica em oxigênio, à ascendente, no interior da qual a pressão parcial de oxigênio é mais baixa devido ao consumo pelas porções mais profundas da medula renal. Devido a esse fenômeno, as pressões parciais de oxigênio podem cair a 20, ou mesmo a 10 mmHg na região medular externa, que mantém-se, portanto, permanentemente, à beira da hipóxia. Esse estado de oxigenação insuficiente pode ser agravado na DRC, devido ao efeito combinado do aumento da demanda de oxigênio e da dificuldade de oxigenação motivada pela rarefação capilar e pela distorção da arquitetura vascular em consequência da fibrose intersticial, conforme evidências relatadas anteriormente (59, 77-79).

No presente estudo, confirmamos a presença de extensas regiões hipóxicas mesmo em rins normais, uma vez que a região medular externa e parte da interna coraram-se nitidamente com o pimonidazole. Já nos ratos Nx, foi possível observar a presença difusa do corante em todo o tecido

renal, indicando a existência de pressões parciais próximas a 10 mmHg nessas áreas do parênquima, em consistência com a rarefação dos capilares peritubulares observada nesses animais.

Embora o conceito de que a hipóxia tenha um papel relevante na patogênese da fibrose intersticial associada ao modelo Nx seja perfeitamente plausível, pode ser difícil discernir o que seria uma relação de causalidade de uma simples associação entre os dois processos. No presente estudo, o sunitinibe foi utilizado na expectativa de que seu efeito anti-angiogênico pudesse ajudar a distinguir entre essas duas possibilidades. O tratamento com o sunitinibe promoveu uma redução na proliferação das células intersticiais aos 7 dias pós-ablação. É provável que uma parte dessa limitação se deva a uma ação da droga sobre as células endoteliais, ainda que a densidade de capilares peritubulares já se tenha reduzido nessa fase. No entanto, o impacto desse possível efeito anti-angiogênico foi certamente diminuto: a densidade de capilares peritubulares no grupo Nx+Su não diferiu significativamente daquela observada no grupo Nx não tratado, seja aos 7 ou aos 45 dias após a ablação renal. O tratamento com o Su tampouco afetou a expressão renal do VEGF ou a de seus receptores. Consistentemente, o tratamento com o Su não provocou uma piora da expansão/inflamação intersticial característica do modelo Nx, apesar de um pequeno aumento numérico do interstício cortical nos animais que receberam a droga. Coerentemente, não houve piora da hipertensão arterial nesses animais. Em seu conjunto, esses achados sugerem que, no modelo Nx, a participação do VEGF e da angiogênese, seja como

contrapartida à rarefação capilar, seja como avenida para células inflamatórias, é pouco relevante. No entanto, não se pode excluir a possibilidade de que esses fatores teriam contribuído de modo significativo à patogênese da DRC nesse modelo caso fosse possível prolongar o período de observação. Por outro lado, o intrigante efeito inibidor do sunitinibe sobre a proliferação de células tubulares sugere que a inibição dos receptores do VEGF pode exercer efeitos celulares distintos de seu efeito anti-angiogênico. O significado desse efeito e seu possível papel terapêutico são atualmente obscuros.

Se o tratamento com o sunitinibe exerceu um efeito discreto ou pouco relevante sobre a vascularização intersticial, o mesmo não se pode dizer de seu impacto sobre os glomérulos, nos quais foi possível observar um aumento acentuado da frequência de lesões escleróticas aos 45 dias após a ablação renal. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessas lesões escleróticas não são aparentes de imediato.

É altamente improvável que o agravamento das lesões glomerulares provocado pelo sunitinibe esteja relacionado à presença ou exacerbação de hipóxia, uma vez que o glomérulo é uma estrutura com abundante suprimento e baixo consumo de oxigênio, dada a quase inexistência de transporte ativo e a pouca intensidade do estresse oxidativo nele observada (80).

Tendo em vista o importante papel exercido por fatores mecânicos – hipertensão e hipertrofia glomerulares – na patogênese da glomerulopatia associada à ablação renal e a outros modelos experimentais (2, 7, 81), é

plausível que o agravamento das lesões glomerulares pelo sunitinibe tenha resultado da intensificação de um desses fatores. A pressão intraglomerular não foi avaliada neste estudo. No entanto, o tratamento com o sunitinibe nos animais Nx não afetou o volume glomerular aos 7 dias e, aos 45 dias após a ablação, atenuou a hipertrofia glomerular, ao invés de intensificá-la. Esse achado é incompatível com a hipótese de que o agravamento da glomerulosclerose pelo sunitinibe tenha envolvido uma alteração do volume glomerular. Igualmente remota parece ser a possibilidade de que esse efeito se deva ao desenvolvimento de hiperplasia glomerular, uma vez que o sunitinibe não alterou a taxa de proliferação celular no tufo. A possibilidade de que o efeito deletério do sunitinibe se tenha devido a uma ação sobre a pressão intraglomerular não pode ser excluída. No entanto, essa explicação é implausível, uma vez que hipertensão e hipertrofia glomerulares quase sempre andam juntas no modelo Nx (2, 7). Resultado semelhante foi obtido por Schrijvers et al, que observaram um menor desenvolvimento de hipertrofia glomerular em animais Nx tratados com um anticorpo de neutralização do VEGF (24). Da mesma forma, Flyvbjerg et al também observaram que o bloqueio da atividade do VEGF em camundongos uninefectorizados bloqueou o aumento do tufo glomerular (26).

Nos rins, o VEGF é produzido principalmente pelos podócitos (82, 83), podendo exercer ao mesmo tempo um efeito parácrino (50, 62) , atuando sobre as células endoteliais glomerulares, e um efeito autócrino, influenciando sobre a sobrevivência do próprio podócito e sobre a integridade da membrana diafragmática (51, 84). Portanto, existia a possibilidade de que o

efeito adverso do sunitinibe sobre os glomérulos fosse devido a uma privação dos efeitos tróficos do VEGF sobre os podócitos. A expressão de duas moléculas que no tufo glomerular se associam aos podócitos – a ZO-1 e o WT-1 – diminuiu significativamente nos ratos Nx em comparação com o grupo controle, especialmente aos 45 dias após a ablação renal. Esse achado é compatível com a hipótese de que parte das lesões glomerulares associadas ao modelo Nx se deva a lesão de podócitos. No entanto, a administração do sunitinibe não agravou a deficiência da ZO-1 e do WT-1, sugerindo ser improvável que o agravamento da glomerulosclerose causado pela droga se tenha relacionado a alguma ação deletéria sobre os podócitos.

Há inúmeras evidências de que o efeito parácrino do VEGF, através de sua ligação ao VEGFR2, tem importância crucial para a proliferação, diferenciação e a própria sobrevivência das células endoteliais glomerulares (46, 85, 86). Tais efeitos são frequentemente invocados para tentar explicar as alterações glomerulares associadas ao uso de terapias anti-angiogênicas baseadas na inibição do VEGF (67, 87, 88) e reproduzidas através do silenciamento condicional do gene do VEGF em podócitos de camundongos adultos (88). Esses efeitos adversos do bloqueio do VEGF consistem principalmente no desenvolvimento de proteinúria e hipertensão arterial (52, 67, 89). No entanto, a formação de microtrombos nos capilares glomerulares também é observada com frequência, sugerindo lesão do endotélio vascular (87, 88, 90). A presença de glomerulosclerose segmentar e focal tem sido ocasionalmente demonstrada nesses pacientes (87). No presente estudo, a ablação renal resultou na perda de células endoteliais glomerulares, a julgar

pela diminuição, no Grupo Nx+V, da área glomerular ocupada por endotélio vascular. Esses resultados vêm corroborar observações obtidas em outros laboratórios (9), podendo refletir simplesmente a diminuição da expressão renal do VEGF nesse modelo, observada neste e em outros estudos (9, 74). O tratamento com o sunitinibe não provocou o aparecimento de microtrombos em ratos controle (Grupo S+Su). No Grupo Nx+V, no entanto, a presença de microtrombos foi evidente, atingindo cerca de 2% dos glomérulos observados. É provável que uma parte das lesões escleróticas observadas nesse grupo tenha resultado da organização desses microtrombos. O bloqueio dos receptores do VEGF pelo sunitinibe em ratos com ablação renal exacerbou a formação desses microtrombos glomerulares, cuja frequência quase triplicou. Contudo, o tratamento com o sunitinibe não resultou em perda adicional de células endoteliais glomerulares, sugerindo não ser esse o mecanismo de exacerbação da glomerulosclerose nos ratos Nx que receberam a droga. Portanto, é possível que esse efeito do sunitinibe reflita na verdade uma alteração da vitalidade das células endoteliais e não de seu número e/ou volume (88, 90), resultando em alteração da superfície das células endoteliais e facilitando a formação de microtrombos.

Em resumo, os resultados do presente estudo sugerem que, em condições normais, a inibição da atividade do VEGF pelo sunitinibe não provoca alterações grosseiras na estrutura glomerular. No entanto, em condições de redução do número de néfrons, a ação da droga soma-se a outros fatores, hemodinâmicos ou não, que agem sobre o endotélio

glomerular, passando a funcionar como se fosse um “segundo insulto”, comprometendo ainda mais a integridade do revestimento interno dos capilares glomerulares e exacerbando a formação de microtrombos. A ocupação destes últimos por células inflamatórias e sua posterior organização pode ter levado ao desenvolvimento das lesões escleróticas observadas nos animais nefrectomizados que receberam a droga. Por outro lado, a administração do sunitinibe não alterou de modo significativo a inflamação e/ou fibrose túbulo-intersticial. De forma semelhante, o tratamento com o sunitinibe pouco influenciou a já reduzida densidade de capilares peritubulares e a presença de hipóxia intersticial nos animais com ablação renal, sugerindo que a atividade angiogênica renal é pouco relevante nessas condições.

5. CONCLUSÕES

- A doença renal crônica associada ao modelo de ablação de 5/6 leva a uma rarefação de capilares peritubulares, em consistência com a redução da expressão do VEGF e de seus receptores 1 e 2.
- O tratamento com sunitinibe não agrava a rarefação capilar associada ao modelo Nx, sugerindo que, mesmo nessas condições, a atividade angiogênica é pouco intensa.
- No entanto, o tratamento de ratos Nx com sunitinibe exacerba no glomérulo as lesões escleróticas e a microangiopatia trombótica associadas a esse modelo, provavelmente refletindo um efeito tóxico às células endoteliais.
- A administração do sunitinibe tem pouco efeito na expressão do VEGF e na de seus receptores 1 e 2 em longo prazo, em consistência com a queda espontânea observada nesse período.

6. ANEXOS

6.1 TABELAS

Tabela 1. Número de animais utilizados para as análises morfológicas (histologia e imuno-histoquímica) e para as análises de expressão gênica (RT-PCR).

	Análises morfológicas			Análises gênicas		
	<i>Histologia e imuno-histoquímica</i>		<i>Hipóxia tecidual</i>	<i>Homogenato renal</i>		<i>Glomérulos isolados</i>
	<i>7 dias</i>	<i>45 dias</i>	<i>45 dias</i>	<i>7 dias</i>	<i>45 dias</i>	<i>7 dias</i>
S+V	13	11	1	2	5	2
S+Su	13	11	1	3	5	2
Nx+V	15	17	2	4	7	3
Nx+Su	16	17	2	4	8	3

Grupos experimentais S+V (ratos Sham que receberam tratamento com veículo), S+Su (ratos Sham que receberam tratamento com sunitinibe), Nx+V (ratos Nx que receberam tratamento com veículo) e Nx+Su (ratos Nx que receberam tratamento com sunitinibe).

Tabela 2. Resultados obtidos aos 7 dias de tratamento.

	S+V	S+Su	Nx+V	Nx+Su
PE (g)	239±2	238±3	208±2 ^a	206±4 ^a
PC (mmHg)	136±2	139±1	167±4 ^a	165±3 ^a
U_{alb}V (mg/24hs)	2,4±0,5	2,1±0,4	55,5±13,6 ^a	53,6±10,8 ^a
S_{cr} (mg/dl)	0,50±0,02	0,53±0,02	1,16±0,04 ^a	1,26±0,07 ^a
Ht (%)	47±1	44±1	49±1	46±1

Peso corpóreo, (PE), pressão sistólica caudal (PC), excreção de albumina na urina de 24 horas (U_{alb}V), concentração sérica de creatinina (S_{cr}), hematócrito arterial (Ht) nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su). ^ap<0,05 vs. respectivo S, ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado. Resultados apresentados como média±EP.

Tabela 3. Resultados obtidos aos 45 dias de tratamento.

	S+V	S+Su	Nx+V	Nx+Su
PE (g)	322±4	301±5 ^b	256±7 ^a	250±7 ^a
PC (mmHg)	139±2	140±4	211±4 ^a	213±3 ^a
U_{alb}V (mg/24hs)	4,9±1,4	6,8±3,2	134,1±15,1 ^a	149,1±14,3 ^a
S_{cr} (mg/dl)	0,59±0,02	0,54±0,02	1,19±0,07 ^a	1,46±0,14 ^{ab}
Ht (%)	48±1	49±1	44±1	39±2 ^{ab}

Peso corpóreo, (PE), pressão sistólica caudal (PC), excreção de albumina na urina de 24 horas (U_{alb}V), concentração sérica de creatinina (S_{cr}), hematócrito arterial (Ht) nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su). ^ap<0,05 vs. respectivo S, ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado. Resultados apresentados como média±EP.

Tabela 4. Parâmetros intersticiais analisados aos 7 dias de tratamento.

	S+V	S+Su	Nx+V	Nx+Su
%INT	0,18±0,05	0,17±0,04	0,48±0,08	0,39±0,10
MØ (cél/mm²)	18,9±2,0	13,0±1,7	48,9±7,6	27,6±3,0
PCNA_{túb} (cél/mm²)	52,1±5,8	42,9±5,0	195,3±15,8 ^a	155,8±214,2 ^{ab}
PCNA_{int} (cél/mm²)	43,8±4,9	28,7±3,8	193,3±18,5 ^a	130,3±18,1 ^{ab}
Vasos/mm²	730±18	749±19	613±11 ^a	609±12 ^a

Área intersticial fracional (%INT), infiltração de macrófagos no interstício renal (MØ), células tubulares em atividade de proliferação (PCNA_{túb}), células intersticiais em atividade de proliferação (PCNA_{int}), número de capilares peritubulares (vasos/mm²) nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su). ^ap<0,05 vs. respectivo S, ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado. Resultados apresentados como média±EP.

Tabela 5. Parâmetros intersticiais analisados aos 45 dias de tratamento.

	S+V	S+Su	Nx+V	Nx+Su
%INT	0,13±0,03	0,16±0,04	2,46±0,41 ^a	3,06±0,51 ^a
MØ (cél/mm²)	19,4±2,7	17,3±2,3	104,0±14,0 ^a	109,6±15,5 ^a
PCNA_{túb} (cél/mm²)	23,2±1,8	35,7±7,7	86,7±10,0 ^a	104,1±8,3 ^a
PCNA_{int} (cél/mm²)	25,3±3,0	31,6±6,3	91,9±8,2 ^a	80,8±9,6 ^a
Vasos/mm²	713±24	716±14	358±21 ^a	319±19 ^a

Área intersticial fracional (%INT), infiltração de macrófagos no interstício renal (MØ), células tubulares em atividade de proliferação (PCNA_{túb}), células intersticiais em atividade de proliferação (PCNA_{int}), número de capilares peritubulares (vasos/mm²) nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su). ^ap<0,05 vs. respectivo S, ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado. Resultados apresentados como média±EP.

Tabela 6. Análise da morfologia glomerular aos 7 dias de tratamento.

	S+V	S+Su	Nx+V	Nx+Su
%Normal	100±0	100±0	99,2±0,4	99,6±0,2
%GS	0±0	0±0	0,1±0,1	0,3±0,2
%Trombo/GS	0±0	0±0	0,6±0,4	0,1±0,1
%An	0±0	0±0	0,1±0,1	0±0

Porcentagem de glomérulos morfolologicamente normais (%Normal), porcentagem de glomérulos que apresentavam qualquer grau de esclerose (%GS), porcentagem de glomérulos que apresentavam um ou mais microtrombos, podendo apresentar também esclerose (%Tromb/GS), porcentagem de glomérulos que apresentavam um ou mais microaneurismas (%An) nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su). ^ap<0,05 vs. respectivo S, ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado. Resultados apresentados como média±EP.

Tabela 7. Análise da morfologia glomerular aos 45 dias de tratamento.

	S+V	S+Su	Nx+V	Nx+Su
%Normal	100±0	98,4±1,1	89,7±2,3 ^a	70,9±5,1 ^{ab}
%GS	0±0	0,8±0,8	7,4±1,9 ^a	22,3±3,8 ^{ab}
%Trombo/GS	0±0	0,2±0,2	2,0±1,0	6,6±2,9 ^{ab}
%An	0±0	0,6±0,6	0,8±0,3 ^a	0,1±0,1 ^b

Porcentagem de glomérulos morfolologicamente normais (%Normal), porcentagem de glomérulos que apresentavam qualquer grau de esclerose (%GS), porcentagem de glomérulos que apresentavam um ou mais microtrombos, podendo apresentar também esclerose (%Tromb/GS), porcentagem de glomérulos que apresentavam um ou mais microaneurismas (%An) nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su). ^ap<0,05 vs. respectivo S, ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado. Resultados apresentados como média±EP.

Tabela 8. Parâmetros glomerulares analisados aos 7 dias de tratamento.

	S+V	S+Su	Nx+V	Nx+Su
VG (μm^3)	0,80±0,04	0,78±0,02	0,87±0,04	0,91±0,04
PCNA_{glom} (cél/mm²)	9,2±3,0	4,5±1,4	14,6±2,9	7,5±1,7 ^b
ZO-1 (%)	89±2	89±2	76±5 ^a	79±4
WT-1 (cél/glom)	18,3±0,6	16,5±0,6	15,3±0,6	15,8±0,5
%JG-12_{glom}	73±2	72±2	64±2	65±3

Porcentagem da área glomerular positiva para “Zonula occludens-1” (ZO-1), número de células positivas para WT-1 no glomérulo (WT-1), porcentagem da área glomerular ocupada por endotélio (%JG-12_{glom}), número de células glomerulares em atividade de proliferação (PCNA_{glom}), volume glomerular (VG). ^ap<0,05 vs. respectivo S, ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado. Resultados apresentados como média±EP.

Tabela 9. Parâmetros glomerulares analisados aos 45 dias de tratamento.

	S+V	S+Su	Nx+V	Nx+Su
VG (μm^3)	0,96±0,02	0,80±0,03 ^b	1,66±0,05 ^a	1,38±0,06 ^{ab}
PCNA_{glom} (cél/mm²)	6,2±0,9	11,5±4,0	5,7±1,3	6,0±1,1
ZO-1 (%)	88±2	90±1	68±3 ^a	67±4 ^a
WT-1 (cél/glom)	15,3±0,8	16,0±0,7	12,4±0,9 ^a	12,1±0,9 ^a
%JG12_{glom}	69±1	69±3	48±4 ^a	42±3 ^a

Porcentagem da área glomerular positiva para “Zonula occludens-1” (ZO-1), Número de células positivas para WT-1 no glomérulo (WT-1), Porcentagem da área glomerular ocupada por endotélio (%JG-12_{glom}), Número de células glomerulares positivas para PCNA (PCNA_{glom}), Volume glomerular (VG). ^ap<0,05 vs. respectivo S, ^cp<0,05 vs. Nx+V.

6.2 FIGURAS

Figura 1. Gráfico das medidas de peso corpóreo (gramas) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^a $p < 0,05$ vs. respectivo S; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo não tratado e; ^c $p < 0,05$ vs. respectivo 7 dias.

Figura 2. Gráfico das medidas de pressão sistólica caudal (mmHg) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap< 0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

Figura 3. Gráfico das medidas de excreção de albumina na urina de 24 horas (mg/24hs) coletada em gaiola metabólica dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap< 0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

Figura 4. Gráfico das dosagens de creatinina sérica (mg/dl) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^a $p < 0,05$ vs. respectivo S; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo não tratado; ^c $p < 0,05$ vs. respectivo 7 dias.

Figura 5. Gráfico das medidas de hematócrito arterial (%) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap< 0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

Figura 6. Microfotografias representativas do interstício do tecido renal dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 45 dias. a) Grupo S+V; b) Grupo S+Su; c) Grupo Nx+V; d) Grupo Nx+Su. Coloração pela técnica de tricrômio de Masson. Aumento de 100X.

Figura 7. Gráfico da área intersticial fracional (%) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^a $p < 0,05$ vs. respectivo S; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo não tratado; ^c $p < 0,05$ vs. respectivo 7 dias.

Figura 8. Microfotografias representativas de tecido renal com marcação positiva para ED-1 (macrófagos) nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 45 dias. a) Grupo S+V; b) Grupo S+Su; c) Grupo Nx+V; d) Grupo Nx+Su. Aumento de 200X.

Figura 9. Gráfico da infiltração de macrófagos na região intersticial cortical renal (cél/mm²) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap< 0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

Figura 10. Microfotografias representativas da marcação tubular positiva para PCNA indicando as células em atividade de proliferação nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 45 dias. a) Grupo S+V; b) Grupo S+Su; c) Grupo Nx+V; d) Grupo Nx+Su. Aumento de 200X.

Figura 11. Gráfico da quantificação das células tubulares positivas para PCNA indicando atividade de proliferação (cél/mm²) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap<0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

Figura 12. Microfotografias representativas da marcação intersticial positiva para PCNA indicando as células em atividade de proliferação nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 45 dias. a) Grupo S+V; b) Grupo S+Su; c) Grupo Nx+V; d) Grupo Nx+Su. Aumento de 200X.

Figura 13. Gráfico da quantificação das células intersticiais positivas para PCNA indicando atividade de proliferação (cél/mm²) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap<0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

Figura 14. Microfotografias representativas da marcação de capilares peritubulares (JG-12) nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 45 dias. a) Grupo S+V; b) Grupo S+Su; c) Grupo Nx+V; d) Grupo Nx+Su. Aumento de 200X.

Figura 15. Gráfico do número de capilares peritubulares por mm^2 dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^a $p < 0,05$ vs. respectivo S; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo não tratado; ^c $p < 0,05$ vs. respectivo 7 dias.

Figura 16. Microfotografias da distribuição tecidual da marcação de pimonidazole nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 45 dias. CN: Controle negativo do experimento

Figura 17. Gráfico da porcentagem de glomérulos classificados como normal (sem qualquer tipo de alteração), esclerose (com qualquer grau de esclerose glomerular), trombo/esclerose (com apresentação de um ou mais trombos, podendo ou não apresentar esclerose glomerular) ou aneurisma (com apresentação de um ou mais aneurismas) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap< 0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

Figura 18. Microfotografias representativas da morfologia glomerular observada nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 45 dias. a) Grupo S+V; b) Grupo S+Su; c) Grupo Nx+V (microaneurisma); d) Grupo Nx+V (glomerulosclerose); e) Grupo Nx+Su (microtrombos); f) Grupo Nx+Su (glomerulosclerose). Aumento de 200X.

Figura 19. . Gráfico do volume glomerular (μm^3) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^a $p < 0,05$ vs. respectivo S; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo não tratado; ^c $p < 0,05$ vs. respectivo 7 dias.

Figura 20. Microfotografias representativas da marcação glomerular positiva para PCNA indicando as células em proliferação nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 45 dias. a) Grupo S+V; b) Grupo S+Su; c) Grupo Nx+V; d) Grupo Nx+Su. Aumento de 200X.

Figura 21. Gráfico da quantificação das células glomerulares positivas para PCNA indicando atividade de proliferação (cél/mm²) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap< 0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

Figura 22. Microfotografias representativas da marcação positiva para zonula occludens-1 nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 45 dias. a) Grupo S+V; b) Grupo S+Su; c) Grupo Nx+V; d) Grupo Nx+Su. Aumento de 200X.

Figura 23. Gráfico da porcentagem da área glomerular ocupada por marcação positiva para ZO-1 (%) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^a $p < 0,05$ vs. respectivo S; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo não tratado; ^c $p < 0,05$ vs. respectivo 7 dias.

Figura 24. Microfotografias representativas da marcação positiva para WT-1 nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 45 dias. a) Grupo S+V; b) Grupo S+Su; c) Grupo Nx+V; d) Grupo Nx+Su. Aumento de 200X.

Figura 25. Gráfico do número de células positivas para WT-1 por glomérulo dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^a $p < 0,05$ vs. respectivo S; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo não tratado; ^c $p < 0,05$ vs. respectivo 7 dias.

Figura 26. Microfotografias representativas da marcação dos capilares glomerulares observada nos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 45 dias. a) Grupo S+V; b) Grupo S+Su; c) Grupo Nx+V; d) Grupo Nx+Su. Aumento de 200X.

Figura 27. Gráfico da porcentagem da área glomerular ocupada por endotélio (%) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^a $p < 0,05$ vs. respectivo S; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo não tratado; ^c $p < 0,05$ vs. respectivo 7 dias.

Figura 28. Gráfico da expressão do VEGF em homogenato do tecido renal analisado por RT-PCR em tempo real (expressão de RNAm de VEGF/expressão do RNAm HPRT) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^a $p < 0,05$ vs. respectivo S; ^b $p < 0,05$ vs. respectivo não tratado; ^c $p < 0,05$ vs. respectivo 7 dias.

Figura 29. Gráfico da expressão do Flt1 (ou VEGFR1) em homogenato do tecido renal analisado por RT-PCR em tempo real (expressão de RNAm de Flt1/expressão do RNAm HPRT) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap< 0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

Figura 30. Gráfico da expressão do Flk1 (ou VEGFR2) em homogenato do tecido renal analisado por RT-PCR em tempo real (expressão de RNAm de Flk1/expressão do RNAm HPRT) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap< 0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

Figura 31. Gráfico da expressão do Flt4 (ou VEGFR3) em homogenato do tecido renal analisado por RT-PCR em tempo real (expressão de RNAm de Flt4/expressão do RNAm HPRT) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap< 0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

Figura 32. Gráfico da expressão do VEGF em glomérulos isolados do tecido renal, analisado por RT-PCR em tempo real (expressão de RNAm de VEGFa/expressão do RNAm GAPDH) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap< 0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

Figura 33. Gráfico da expressão do Flt1 (ou VEGFR1) em glomérulos isolados do tecido renal, analisado por RT-PCR em tempo real (expressão de RNAm de Flt1/expressão do RNAm GAPDH) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap< 0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

Figura 34. Gráfico da expressão do Flk1 (ou VEGFR2) em glomérulos isolados do tecido renal, analisado por RT-PCR em tempo real (expressão de RNAm de Flk1/expressão do RNAm GAPDH) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap< 0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

Figura 35. Gráfico da expressão do Flt4 (ou VEGFR3) em glomérulos isolados do tecido renal, analisado por RT-PCR em tempo real (expressão de RNAm de Flt4/expressão do RNAm GAPDH) dos grupos Sham tratados com veículo (S+V) ou com sunitinibe (S+Su) e Nx tratados com veículo (Nx+V) ou com sunitinibe (Nx+Su) aos 7 e 45 dias de tratamento. ^ap< 0,05 vs. respectivo S; ^bp<0,05 vs. respectivo não tratado; ^cp<0,05 vs. respectivo 7 dias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson S, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM. Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. The Journal of clinical investigation. 1985;76(2):612-9. Epub 1985/08/01.
2. Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R, Noronha IL. Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. Kidney international. 1998;54(5):1510-9. Epub 1998/12/09.
3. Fujihara CK, Velho M, Malheiros DM, Zatz R. An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model. Kidney international. 2005;67(5):1913-24. Epub 2005/04/21.
4. Goncalves AR, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha Ide L, de Nucci G, et al. Renal expression of COX-2, ANG II, and AT1 receptor in remnant kidney: strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroidal anti-inflammatory. American journal of physiology Renal physiology. 2004;286(5):F945-54. Epub 2004/04/13.
5. Lafayette RA, Mayer G, Park SK, Meyer TW. Angiotensin II receptor blockade limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. The Journal of clinical investigation. 1992;90(3):766-71. Epub 1992/09/01.
6. Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. The Journal of clinical investigation. 1986;77(6):1993-2000. Epub 1986/06/01.

7. Floege J, Burns MW, Alpers CE, Yoshimura A, Pritzl P, Gordon K, et al. Glomerular cell proliferation and PDGF expression precede glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Kidney international*. 1992;41(2):297-309. Epub 1992/02/01.
8. Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Couser WG, Koch KM, et al. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney international*. 1996;49(3):666-78. Epub 1996/03/01.
9. Kang DH, Joly AH, Oh SW, Hugo C, Kerjaschki D, Gordon KL, et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2001;12(7):1434-47. Epub 2001/06/26.
10. Wu Q, Du Y, Yang N, Liang Y, Li Y. Microvasculature change and placenta growth factor expression in the early stage of a rat remnant kidney model. *American journal of nephrology*. 2006;26(1):97-104. Epub 2006/03/18.
11. Bohle A, Mackensen-Haen S, Wehrmann M. Significance of postglomerular capillaries in the pathogenesis of chronic renal failure. *Kidney & blood pressure research*. 1996;19(3-4):191-5. Epub 1996/01/01.
12. Choi YJ, Chakraborty S, Nguyen V, Nguyen C, Kim BK, Shim SI, et al. Peritubular capillary loss is associated with chronic tubulointerstitial injury in human kidney: altered expression of vascular endothelial growth factor. *Human pathology*. 2000;31(12):1491-7. Epub 2001/01/11.

13. Kang DH, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschki D, et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2002;13(3):806-16. Epub 2002/02/22.
14. Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF, Johnson RJ. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2001;12(7):1448-57. Epub 2001/06/26.
15. Eardley KS, Kubal C, Zehnder D, Quinkler M, Lepenies J, Savage CO, et al. The role of capillary density, macrophage infiltration and interstitial scarring in the pathogenesis of human chronic kidney disease. *Kidney international*. 2008;74(4):495-504. Epub 2008/06/06.
16. Masuda Y, Shimizu A, Mori T, Ishiwata T, Kitamura H, Ohashi R, et al. Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *The American journal of pathology*. 2001;159(2):599-608. Epub 2001/08/04.
17. Miyamoto K, Kitamoto Y, Tokunaga H, Takeya M, Ezaki T, Imamura T, et al. Protective effect of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor 165 and 121 on glomerular endothelial cell injury in the rat. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2004;84(9):1126-36. Epub 2004/06/15.
18. Shimizu A, Masuda Y, Mori T, Kitamura H, Ishizaki M, Sugisaki Y, et al. Vascular endothelial growth factor165 resolves glomerular inflammation

and accelerates glomerular capillary repair in rat anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004;15(10):2655-65. Epub 2004/10/07.

19. Ostendorf T, Kunter U, Eitner F, Loos A, Regele H, Kerjaschki D, et al. VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(7):913-23. Epub 1999/10/08.

20. Masuda Y, Shimizu A, Kataoka M, Arai T, Ishikawa A, Du X, et al. Inhibition of capillary repair in proliferative glomerulonephritis results in persistent glomerular inflammation with glomerular sclerosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2010;90(10):1468-81. Epub 2010/07/21.

21. Fine LG, Norman JT. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney international*. 2008;74(7):867-72. Epub 2008/07/18.

22. Konda R, Sato H, Sakai K, Sato M, Orikasa S, Kimura N. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and its potential role in up-regulation of angiogenesis in scarred kidneys secondary to urinary tract diseases. *The American journal of pathology*. 1999;155(5):1587-97. Epub 1999/11/07.

23. Pillebout E, Burtin M, Yuan HT, Briand P, Woolf AS, Friedlander G, et al. Proliferation and remodeling of the peritubular microcirculation after nephron reduction: association with the progression of renal lesions. *The American journal of pathology*. 2001;159(2):547-60. Epub 2001/08/04.

24. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, Tilton RG, Rasch R, Lameire NH, De Vriese AS. Pathophysiological role of vascular endothelial growth factor in the remnant kidney. *Nephron Experimental nephrology*. 2005;101(1):e9-15. Epub 2005/06/01.
25. Fujihara CK, Noronha IL, Malheiros, Antunes GR, de Oliveira IB, Zatz R. Combined mycophenolate mofetil and losartan therapy arrests established injury in the remnant kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2000;11(2):283-90. Epub 2000/02/09.
26. Flyvbjerg A, Schrijvers BF, De Vriese AS, Tilton RG, Rasch R. Compensatory glomerular growth after unilateral nephrectomy is VEGF dependent. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2002;283(2):E362-6. Epub 2002/07/12.
27. de Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2001;12(5):993-1000. Epub 2001/04/24.
28. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *The New England journal of medicine*. 1993;329(14):977-86. Epub 1993/09/30.
29. Tsuchida K, Makita Z, Yamagishi S, Atsumi T, Miyoshi H, Obara S, et al. Suppression of transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy in rats by a novel advanced glycation

end product inhibitor, OPB-9195. *Diabetologia*. 1999;42(5):579-88. Epub 1999/05/20.

30. Cooper ME, Allen TJ, O'Brien RC, Macmillan PA, Clarke B, Jerums G, et al. Effects of genetic hypertension on diabetic nephropathy in the rat--functional and structural characteristics. *Journal of hypertension*. 1988;6(12):1009-16. Epub 1988/12/01.

31. Ichinose K, Maeshima Y, Yamamoto Y, Kitayama H, Takazawa Y, Hirokoshi K, et al. Antiangiogenic endostatin peptide ameliorates renal alterations in the early stage of a type 1 diabetic nephropathy model. *Diabetes*. 2005;54(10):2891-903. Epub 2005/09/28.

32. Yamamoto Y, Maeshima Y, Kitayama H, Kitamura S, Takazawa Y, Sugiyama H, et al. Tumstatin peptide, an inhibitor of angiogenesis, prevents glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2004;53(7):1831-40. Epub 2004/06/29.

33. Zhang SX, Wang JJ, Lu K, Mott R, Longeras R, Ma JX. Therapeutic potential of angiostatin in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(2):475-86. Epub 2006/01/06.

34. Zent R, Pozzi A. Antiangiogenic therapy in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(2):325-7. Epub 2006/01/26.

35. Ku CH, White KE, Dei Cas A, Hayward A, Webster Z, Bilous R, et al. Inducible overexpression of sFlt-1 in podocytes ameliorates glomerulopathy in diabetic mice. *Diabetes*. 2008;57(10):2824-33. Epub 2008/07/24.

36. Takahashi Y, Bucana CD, Liu W, Yoneda J, Kitadai Y, Cleary KR, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(16):1146-51. Epub 1996/08/21.
37. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature*. 1987;329(6140):630-2. Epub 1987/10/15.
38. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *The Journal of clinical investigation*. 1987;79(2):319-26. Epub 1987/02/01.
39. Staples KJ, Sotoodehnejadnematalahi F, Pearson H, Frankenberger M, Francescut L, Ziegler-Heitbrock L, et al. Monocyte-derived macrophages matured under prolonged hypoxia transcriptionally up-regulate HIF-1alpha mRNA. *Immunobiology*. 2011;216(7):832-9. Epub 2011/02/02.
40. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219(4587):983-5. Epub 1983/02/25.
41. Ferrara N, Winer J, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete an inhibitor of aortic endothelial cell growth: identification as leukemia inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(2):698-702. Epub 1992/01/15.
42. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 1989;246(4935):1309-12. Epub 1989/12/08.

43. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246(4935):1306-9. Epub 1989/12/08.
44. Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *The EMBO journal*. 1989;8(12):3801-6. Epub 1989/12/01.
45. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(8):579-91. Epub 2008/07/04.
46. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(5):359-71. Epub 2006/04/25.
47. Neufeld G, Kessler O, Herzog Y. The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Advances in experimental medicine and biology*. 2002;515:81-90. Epub 2003/03/05.
48. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(22):10705-9. Epub 1993/11/15.
49. Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996;226(2):324-8. Epub 1996/09/13.

50. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Vriese AS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney international*. 2004;65(6):2003-17. Epub 2004/05/20.
51. Guan F, Villegas G, Teichman J, Mundel P, Tufro A. Autocrine VEGF-A system in podocytes regulates podocin and its interaction with CD2AP. *American journal of physiology Renal physiology*. 2006;291(2):F422-8. Epub 2006/04/07.
52. Izzedine H, Rixe O, Billemont B, Baumelou A, Deray G. Angiogenesis inhibitor therapies: focus on kidney toxicity and hypertension. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2007;50(2):203-18. Epub 2007/07/31.
53. Izzedine H, Buhaescu I, Rixe O, Deray G. Sunitinib malate. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2007;60(3):357-64. Epub 2006/12/01.
54. Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(1):327-37. Epub 2003/01/23.
55. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology :*

official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2006;24(1):16-24. Epub 2005/12/07.

56. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*. 1965;2(3):235-54. Epub 1965/09/01.

57. Jepsen FL, Mortensen PB. Interstitial fibrosis of the renal cortex in minimal change lesion and its correlation with renal function. A quantitative study. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histology*. 1979;383(3):265-70. Epub 1979/08/23.

58. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research. *Circulation research*. 1980;47(1):1-9. Epub 1980/07/01.

59. Heyman SN, Khamaisi M, Rosen S, Rosenberger C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia response and the progression of chronic kidney disease. *American journal of nephrology*. 2008;28(6):998-1006. Epub 2008/07/19.

60. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(21):13313-6. Epub 1998/05/28.

61. Spyridopoulos I, Brogi E, Kearney M, Sullivan AB, Cetrulo C, Isner JM, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha: balance between growth and death

signals. Journal of molecular and cellular cardiology. 1997;29(5):1321-30. Epub 1997/05/01.

62. Liang XB, Ma LJ, Naito T, Wang Y, Madaio M, Zent R, et al. Angiotensin type 1 receptor blocker restores podocyte potential to promote glomerular endothelial cell growth. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 2006;17(7):1886-95. Epub 2006/06/23.

63. Brown LF, Berse B, Tognazzi K, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR, et al. Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. Kidney international. 1992;42(6):1457-61. Epub 1992/12/01.

64. Kretzler M, Schroppel B, Merkle M, Huber S, Mundel P, Horster M, et al. Detection of multiple vascular endothelial growth factor splice isoforms in single glomerular podocytes. Kidney international Supplement. 1998;67:S159-61. Epub 1998/09/15.

65. Faivre S, Delbaldo C, Vera K, Robert C, Lozahic S, Lassau N, et al. Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2006;24(1):25-35. Epub 2005/11/30.

66. Granger JP. Vascular endothelial growth factor inhibitors and hypertension: a central role for the kidney and endothelial factors? Hypertension. 2009;54(3):465-7. Epub 2009/08/05.

67. Izzedine H, Massard C, Spano JP, Goldwasser F, Khayat D, Soria JC. VEGF signalling inhibition-induced proteinuria: Mechanisms, significance and management. *Eur J Cancer*. 2010;46(2):439-48. Epub 2009/12/17.
68. Patel TV, Morgan JA, Demetri GD, George S, Maki RG, Quigley M, et al. A preeclampsia-like syndrome characterized by reversible hypertension and proteinuria induced by the multitargeted kinase inhibitors sunitinib and sorafenib. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(4):282-4. Epub 2008/02/14.
69. Gkountouvas A, Kostoglou-Athanassiou I, Veniou E, Repousis P, Ziras N, Kaldrimidis P. Hematologic toxicity in patients treated with sunitinib for advanced thyroid cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2010;20(6):597-600. Epub 2010/06/18.
70. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2007;356(2):115-24. Epub 2007/01/12.
71. Kubo H, Alitalo K. The bloody fate of endothelial stem cells. *Genes & development*. 2003;17(3):322-9. Epub 2003/02/06.
72. Schatteman GC, Awad O. Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors. *The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*. 2004;276(1):13-21. Epub 2003/12/31.
73. Yang N, Wu LL, Nikolic-Paterson DJ, Ng YY, Yang WC, Mu W, et al. Local macrophage and myofibroblast proliferation in progressive renal injury

- in the rat remnant kidney. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1998;13(8):1967-74. Epub 1998/08/27.
74. Kelly DJ, Hepper C, Wu LL, Cox AJ, Gilbert RE. Vascular endothelial growth factor expression and glomerular endothelial cell loss in the remnant kidney model. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2003;18(7):1286-92. Epub 2003/06/17.
75. Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, Ohse T, Miyata T, Inagi R, et al. Evidence of tubular hypoxia in the early phase in the remnant kidney model. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004;15(5):1277-88. Epub 2004/04/22.
76. Tanaka T, Miyata T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. Hypoxia in renal disease with proteinuria and/or glomerular hypertension. *The American journal of pathology*. 2004;165(6):1979-92. Epub 2004/12/08.
77. Eckardt KU, Bernhardt WM, Weidemann A, Warnecke C, Rosenberger C, Wiesener MS, et al. Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Kidney international Supplement*. 2005(99):S46-51. Epub 2005/12/13.
78. Norman JT, Fine LG. Intrarenal oxygenation in chronic renal failure. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2006;33(10):989-96. Epub 2006/09/28.
79. Tanaka T, Nangaku M. The role of hypoxia, increased oxygen consumption, and hypoxia-inducible factor-1 alpha in progression of chronic

kidney disease. Current opinion in nephrology and hypertension. 2010;19(1):43-50. Epub 2009/09/26.

80. Kinoshita Y, Kondo S, Urushihara M, Suga K, Matsuura S, Takamatsu M, et al. Angiotensin II type I receptor blockade suppresses glomerular renin-angiotensin system activation, oxidative stress, and progressive glomerular injury in rat anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine. 2011;158(4):235-48. Epub 2011/09/20.

81. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. The Journal of clinical investigation. 1986;77(6):1925-30. Epub 1986/06/01.

82. Grone HJ, Simon M, Grone EF. Expression of vascular endothelial growth factor in renal vascular disease and renal allografts. The Journal of pathology. 1995;177(3):259-67. Epub 1995/11/01.

83. Tufro A, Norwood VF, Carey RM, Gomez RA. Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 1999;10(10):2125-34. Epub 1999/10/03.

84. Foster RR, Hole R, Anderson K, Satchell SC, Coward RJ, Mathieson PW, et al. Functional evidence that vascular endothelial growth factor may act as an autocrine factor on human podocytes. American journal of physiology Renal physiology. 2003;284(6):F1263-73. Epub 2003/03/07.

85. Eremina V, Baelde HJ, Quaggin SE. Role of the VEGF--a signaling pathway in the glomerulus: evidence for crosstalk between components of the glomerular filtration barrier. *Nephron Physiology*. 2007;106(2):p32-7. Epub 2007/06/16.
86. Sison K, Eremina V, Baelde H, Min W, Hirashima M, Fantus IG, et al. Glomerular structure and function require paracrine, not autocrine, VEGF-VEGFR-2 signaling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(10):1691-701. Epub 2010/08/07.
87. Bollee G, Patey N, Cazajous G, Robert C, Goujon JM, Fakhouri F, et al. Thrombotic microangiopathy secondary to VEGF pathway inhibition by sunitinib. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2009;24(2):682-5. Epub 2008/12/05.
88. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, et al. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *The New England journal of medicine*. 2008;358(11):1129-36. Epub 2008/03/14.
89. Kappers MH, van Esch JH, Sleijfer S, Danser AH, van den Meiracker AH. Cardiovascular and renal toxicity during angiogenesis inhibition: clinical and mechanistic aspects. *Journal of hypertension*. 2009;27(12):2297-309. Epub 2009/08/15.
90. Eremina V, Quaggin SE. Biology of anti-angiogenic therapy-induced thrombotic microangiopathy. *Seminars in nephrology*. 2010;30(6):582-90. Epub 2010/12/15.