FILIPPE MIRANDA DE OLIVEIRA SILVA

**Análise do efeito do Tamoxifeno e da BMP-7 em modelo experimental
de fibrose peritoneal em ratos com doença renal crônica**

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

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Profa. Dra. Irene de Lourdes Noronha

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Filipe Miranda de Oliveira

Análise do efeito do tamoxifeno e da BMP-7 em modelo experimental de
fibrose peritoneal em ratos com doença renal crônica / Filipe Miranda de Oliveira
Silva. -- São Paulo, 2015.

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

Orientadora: Irene de Lourdes Noronha.

Descritores: 1.Insuficiência renal crônica 2.Fibrose peritoneal 3.Uremia
4.Tamoxifeno 5.Proteína morfogenética óssea-7 6.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-252/15

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Nefrologia Celular, Genética e Molecular – Laboratório de Investigação Médica 29, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), auxílio nº2011/05614-1 e nº2013/16269-9.

Dedicatória

*A Jeová Deus. Pai que me deu
forças além do normal para
concluir meu trabalho. Me
protegeu, me consolou e
ajudou de formas incríveis.
Louvado seja teu nome.*

*À minha amada esposa Tamyres
Miranda, sua doçura e amor
sempre foram capazes de me fazer
esquecer dos problemas. Minha
companheira que pacientemente
compreendeu minha ausência
durante este trabalho. Você me deu
forças para concluir essa jornada.*

*À minha mãe Ivete, seu amor
incondicional foi suficiente para me
ajudar sempre que precisei durante
todos esses anos. Um porto seguro.*

*Ao meu pai Carlos, me ensinou a
sempre lutar por algo melhor e
nunca desistir mesmo que isso
parecesse a única opção. Me deu
suporte para concluir essa jornada.*

AGRADECIMENTOS

À Professora **Irene de Lourdes Noronha**, por ter me oferecido essa oportunidade profissional única. Por ter confiado em meu trabalho. Agradeço por me passar um pouco de sua vasta e enriquecedora experiência na pesquisa. Aprendi muito apenas de observar as ações da Senhora pelo grupo. Sinto-me honrado de ter convivido com a grande médica e pesquisadora que a Senhora é. Muito obrigado pelo apoio, oportunidade e confiança que jamais serão esquecidos!

Ao Professor Luiz Fernando Onuchic. Um pesquisador incrível que me deu atenção sempre que precisei. Um exemplo de pesquisador o qual me inspiro. Muito obrigado.

Ao Professor Hugo Abensur. Sempre solicito me forneceu ajuda e experiência necessária para seguir neste trabalho. Um profissional que admiro e tenho como exemplo. Muito obrigado.

Ao Humberto Dellê. Foi meu professor na faculdade. Foi aquele que primeiro acreditou em mim por ter me indicado à Prof. Irene. Meu mentor. Meu amigo. Me ensinou a verdadeira essência do que é ser um Biomédico. Muito obrigado.

Ao Rafael Pepineli, Biomédico como eu, sofredor. A amizade que criamos ao longo dessa jornada jamais será esquecida. Muitas vezes mais que um amigo. Um irmão, sem dúvidas. Muito Obrigado.

À Cleonice Silva, que acompanhou toda a minha jornada desde que eu era iniciação científica. Sempre me ajudou em tudo o que eu precisava. Além disso, uma pessoa fantástica que eu tive a honra de conhecer. Muito obrigado por tudo.

À Priscila Gouveia, grande pessoa e grande amiga. Obrigado pelo suporte e apoio durante todos esses anos. Sou grato por ter conhecido uma pesquisadora brilhante como você. Muito obrigado

Ao Elerson Costalonga, grande médico e grande pessoa que conheci. Me ajudou muitas vezes. Fez parte deste trabalho. Além de tudo, sempre engraçado, nos proporcionou boas risadas.

À Samirah A. Gomes, agradeço pela ajuda inestimável que me deu na etapa final deste trabalho. Sou grato também pelas boas gargalhadas que nos proporcionou. Me sinto honrado de ter conhecido essa grande médica e pesquisadora. Muito obrigado.

À Amanda Gonçalves Pires, agradeço pelo enorme apoio e ajuda neste trabalho. Um amiga que não será esquecida por todo o suporte que me deu. Muito obrigado.

À Rita de Cássia Cavaglieri, pelos anos de convívio. Pelo suporte e força que me deu durante todo esse tempo. Muito obrigado.

À Thalita Prado, agradeço pelos momentos de descontração proporcionados durante todo esse tempo. Muito obrigado.

Ao Alexandre Chagas de Santana. Entramos praticamente juntos no laboratório como alunos de iniciação. É gratificante olhar para a jornada que trilhamos juntos em projetos diferentes. Muito obrigado.

Ao Rodrigo José Ramalho. Não tenho palavras para descrever o tamanho apoio e ajuda que você me deu. Você viu e participou da minha evolução de menino para doutor. Eu que agradeço sua ajuda!

Ao William Felix, um amigo que me forneceu apoio, suporte e boas conversas ao longo dos anos. Muito obrigado por tudo.

Ao Wagner Domingues. Qualquer dúvida, qualquer ajuda, você estava pronto para me fornecer o suporte. Muito obrigado.

Ao Walter Campestre, agradeço pelo cuidado com os animais utilizados neste trabalho.

Aos atuais alunos de Iniciação científica do laboratório, Deise Silva, Gisele Távora, Luiza Justini, Luisa Albuquerque, Natália Maffei, Felipe e Murillo, agradeço pela ajuda e suporte nesta etapa final. Muito obrigado.

Aos ex alunos de Iniciação científica Shirley, Luciana, Daniel, Andressa, Leila e Adriano, agradeço pela paciência e ajuda com os experimentos.

Aos demais colegas do LIM29, Andressa, Crystiane, Jonathan, Bruno Balbo, Zenaide, Mirtes, agradeço pelo suporte e convívio único com todos vocês.

Aos colegas do LIM16, em especial, Prof. Roberto Zatz, Prof. Joeal Heimann, Prof^a Vanda Jorgetti, Ivone, Luciana, Luzia, Denise, Camila Faneli, agradeço pela disponibilidade em ajudar sempre.

Aos colegas do LIM12, Prof. Antônio Seguro, José Manuel, Heloísa Massola, Camila, agradeço por sempre serem solícitos e prestativos comigo. Muito obrigado.

Aos amigos da Pós graduação da Nefrologia, Damaílde, Graça, Pedro, Eliana, Kaue, agradeço por toda a ajuda com burocracia e outros assuntos que sem dúvida, foram vitais para o término deste trabalho.

À minha família, que ficou na torcida durante todos esses anos, de forma específica, meus tios e tias, Afra, Cristina, Elenice, Lurdes, Maciel, Leandro, Paulo, Geraldo, Didi e Maikon. Aos pequenos Murillo e Manuella. Ao Frederico meu querido primo. Agradeço muito aos meus sogros, André e Cristiane, que praticamente me adotaram em seus corações. À minha querida cunhadinha Mariana.

À minha querida avó Doraci Miranda, ela representa o início de toda a família. Também minha à minha querida avó Lourdes, agradeço tudo o que fez por mim. Ao Eronides Félix (*In memoriam*) e Caetano Geronimo (*In memoriam*), meus avôs, meus exemplos de guerreiros que fizeram o que tinha que ser feito pela família. Minha maior lição!

*"Você pode ficar desapontado se fracassar,
mas estará condenado se não se arriscar."*
Beverly Sills

*"Os dois dias mais importantes da sua vida
são: o dia em que você nasceu e o dia em
que você descobre o porquê".*
Mark Twain

*"Ainda que eu ande pelo vale de densas
trevas, não temerei mal algum, porque Tu
estás comigo..."*
Salmos 23:4

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Siglas	
Lista de Símbolos	
Resumo	
Summary	

1. Introdução	1
1.1. A Diálise Peritoneal e suas complicações	4
1.1.1 <i>Complicações não infecciosas</i>	4
1.1.2 <i>Complicações infecciosas</i>	6
1.2. Fibrose peritoneal	7
1.2.1 <i>Transforming growth factor beta (TGF-β)</i>	8
1.2.1.a) <i>Via SMAD</i>	9
1.3. Modelo de fibrose peritoneal	12
1.4. Estratégias para bloqueio da fibrose	13
1.4.1. <i>Tamoxifeno</i>	13
1.4.2. <i>Bone morphogenic protein – 7 (BMP-7)</i>	15
1.5. Modelo Experimental de DRC	18
2. Racional	21
3. Objetivos	24
4. Materiais e Métodos	26
4.1. Animais	26
4.2. Modelos experimentais	26
4.2.1. <i>Indução da DRC experimental</i>	26
4.2.2. <i>Modelo de Fibrose Peritoneal</i>	27
4.2.3. <i>Padronização do modelo de fibrose peritoneal associado à DRC</i>	27
4.3 Estratégias para bloqueio da fibrose	28
4.3.1. <i>Tamoxifeno</i>	28
4.3.2. <i>BMP-7</i>	28
4.4. Desenho do estudo e grupos experimentais	29
4.5. Métodos	30
4.5.1. <i>Coloração histológica</i>	30
4.5.2 <i>Bioquímica</i>	31
4.5.2.a) <i>Uréia</i>	31
4.5.2.b) <i>Creatinina</i>	31
4.5.3. <i>Imuno-histoquímica</i>	32
4.5.3.a) <i>Macrófagos e linfócitos T</i>	32
4.5.3.b) <i>Miofibroblastos</i>	34
4.5.3.c) <i>Atividade de proliferação celular (PCNA)</i>	35
4.5.3.d) <i>Detecção de SMAD-3 fosforilada</i>	36
4.5.4 <i>PCR em tempo real</i>	38
4.5.4.a) <i>Extração de RNA</i>	38
4.5.4.b) <i>Síntese de cDNA</i>	39
4.5.5. <i>Análise de citocinas por Multiplex</i>	42
4.5.6. <i>Teste de função peritoneal</i>	43
4.5.6.a) <i>Ultrafiltração (UF)</i>	43
4.5.6.b) <i>Massa transferida de glicose (MTG)</i>	43
4.6. Análise estatística	44

4. Resultados	45
5.1. Padronização dos modelos	45
5.1.1. <i>Modelo de doença renal crônica com uremia</i>	45
5.1.1.a <i>Piloto 1</i>	46
5.1.1.b <i>Piloto 2</i>	46
5.1.2 Modelo de fibrose peritoneal	48
5.2 Peso corpóreo	49
5.3 Pressão arterial	50
5.4 Mortalidade	51
5.5. Bioquímica	52
5.5.1. <i>Uréia sérica</i>	52
5.5.2. <i>Creatinina Sérica</i>	53
5.6. Histomorfometria – espessura peritoneal	54
5.7. Estudo do perfil inflamatório	57
5.7.1. <i>Imunohistoquímica para Macrófagos</i>	57
5.7.2. <i>Imunohistoquímica para Linfócitos</i>	59
5.7.3. <i>PCR em Tempo Real e ensaio multiplex para perfil pró-inflamatório</i>	61
5.7.3.a <i>TNF-α</i>	61
5.7.3.b <i>IL-1β</i>	62
5.7.3.c <i>IL-6</i>	63
5.8. Estudo do perfil fibrótico	65
5.8.1. <i>Imunohistoquímica para Miofibroblastos</i>	65
5.8.2. <i>Imunohistoquímica para PCNA</i>	67
5.8.3. <i>PCR em tempo real para perfil fibrótico</i>	69
5.8.3a. <i>Colágeno III</i>	69
5.8.3b. <i>Fibronectina</i>	70
5.8.3c. <i>VEGF</i>	71
5.8.3d. <i>FSP-1</i>	72
5.8.3e. <i>TGF-β</i>	73
5.9. Análise da via SMAD	75
5.9.1. <i>Imuno-histoquímica para SMAD 3 fosforilada</i>	75
5.9.2. <i>PCR em tempo real para SMAD 3</i>	77
5.9.3. <i>PCR em tempo real para SMAD 7</i>	78
5.10. Análise da função peritoneal	79
5.10.1. <i>Ultrafiltração</i>	79
5.10.2. <i>Massa transferida de glicose</i>	80
6. Discussão	81
7. Resumo dos Achados	93
8. Conclusões	95
9. Referências	96

Lista de figuras

Figura 1. Esquema ilustrativo da via SMAD.	11
Figura 2. Alterações histológicas em seções no rim de animais submetidos a dieta rica em adenina	19
Figura 3. Protocolo experimental	29
Figura 4. Resultados do piloto 2	47
Figura 5. Histologia renal do modelo adenina padronizado.	47
Figura 6. Cortes histológicos de peritônio do modelo de FP padronizado.	48
Figura 7. Espessura média da membrana peritoneal	54
Figura 8. Imagem representativa da espessura da membrana peritoneal	55
Figura 9. Quantificação do infiltrado de macrófagos (ED-1 ⁺) na membrana peritoneal	57
Figura 10. Imunohistoquímica para detecção de macrófagos (ED-1 ⁺)	58
Figura 11. Quantificação do infiltrado de linfócitos (CD43 ⁺) na membrana peritoneal	59
Figura 12. Imunohistoquímica para detecção de linfócitos (CD43 ⁺) no peritônio.....	60
Figura 13. Expressão relativa e concentração proteica de TNF- α . no peritônio	61
Figura 14. Expressão relativa e concentração proteica de IL-1 β no peritônio	62
Figura 15. Expressão relativa e concentração proteica de IL-6 no peritônio	63
Figura 16. Quantificação da α -actina presente na membrana peritoneal	65
Figura 17. Imunohistoquímica para detecção de miofibroblastos (α -actina) na membrana peritoneal	66
Figura 18. Quantificação de células em proliferação (PCNA) na membrana peritoneal ...	67
Figura 19. Imunohistoquímica para detecção de células em proliferação (PCNA) na membrana peritoneal	68
Figura 20. Expressão relativa de Colágeno III no peritônio.....	69

Figura 21. Expressão relativa de Fibronectina no peritônio.....	70
Figura 22. Expressão relativa de VEGF no peritônio.....	71
Figura 23. Expressão relativa de FSP-1 no peritônio	72
Figura 24. Expressão relativa de TGF- β no peritônio	73
Figura 25. Quantificação de SMAD3 fosforilada na membrana peritoneal	75
Figura 26. Imunohistoquímica para detecção de SMAD 3 fosforilada na membrana peritoneal	76
Figura 27. Expressão relativa de SMAD3 no peritônio	77
Figura 28. Expressão relativa de SMAD7 no peritônio	78
Figura 29. Volume de ultrafiltração da membrana peritoneal.....	79
Figura 30. Taxa de glicose transferida pela membrana peritoneal	80

Lista de tabelas

Tabela 1. Primers utilizados para os experimentos PCR em tempo real.....	41
Tabela 2. Peso corpóreo nos grupos do estudo nos dia 0, 15 e 30	49
Tabela 3. Pressão arterial nos grupos do estudo nos dias 0, 15 e 30.	50
Tabela 4. Uréia sérica nos grupos do estudo nos dias 0, 15 e 30.	52
Tabela 5. Creatinina sérica nos grupos do estudo nos dias 0, 15 e 30.....	53
Tabela 6. Características da membrana peritoneal dos animais no dia 30.....	56
Tabela 7. Expressão gênica e concentração proteica de citocinas inflamatórias no peritônio	64
Tabela 8. Expressão de VEGF no peritônio.....	69
Tabela 9. Expressão gênica dos marcadores de fibrose no peritônio.....	74
Tabela 10. Quantificação de SMAD3 fosforilada no peritônio	75
Tabela 11. Expressão de SMAD3 no peritônio	77
Tabela 12. Expressão de SMAD7 no peritônio	78
Tabela 13. Ultrafiltração da membrana peritoneal.....	79
Tabela 14. Taxa de glicose transferida pela membrana peritoneal	80

Lista de abreviaturas

AEC	Aminoetilcarbazol
BMPs	<i>Bone-Morphogenic Protein</i>
CAPD	<i>Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
CT	<i>Threshold Cycle</i>
dATP	<i>Deoxyadenosine triphosphate</i>
dCTP	<i>Deoxycytidine triphosphate</i>
dGTP	<i>Deoxyguanosine triphosphate</i>
DHOA	2,8-Dihidroxiadenina
DP	Diálise Peritoneal
DRC	Doença Renal Crônica
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
dTTP	<i>Deoxythymidine triphosphate</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
EPS	Peritonite Esclerosante Encapsulante
EUA	Estados Unidos da América
FSP-1	<i>Fibroblast Specific Protein-1</i>
GC	Gluconato de Clorexidina
H₂O	Água
IFN-γ	Interferon-gama
IH	Imuno-histoquímica
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IκB	Inibidor kappa
LSAB-AP	<i>Labeled Streptavidin-Biotin Alkaline Phosphatase</i>
LSAB-HRP	<i>Labeled Streptavidin-Biotin Horseradish Peroxidase</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>

MMP	Metaloproteinase
mRNA	RNA mensageiro
MTG	Massa Transferida de Glicose
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	Proteína C Reativa
pH	Potencial de hidrogênico
PTH	Paratormônio
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucleico)
RPM	Rotações por minuto
TAM	Tamoxifeno
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-alfa</i>
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
Tris-HCL	<i>TRIS hydrochloride</i>
TβR	<i>Transforming Growth Factor beta Receptor</i>
UF	Ultrafiltração
USRDS	<i>United States Renal Data System</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vs	<i>Versus</i>

Lista de símbolos

cél/mm²	Células por milímetro quadrado
cm²	Centímetro quadrado
dL	deciLitro
Δ	<i>Delta</i>
g	Grama
°C	Graus centígrados
kg	Kilograma
L	Litro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
M	Molar
nM	nanoMolar
%	Porcentagem

RESUMO

Silva FMO. *Análise do efeito do tamoxifeno e da BMP-7 em modelo experimental de fibrose peritoneal em ratos com doença renal crônica [Tese].* São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A diálise peritoneal constitui uma importante opção terapêutica para o paciente com doença renal crônica (DRC) em estágio 5. Entretanto, a médio-longo prazo, alterações morfofuncionais relacionadas a vários fatores, como bioincompatibilidade das soluções de diálise e infecções peritoneais, entre outros, estabelecem um processo inflamatório e fibrótico na membrana peritoneal, levando à perda da eficiência deste método dialítico. O estado urêmico destes pacientes é um agravante, pois intensifica o processo inflamatório da membrana peritoneal. Estratégias terapêuticas que desacelerem o processo de fibrose da membrana peritoneal dos pacientes com DRC em diálise são de extrema importância.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo estabelecer um modelo de peritonite fibrosante associado à DRC com uremia, que mimetiza a situação clínica, e analisar, neste modelo, o efeito de duas moléculas antifibróticas, o tamoxifeno (TAM) e a BMP-7 (*bonemorphogenic protein-7*).

A DRC com uremia foi induzida em ratos Wistar através da administração de dieta rica em adenina, por um período de 30 dias. Nos últimos 15 dias, com o estado de uremia já estabelecido, os animais receberam injeções intraperitoneais de gluconato de clorexidina para a indução da fibrose peritoneal (FP). Os tratamentos com tamoxifeno (10mg/Kg/dia, por gavagem) e BMP-7 (30µg/Kg, injeções intraperitoneais a cada 3 dias) foram iniciados junto com a indução da fibrose peritoneal. Foram formados 6 grupos experimentais: **CONTROLE**, animais normais; **DRC**, animais com doença renal crônica; **FP**, animais com fibrose peritoneal; **DRC/FP**, animais com DRC e FP mimetizando a situação clínica; **DRC/FP+TAM**, animais com DRC e FP tratados com tamoxifeno; e **DRC/FP+BMP7**, animais com DRC e FP tratados com BMP-7. Durante os 30 dias de seguimento do estudo foram verificados o peso, a pressão arterial, ureia e creatinina séricas dos animais. Ao término deste período os animais foram sacrificados e o peritônio foi removido e submetido às análises: a) histológica, para avaliar o grau de espessamento (Tricrômio de Masson); b) imunohistoquímica, para localizar e quantificar a presença de células inflamatórias (macrófagos, linfócitos T), miofibroblastos (α -actina) e a atividade de proliferação celular (PCNA); c) análise de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) no tecido peritoneal tanto em nível de RNAm, através de PCR em tempo real, como também em nível proteico, através de multiplex; d) PCR em tempo real para determinar a expressão dos componentes da matriz extracelular (colágeno III e fibronectina) e de fatores fibrogênicos (TGF- β 1 e FSP-1). Além disso, com o objetivo de estudar a possível via de sinalização associada à fibrose peritoneal, foi analisada a expressão de SMAD 3 e SMAD 7 no peritônio através de PCR em tempo real e imunohistoquímica para SMAD 3 fosforilada. Por fim, a função peritoneal foi analisada através do teste de ultrafiltração e massa transferida de glicose (MTG).

Os dados da evolução ponderal mostraram que, enquanto os animais dos grupos Controle e FP tiveram um ganho de peso significativo em relação ao primeiro dia do protocolo (28% e 18%, respectivamente), os animais dos demais grupos perderam peso significativamente, em média,

26% em relação ao primeiro dia. Todos os animais que receberam dieta rica em adenina e que, portanto, desenvolveram DRC, apresentaram hipertensão arterial, detectada nos dias 15 e 30 do estudo (média de 173mmHg no dia 15 e 172mmHg no dia 30). Confirmando o estabelecimento de DRC com uremia, os animais que receberam dieta rica em adenina apresentaram níveis séricos significativamente elevados de uréia (em média 170 mg/dL no dia 15 e 286 mg/dL no dia 30) e creatinina (média de 0,97 mg/dL no dia 15 e 1,82 mg/dL no dia 30). Os tratamentos com TAM e BMP-7 não influenciaram significativamente nestes parâmetros.

A análise da membrana peritoneal dos animais dos grupos experimentais FP e DRC/FP revelou um espessamento significativo da membrana peritoneal ($130\pm 33\mu\text{m}$ e $132\pm 26\mu\text{m}$, respectivamente vs $36\pm 2\mu\text{m}$ e $27\pm 6\mu\text{m}$ nos grupos CONTROLE e DRC; $p<0,001$) bem como a presença de células inflamatórias. Os tratamentos com TAM e BMP7 foram eficazes em proteger a membrana peritoneal contra o espessamento ($42\pm 2\mu\text{m}$ e $53\pm 7\mu\text{m}$, respectivamente; $p<0,001$ vs DRC/FP) e contra o infiltrado inflamatório. Além disso, no que se refere aos miofibroblastos, células efetoras da fibrogênese detectadas pela marcação de α -actina, foi encontrado uma marcação significativa de α -actina no peritônio dos grupos FP e DRC/FP ($p<0,01$ vs CONTROLE), sendo que os tratamentos com TAM e BMP7 protegeram o peritônio da proliferação maciça de miofibroblastos, confirmada pela expressão de PCNA de forma significativa.

Com relação à detecção de citocinas pró-inflamatórias, a análise por PCR em tempo real nos animais do grupo DRC mostrou um aumento significativo da expressão no peritônio de TNF- α e IL-1 β comparado ao grupo CONTROLE. A expressão dessas citocinas também se mostrou aumentada no peritônio dos animais dos grupos FP e DRC/FP. Os tratamentos com TAM e BMP7 reduziram a expressão de TNF- α e IL-1 β de forma significativa em relação ao grupo DRC/FP ($p<0,01$). O reflexo destes resultados pode ser observado com o ensaio por multiplex em que a presença dessas citocinas em sua forma proteica foi encontrada em quantidades significativas no peritônio dos animais com FP e uremia associada à FP em relação ao grupo CONTROLE. Os tratamentos com TAM e BMP7 reduziram a presença dessas citocinas de forma significativa ($p<0,01$ vs DRC/FP).

Como esperado, a presença de RNAm de componentes da matriz extracelular foi significativamente maior nos grupos FP e DRC/FP, comparados ao grupo CONTROLE. De fato, a expressão de colágeno III foi maior nos grupos FP e DRC/FP ($3,4\pm 1$ e $10,3\pm 2,4$ UI, respectivamente; $p<0,01$ vs CONTROLE), bem como de fibronectina nos grupos ($6,5\pm 0,8$ e $29,2\pm 1$ UI, respectivamente; $p<0,01$ vs CONTROLE). Os animais tratados com TAM e BMP7 apresentaram uma diminuição significativa tanto da expressão de colágeno III ($1,5\pm 0,9$ e $0,2\pm 0,1$ UI, respectivamente; $p<0,01$ vs DRC/FP), como da expressão de fibronectina ($6,6\pm 1,2$ e $9,7\pm 0,5$ UI, respectivamente; $p<0,01$ vs DRC/FP), confirmando um efeito anti-fibrótico dessas drogas. Ainda, enquanto nos grupos FP e DRC/FP a expressão de TGF- β foi significativamente maior em relação ao grupo CONTROLE ($13,2\pm 0,9$ e $30,3\pm 0,1$ UI, respectivamente; $p<0,01$), TAM e BMP7 diminuíram a expressão de TGF- β ($17,7\pm 0,2$ e $16,2\pm 0,1$ UI, respectivamente; $p<0,01$ vs DRC/FP). Padrão similar foi encontrado com a expressão do RNAm para FSP-1 em que houve um aumento significativo da expressão desse gene nos grupos FP e DRC/FP, com significativo bloqueio nos animais tratados com TAM e BMP7 ($p<0,01$ vs DRC/FP).

Com relação à análise das vias de sinalização possivelmente envolvidas no processo, a expressão de SMAD 3 foi significativamente maior nos grupos FP e DRC/FP ($3,7\pm 0,3$ e $4,6\pm 0,3$ UI, respectivamente) em relação aos grupos CONTROLE e DRC ($1\pm 0,2$ e $1,3\pm 0,6$ UI, respectivamente; $p<0,01$). Os tratamentos com TAM e BMP7 diminuíram a expressão da

SMAD 3 no peritônio ($1,1 \pm 0,6$ e $1,1 \pm 0,7$ UI, respectivamente; $p < 0,01$ vs DRC/FP). Contudo TAM e BMP7 aumentaram significativamente a expressão de SMAD 7 ($2,8 \pm 0,5$ e $3,7 \pm 0,5$ UI, respectivamente; $p < 0,01$ vs DRC/FP), uma proteína contra reguladora da via do TGF- β , capaz de bloquear a expressão de fatores pró-fibróticos bem como de fatores inflamatórios.

Finalmente, os grupos tratados TAM e BMP7 tiveram a função do peritônio preservada quando comparados aos grupos FP e DRC/FP, verificado pela manutenção da capacidade de ultrafiltração e de reduzir a MTG.

Em resumo, tamoxifeno e BMP7 foram capazes de bloquear o espessamento da membrana peritoneal, proteger o peritônio contra a infiltração de células inflamatórias e de miofibroblastos, além de diminuir a proliferação celular no peritônio. Estes tratamentos também foram eficazes em diminuir significativamente a expressão dos fatores pró-fibróticos e das citocinas inflamatórias. Com relação às SMADs, os tratamentos com TAM e BMP7 foram eficazes em bloquear a expressão de SMAD 3, bem como aumentar a expressão de SMAD 7.

Os resultados do presente estudo sugerem que tamoxifeno e BMP7 protegem o peritônio no modelo de fibrose peritoneal desenvolvido em ratos com DRC e uremia, possivelmente devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e anti-fibróticos.

Descritores: *Insuficiência renal crônica; Fibrose peritoneal; Uremia; Tamoxifeno; Proteína morfogenética óssea-7; Ratos Wistar.*

SUMMARY

Silva FMO. *Analysis of the effect of tamoxifen and BMP-7 in an experimental model of peritoneal fibrosis in rats with chronic kidney disease [Thesis].* São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Peritoneal dialysis is an important therapeutic option for patients with stage 5 chronic kidney disease (CKD). However, at medium and long term, morphological and functional changes related to various factors such as bioincompatibility of dialysis solutions and peritoneal infections, among others, establish an inflammatory and fibrotic process in the peritoneal membrane, leading to a loss of dialysis efficiency. The uremic state of these patients aggravates this situation because it intensifies inflammation of the peritoneal membrane. Therapeutic strategies that slow the process of fibrosis of the peritoneal membrane of patients with CKD on dialysis are extremely important.

In this context, the present study aimed to establish a model of peritoneal fibrosis associated with CKD with uremia, that mimics the clinical situation, and analyze the effect of two antifibrotic molecules, tamoxifen (TAM) and the BMP7 (bone morphogenic protein-7), in the proposed model.

CKD with uremia was induced in male Wistar rats by adenine in the diet during a period of 30 days. After 15 days, with the state of uremia already established, animals received intraperitoneal injections of chlorhexidine gluconate, for the induction of peritoneal fibrosis (PF). Treatment with TAM (10mg/Kg/day by gavage) and BMP7 (30µg/Kg, intraperitoneal injections every 3 days) were initiated along with the induction of peritoneal fibrosis. Six groups were induced: **CONTROL**, normal animals; **CKD**, animals with chronic kidney disease; **PF**, animals with peritoneal fibrosis; **CKD / PF**, animals with CKD and PF mimicking the clinical situation; **CKD / PF + TAM**, animals with CKD and PF treated with tamoxifen; and **CKD / PF + BMP7**, animals with CKD and PF treated with BMP7. During 30 days of the follow-up study, weight, blood pressure, serum urea and creatinine of the animals were verified. At the end of this period, the animals were sacrificed and the peritoneum was removed and subjected to the following analysis: a) histology, to assess the degree of thickening (Masson's Trichrome); b) immunohistochemistry, to locate and quantify the presence of inflammatory cells (macrophages, T lymphocytes), myofibroblasts (α -smooth muscle actin) and cell proliferation activity (PCNA); c) analysis of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) both in peritoneal tissue mRNA level through real time PCR as well as on protein level by multiplex; d) real-time PCR to determine the expression of extracellular matrix components (collagen III and fibronectin) and fibrogenic factors (TGF- β and FSP-1). Furthermore, in order to study the possible signaling pathway associated to peritoneal fibrosis, the expression of SMAD 3 and SMAD 7 in the peritoneum was analyzed via real-time PCR and immunohistochemistry for phosphorylated SMAD 3. Finally, the peritoneal function was assessed by ultrafiltration and mass transferred glucose test (MTG).

Data from weight gain showed that while animals from CONTROL and PF groups had significant weight gain (28% and 18% respectively) compared to the first day of protocol, the animals of other groups lost weight significantly, on average, 26% compared to the first day. All animals that received diet rich in adenine developed CKD presented by hypertension, detected on days 15 and 30 of the study (average of 173mmHg and 172mmHg respectively). Confirming

the establishment of CKD with uremia, the animals that received diet rich in adenine showed serum urea (average 170 mg/dL on day 15 and 286 mg/dL on day 30) and creatinine (average of 0.97 mg/dL on day 15 and 1.82 mg/dL on day 30) significantly higher in the 15th and 30th days. Treatments with TAM and BMP7 did not influence these parameters.

The peritoneal membrane analysis of PF and CKD/PF experimental groups showed a significant thickening of the peritoneal membrane ($130 \pm 33 \mu\text{m}$ and $132 \pm 26 \mu\text{m}$, respectively; $p < 0.001$ vs $36 \pm 2 \mu\text{m}$ and $27 \pm 6 \mu\text{m}$ in CONTROL and CKD; $p < 0.001$) with presence of inflammatory cells. The treatments with TAM and BMP7 were effective in protecting the membrane against the thickening ($42 \pm 2 \mu\text{m}$ and $53 \pm 7 \mu\text{m}$, respectively; $p < 0.001$ vs CKD/PF) and inflammatory infiltrate. Furthermore, with regard to myofibroblasts, effectors cells in the fibrogenesis process detected by α -SMA presence, it was found a significant expression in the peritoneum of PF and CKD/PF ($p < 0.01$ vs CONTROL), and the treatment with TAM and BMP7 significantly protected against the presence of myofibroblasts confirmed by the significant expression of PCNA.

With regard to the detection of pro-inflammatory cytokines, analysis by real-time PCR in the animals of CKD group showed a significant increase in TNF- α expression in the peritoneum and IL-1 β compared to the CONTROL group. The expression of these cytokines was also increased in the peritoneum of the CKD/PF group. The treatment with TAM and BMP7 significantly reduced TNF- α and IL-1 β expression compared to CKD/PF group ($p < 0.01$). The repercussion of these results can be observed with the multiplex test in which the presence of these cytokines in its protein form were found in significant quantities in the peritoneum of the animals with uremia associated with PF compared to CONTROL group. The treatment with TAM and BMP7 significantly reduced the presence of these cytokines ($p < 0.01$ vs CKD/PF). As expected, the mRNA expression of extracellular matrix components was significantly elevated in the PF group and CKD/PF compared to the control group. Indeed, collagen III mRNA expression was higher in PF and CKD/PF group (3.4 ± 1 and 10.3 ± 2.4 UI, respectively; $p < 0.01$ vs CONTROL) as well as fibronectin (6.5 ± 0.8 and 29.2 ± 1 UI; respectively; $p < 0.01$ vs CONTROL). The animals treated with TAM and BMP7 significantly blocked the expression of collagen III (1.5 ± 0.9 and 0.2 ± 0.1 UI, respectively; $p < 0.01$ vs CKD/PF) and fibronectin (6.6 ± 1.2 and 9.7 ± 0.5 UI, respectively; $p < 0.01$ vs CKD/PF). Further, while in the PF and CKD/PF groups the expression of TGF- β (13.2 ± 0.9 UI and 30.3 ± 0.1 UI, respectively; $p < 0.01$) was significantly higher compared to the CONTROL group, TAM and BMP7 decreased the expression of TGF- β (17.7 ± 0.2 UI and 16.2 ± 0.1 UI, respectively; $p < 0.01$ vs CKD/PF). A similar trend was found with the expression of FSP-1 mRNA with an increase in expression of this gene in PF and CKD/PF groups ($p < 0.01$ vs CONTROL), with significant blockage in the animals treated with TAM and BMP7 ($p < 0.01$ vs CKD/PF).

Regarding the analysis of signaling pathways possibly involved in the process, SMAD 3 expression was significantly higher in PF and CKD/PF groups (3.7 ± 0.3 UI and 4.6 ± 0.3 UI, respectively) compared to groups CONTROL and CKD (1 ± 0.2 UI and 1.3 ± 0.6 UI, respectively; $p < 0.01$). Treatments with TAM and BMP7 decreased the expression of SMAD 3 in the peritoneum (1.1 ± 0.6 UI and 1.1 ± 0.7 UI, respectively; $p < 0.01$ vs CKD/PF).

Yet TAM and BMP7 significantly increased the expression of SMAD 7 (2.8 ± 0.5 and 3.7 ± 0.5 , respectively; $p < 0.01$ vs CKD/PF), a regulatory TGF- β protein capable of blocking the expression of pro-fibrotic and inflammatory factors.

Finally, the treated groups had the function of the peritoneum preserved when compared to the PF and CKD / PF groups, checked through the maintenance of the ultrafiltration capacity and reducing MTG.

In summary, the animals treated with TAM and BMP7 had the peritoneum protected from thickening, inflammatory infiltrate, presence of myofibroblasts and cellular proliferation. The treatments were also effective in significantly reduce the expression of pro-fibrotic factors and inflammatory cytokines. Regarding SMADs, treatments with TAM and BMP7 were effective in blocking the expression of SMAD 3 and increase SMAD 7 expression.

The results of this study suggest that tamoxifen and BMP7 protected the peritoneum in an experimental model of peritoneal fibrosis developed in uremic rats with CKD, possibly due to their anti-inflammatory and anti-fibrotic properties.

Descriptors: *Chronic kidney disease; Peritoneal fibrosis; Uremia; Tamoxifen; Bone morphogenic protein – 7 (BMP-7); Wistar rats.*

1. INTRODUÇÃO

A atenção dos sistemas públicos de saúde de diversos países no mundo tem se voltado para a doença renal crônica (DRC). De fato, a DRC atinge hoje proporções epidêmicas. No final de 2013, estimava-se que 2,5 milhões de pacientes estavam em diálise no mundo [FMC, 2013]. Destes, 89% estavam em hemodiálise e 11% em diálise peritoneal (DP) [FMC, 2013].

De acordo com os últimos dados do *United States Renal Data System* (USRDS), nos Estados Unidos da América (EUA), a DRC atinge uma significativa parcela da população americana, a saber, 13,6% da população adulta [USRDS, 2014]. Este dado significa que a DRC se tornou mais comum que a diabetes mellitus, a qual atinge 12,3% dos americanos adultos [USRDS, 2014].

No Brasil, no ano de 2013, dados do DataSUS, que abrange cerca de 90% do total de pacientes em diálise, mostraram que 100.397 pacientes estavam em diálise, o que corresponde a uma prevalência aproximada de 499 pacientes/pmp [Sesso RCC et al., 2013]. Deste total de pacientes, 84.333 estavam em hemodiálise (84%) e 16.064 em diálise peritoneal (16%). Do total de pacientes em diálise, 9,2% encontravam-se em DP [Sesso RCC et al., 2013].

Os gastos com a terapia renal substitutiva são cada vez maiores. Por exemplo, os EUA gastaram no ano de 2012, aproximadamente US\$ 29 bilhões com pacientes diagnosticados com DRC (valores sem as despesas com medicamentos) [USRDS, 2014].

Os gastos também são elevados dadas as proporções da população. Especificamente no município de São Paulo, em um estudo epidemiológico detalhado, Cruz e colaboradores demonstraram que de 2008 a 2012 foram gastos R\$ 526.791.528,62 com pacientes em hemodiálise e R\$ 60.214.696,69 com pacientes em diálise peritoneal [Cruz CF et al., 2014]. O gasto total com os pacientes em tratamento dialítico em São Paulo durante este período foi de R\$ 594.903.264,75 [Cruz CF et al., 2014].

O fato é que pacientes com DRC em estágio 5 necessitam de algum tipo de terapia de substituição renal. Dentre as principais terapias de substituição renal, a DP destaca-se não apenas pela qualidade de vida oferecida ao paciente, como também por estar associada à sobrevida dos pacientes nos dois primeiros anos de diálise quando comparados aos que fazem hemodiálise [USRD, 2014]. Ademais, Wenhandl e colaboradores demonstraram em um estudo retrospectivo de quatro anos que o risco de morte dos pacientes que iniciaram em DP é 8% menor em relação aos que iniciaram em hemodiálise [Wenhandl ED et al., 2010]. Além disso, a taxa de internação dos pacientes em DP tem sido menor quando comparada a dos pacientes em hemodiálise [USRD, 2014].

Outro fator que deve ser levado em consideração está relacionado à função renal residual. É fato que a função renal residual está relacionada com a sobrevida dos pacientes em diálise. Desta forma, os pacientes em DP apresentam um risco significativamente menor de perda da função renal residual em comparação aos pacientes em hemodiálise [Wang AY et al., 2006].

Além disso, conforme detalhado acima, a DP custa significativamente menos do que a hemodiálise aos cofres públicos [Cruz CF et al., 2014; Klarenbach SW., et al 2014].

Entretanto, apesar dos avanços no procedimento de diálise peritoneal, alterações morfofuncionais da membrana peritoneal decorrentes da bioincompatibilidade das soluções de diálise, de infecções peritoneais e da inflamação associada à uremia podem comprometer a eficácia desta modalidade de diálise [Abensur H, 2002; Lai KN et al., 2010]. Tais alterações ocorrem de forma progressiva e se expressam clinicamente por ineficiência da ultrafiltração e, histologicamente, por diferentes graus de inflamação e fibrose peritoneal. A fibrose peritoneal, por sua vez, pode levar a uma rara e grave complicação tardia da DP chamada peritonite esclerosante encapsulante (EPS) [Korte MR et al., 2011]. Estas alterações culminam no aumento da morbimortalidade dos pacientes renais crônicos e na falência deste método dialítico.

Neste sentido, estratégias que têm como foco o bloqueio da inflamação e da fibrose peritoneal são de extrema relevância. Desta forma, o objetivo central do presente estudo é analisar o efeito de duas moléculas para bloquear o desenvolvimento da fibrose peritoneal induzida por gluconato de clorexidina (GC) associada à DRC com uremia: tamoxifeno e BMP7. Além disso, este projeto analisou os mecanismos envolvidos em cada tratamento, a fim de elucidar seus possíveis efeitos protetores sobre o tecido peritoneal.

1.1. A DIÁLISE PERITONEAL E SUAS COMPLICAÇÕES

1.1.1. Complicações não infecciosas

Antes mesmo do início do tratamento, a uremia e a consequente inflamação sistêmica constituem situações clínicas que podem comprometer a membrana peritoneal. A uremia gera um estado inflamatório sistêmico que causa um aumento do estresse nitrosativo na membrana peritoneal [Baroni G et al., 2012]. Williams e colaboradores, analisando biópsias peritoneais de pacientes urêmicos antes de se submeterem a DP, demonstraram a existência de um significativo espessamento da membrana peritoneal [Williams JD et al., 2002]. Além disso, níveis elevados de marcadores do estado inflamatório, como a proteína C reativa, são encontrados em pacientes com DRC em diferentes fases de sua progressão [Fine A et al., 2002]. Evidências sorológicas de atividade inflamatória são encontradas em pacientes com DRC tanto na fase pré-dialítica [Stenvinkel P, 2001], como em pacientes com DRC em hemodiálise e em diálise peritoneal [Margetts PJ et al., 2002; Ates K et al., 2000; Davies SJ et al., 1996; Mateijssen MA et al., 1999].

Na DP, a bioincompatibilidade das soluções bem como a elevada concentração de glicose são os principais fatores da ativação da resposta inflamatória [Baroni G et al., 2012]. Há relação direta entre inflamação e a situação de alto transporte em DP. Pecoits e colaboradores, no nosso laboratório, demonstraram que pacientes com características de transporte alto e médio-alto da membrana peritoneal apresentam níveis plasmáticos mais elevados de IL-6

(interleucina-6) e de fator do crescimento do endotélio vascular (VEGF), bem como maior massa de IL-6 e VEGF no efluente peritoneal do que aqueles com padrão de baixo transportadores [Pecoits-Filho R et al., 2002]. Estudos reportaram a presença de níveis séricos de IL-6, IL-8 (interleucina-8) e TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) mais pronunciadamente elevados em pacientes em diálise peritoneal ambulatorial contínua quando comparados àqueles em hemodiálise ou no período pré-dialítico [Ates K et al., 2000; Davies SJ et al., 1996].

Ademais, o próprio aumento da pressão hidrostática intraperitoneal devido a infusão de solução de diálise na cavidade peritoneal está associado ao aparecimento de hérnias, edemas e problemas respiratórios devido à restrição a expansão pulmonar [Cruz J et al., 2006]. Ainda, o aumento da glicemia dos pacientes com alterações dos triglicérides e obesidade submetidos à DP estão relacionados com a presença de glicose na solução de diálise [Cruz J et al., 2006]

1.1.2. Complicações infecciosas

Peritonites, infecção do óstio de saída do catéter e a infecção do túnel subcutâneo são as principais complicações infecciosas associadas à DP [Cruz J et al., 2006]. Os microrganismos mais encontrados são: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e bactérias Gram-negativas [Cruz J et al., 2006].

Tais complicações são de extrema relevância pois estudos evidenciam uma mortalidade de 30% dos casos relacionados à infecção, atingindo cerca de 20% dos pacientes em DP [Devenport A, 2009; Boudville N, et al, 2012]

Ainda na peritonite infecciosa, a resposta do peritônio aos microrganismos infectantes envolve a liberação de citocinas inflamatórias e a interação entre populações celulares encontradas na membrana peritoneal: macrófagos, células mesoteliais e fibroblastos [Lai KN et al., 2010; Margetts PJ et al., 2002]. No primeiro mês após a peritonite, os pacientes desenvolvem um aumento no transporte peritoneal dos solutos de baixo peso molecular e deficiência na ultrafiltração. Peritonites de repetição terminam por perpetuar esta condição.

Diante de todo este processo inflamatório, macrófagos e leucócitos passam a produzir citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (Interleucina-1 β) que desencadeiam a migração, adesão e proliferação de fibroblastos no tecido peritoneal submesotelial, resultando na formação de fibrose [Lai KN et al., 2010; Faller B et al., 1989]

1.2. FIBROSE PERITONEAL

Em seu estado fisiológico normal, o peritônio consiste basicamente de uma camada de células mesoteliais anexada a uma membrana basal. Entre a camada mesotelial e o plexo vascular encontra-se a compacta camada submesotelial. Esta camada é composta por fibroblastos, macrófagos, vasos sanguíneos e matriz extracelular [Korte MR et al., 2011; Flessner MF, 2005].

Como já abordado anteriormente, diversas alterações no peritônio podem ocorrer simplesmente pelo estado de uremia do paciente. Além disso, o contínuo tratamento da DP leva ao desaparecimento gradual da camada de células mesoteliais [Korte MR et al., 2011].

Com o desnudamento da camada mesotelial, fibroblastos positivos para FSP-1 (Fibroblast Specific Protein-1) são ativados e proliferam. Com isso, estes fibroblastos sintetizam moléculas pró-fibróticas como colágeno tipo I e III, fibronectina e proteoglicanos [Okada H et al., 2003; Strutz F et al., 1995]. De fato, a ativação dos fibroblastos também resulta na expressão VEGF que contribui para a neoangiogênese no tecido afetado. Ademais, Okada e colaboradores demonstraram que os fibroblastos que expressavam FSP-1 também eram os responsáveis por expressar MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), uma proteína que age como um químioatrativo para macrófagos, aumentando não apenas a resposta inflamatória, mas sim, tornando a membrana peritoneal em uma espessa camada rica em colágeno e matriz extracelular reduzindo sua capacidade de promover a ultrafiltração [Okada H et al., 2003; Gu L et al., 1997].

1.2.1. *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β)

A superfamília TGF- β consiste em uma gama de proteínas que desempenham diferentes funções em uma série de processos celulares como migração celular, transição de células epiteliais para mesenquimais (EMT), remodelamento da matriz extracelular dentre outros processos [Akhurst RJ et al., 2012].

Existem três tipos de isoformas homólogas de TGF- β em seres humanos: TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 [Akhurst RJ et al., 2012]. Estes três tipos de isoformas do TGF- β compartilham um complexo de receptores e vias intracelulares semelhantes, porém, seus níveis de expressão diferem do tecido em questão [Akhurst RJ et al., 2012; Millan FA et al., 1991].

Contudo, TGF- β é considerado uma das principais moléculas envolvidas no processo de fibrogênese [Loureiro J et al., 2011]. Existem diversas vias pelas quais o TGF- β pode atuar para promover a fibrose peritoneal. Dentre as principais vias, o TGF- β pode atuar induzindo a síntese e inibindo a degradação dos componentes da matriz extracelular [Cohen EP, 1995]. O TGF- β juntamente com o TNF- α pode regular a transformação fenotípica de fibroblastos em miofibroblastos [Xu X et al., 2002]. Os miofibroblastos apresentam semelhança fenotípica com as células da musculatura lisa vascular e podem ser identificados através da expressão da proteína α -actina (alpha-smooth muscle actin) [Xu X et al., 2002; Sawashima K et al., 2000]. Ao sofrerem esta transformação, estas células desempenham um importante papel na fibrose peritoneal, visto que são as principais células responsáveis em produzir matriz extracelular e colágeno, e estes

contribuem diretamente para o espessamento da membrana peritoneal [Xu X et al., 2002; Powel DW et al., 1999].

No entanto, a ativação do receptor tipo I do TGF- β pode desencadear uma sinalização intracelular com duas vias independentes e semelhantes: Via canônica SMAD dependente e via SMAD independente ou não canônica. Focaremos na via SMAD dependente.

1.2.1.a) Via SMAD

Os membros da família TGF- β são capazes de regular a expressão de determinados genes através dos fatores de transcrição conhecidos como SMAD [Massagué J, 2012]. O nome “SMAD” foi criado a partir da identificação da primeira SMAD em humanos (SMAD1) em referência a sua similaridade com as proteínas Sma e Mad [Liu F, et al., 1996; Massague J, et al., 2005]. As SMADs são proteínas compostas de aproximadamente 500 aminoácidos de comprimento e, além disso, possuem dois domínios globulares acoplados por uma região ligante [Massague J, et al., 2005].

No genoma humano, existem até o momento oito SMAD's identificadas [Massagué J, 2012; Massague J, et al., 2005], sendo que apenas cinco – SMAD 1, SMAD 2, SMAD 3, SMAD 5 e SMAD 8 –atuam como substrato para a família TGF- β de receptores. Dentro da família TGF- β de receptores, as SMADs 1,5 e 8 atuam como substrato para receptores das BMPs (Bone-Morphogenic Proteins) [Massague J et al., 2005]. Por outro lado, as SMADs 6 e 7 apresentam papel inibitório, ou seja, são SMADs que bloqueiam o sinal de outras SMADs [Massague J et al., 2005].

De forma sucinta, o TGF- β se liga a dois pares de receptores serina/kinase, conhecidos como TGF- β tipo I (T β R-I) e tipo II (T β R-II) formando um complexo heterotetramérico de receptores [Massague J et al., 2005]. Neste complexo, o T β R-II fosforila a região GS localizada na parte N-terminal do T β R-I [Massague J et al., 2005]. A fosforilação do T β R-I transforma a região GS deste receptor em um sítio de ligação para SMAD 2/3. Logo após, as SMADs 2/3 são fosforiladas pelo T β R-I e liberadas para propagar o sinal [Massague J et al., 2005]. Como exemplo, após a SMAD 3 ser fosforilada, ela forma um heterodímero com a SMAD 4 a qual sofre uma translocação nuclear ativando específicos promotores para a expressão de genes relacionados com a fibrose [Mitu G et al., 2008].

Figura 1. Esquema ilustrativo da via SMAD dependente. Após se ligar aos receptores, um complexo heteromérico é formado com seus receptores específicos T β R-I e II os quais sofrem fosforilação propagando um sinal intracelular para as SAMDs 2 e 3. Estas duas proteínas formam um heterodímero com um mediador comum (SMAD4). O heterodímero sofre translocação nuclear na qual os receptores SMADs se ligam a uma região específica do material genético sintetizando então, fatores específicos. Proteínas intracelulares como SKI e SNO (conhecidas como SKIL) antagonizam a transcrição iniciada pelas SMADs 2 e 3. A SMAD 7 também inibe a via TGF- β por múltiplos mecanismos como degradação do receptor T β R-I, bloqueio da formação do heterodímero SMADs 2 e 3 com SMAD 4 e inibição da fosforilação dos receptores do TGF- β . [Akhurst RJ et al., 2012].

1.3. MODELO DE FIBROSE PERITONEAL

O modelo ideal de fibrose peritoneal deve simular adequadamente a progressão da doença, bem como reproduzir seus achados histopatológicos. Neste sentido, inúmeros modelos já foram descritos, sendo que um dos mais difundidos é o que simula a fibrose peritoneal através da exposição crônica do peritônio ao gluconato de clorexidina (GC) [Hoff CM, 2005; Yoshio Y et al., 2004].

Suga e colaboradores foram os primeiros a descrever o desenvolvimento de fibrose peritoneal em ratos através da administração intermitente de GC [Suga H et al., 1995]. O modelo é essencialmente baseado na irritação química e peritonite asséptica através da injeção intraperitoneal intermitente de solução salina contendo 0,1% de gluconato de clorexidina em 15% etanol. Em teoria, o GC induz a lesão da membrana peritoneal através do rompimento das junções entre as células mesoteliais, com dano subsequente ao tecido subseroso causando uma resposta inflamatória que, quando perpetuada, leva à fibrose tecidual. Histologicamente, os animais evoluem com infiltrado inflamatório e progressivo espessamento da zona compacta submesotelial que começa a se manifestar aproximadamente 16 dias após o início da injúria. Na imunohistoquímica, evidencia-se aumento do número de vasos sanguíneos, acompanhada de uma maior expressão de VEGF na região submesotelial [Hoff CM, 2005; Yoshio Y et al., 2004; Suga H et al., 1995].

1.4. ESTRATÉGIAS PARA BLOQUEIO DA FIBROSE

1.4.1. TAMOXIFENO

O tamoxifeno pertence à classe dos trifeniletilenos. Como outras drogas desta classe (raloxifene, droloxifene, toremifene), o tamoxifeno é predominantemente um antiestrogênico. Por esta propriedade, desde 1969 o tamoxifeno vem sendo empregado no tratamento do carcinoma de mama. Contudo, diante da descrição de ações mais complexas destas drogas – com atividade pró-estrogênica em alguns tecidos e antiestrogênica em outros – esta família de drogas passou a ser classificada como moduladores seletivos dos receptores estrogênicos [Greaves P et al., 1993; Grainger DJ et al., 2005]. Kinzbrunner e colaboradores, em 1983, relataram pela primeira vez o sucesso da utilização do tamoxifeno no tratamento de tumores desmóides, caracterizados por intenso processo de fibrose [Kinzbrunner B et al., 1983]. A partir de então, foi descrito o efeito anti-fibrótico do tamoxifeno em doenças como fibrose retroperitoneal idiopática, mediastinite fibrosante e cervicite esclerosante [Özener Ç et al., 1997; Savelli BA et al., 1997].

Não obstante, o tamoxifeno também foi utilizado com sucesso no tratamento de casos de peritonite esclerosante encapsulante [Guest S, 2009]. Neste sentido, especula-se que por estimular a metaloproteinase 9 (MMP-9), que atua na degradação do colágeno tipo IV, o tamoxifeno poderia facilitar a recuperação da camada mesotelial do peritônio [Allaria PM et al., 1999; Nilsson UW et al., 2009]. Outro mecanismo possivelmente envolvido na ação anti-fibrótica do tamoxifeno é

a inibição da proteína quinase C, que tem papel essencial na proliferação celular [Savelli BA et al., 1997].

A ação anti-inflamatória do tamoxifeno ainda não foi completamente esclarecida. Dentre as ações anti-inflamatórias do tamoxifeno, destacam-se a redução dos níveis plasmáticos de marcadores positivos de fase aguda, como a proteína “C” reativa (PCR) e o fibrinogênio [Cushman M et al., 2001]. Além disso, foram apresentadas evidências de um possível efeito benéfico do tamoxifeno na prevenção da doença coronariana [Grainger DJ et al., 2005]. Ismailoglu e colaboradores demonstraram em modelo experimental de lesão da coluna vertebral que o tamoxifeno possui efeitos neuroprotetores por diminuir significativamente os níveis proteicos de TNF- α e IL-1 β na coluna vertebral [Ismailoglu O et al., 2010].

Por fim, um estudo realizado em nosso laboratório com modelo de nefropatia crônica progressiva demonstrou que o tamoxifeno foi eficaz em diminuir significativamente a quantidade de miofibroblastos no interstício renal dos animais [Dellê H et al., 2012]. Além disso, neste mesmo estudo, foi demonstrado através de Western Blot que o tamoxifeno reduziu de forma significativa a quantidade de TGF- β 1 em tecido renal, evidenciando o mecanismo de seu efeito anti-fibrótico [Dellê H et al., 2012].

1.4.2. Bone Morphogenic Protein-7 (BMP7)

Embora a BMP7 tenha sido primeiramente identificada como fator de crescimento e diferenciação do tecido ósseo em 1990 por Ozkaynak e colaboradores, outro pesquisador, Sampath encontrou evidências da presença desta proteína também no tecido renal [Ozkaynak E et al., 1990; Sampath TK et al., 1990].

Ademais, Segklia e colaboradores demonstraram que a BMP7 está envolvida no desenvolvimento e na proliferação de outro órgão além dos rins. Este grupo mostrou que esta molécula está intimamente relacionada com o crescimento e proliferação de células neurais, evidenciando seu importante papel no desenvolvimento de outras células e órgãos além dos rins [Segklia A et al., 2012]. De fato, a BMP7 desempenha um importante papel na formação e desenvolvimento e isto fica evidente no trabalho publicado por Jena e colaboradores utilizando camundongos knockout para BMP7 [Jena N et al., 1997].

Além de ter um papel fundamental no desenvolvimento renal e de outros órgãos como indutora de diferenciação de células mesenquimais, a BMP7 é abundantemente expressa em rins adultos normais, particularmente em células epiteliais tubulares e em podócitos, sugerindo um papel fisiológico ainda não esclarecido [Luo G et al., 1995; Kopp JB et al., 2000].

Desde então, diversos estudos experimentais demonstraram o papel renoprotetor da BMP7. Vukicevic e colaboradores demonstraram que a administração de BMP7 recombinante protege a morfologia e função renal contra

a lesão renal induzida no modelo experimental de isquemia-reperfusão, por diminuir a expressão de fatores pró fibróticos como TGF- β e EGF além de diminuir significativamente o número de células em apoptose no tecido renal [Vukicevic S et al., 1998]. Ainda, um estudo clássico publicado por Zeisberg e colaboradores demonstrou em um modelo experimental de DRC que um dos principais mecanismos para que o processo de EMT e fibrogênese ocorra é via TGF- β , e que a BMP7 reverte a EMT no rim por bloquear o TGF- β via SMAD 2/3 [Zeisberg M et al., 2003].

No que se refere à membrana peritoneal, Loureiro e colaboradores utilizaram um modelo experimental de diálise peritoneal para demonstrar que a BMP7 protege o peritônio contra a fibrose [Loureiro J et al., 2010]. Por outro lado, Liu e colaboradores demonstraram em modelo experimental de fibrose peritoneal e em células mesoteliais de cultura primária que durante o processo de EMT a expressão de BMP7 é suprimida através da regulação do miRNA30b [Liu H et al., 2013]. Em pacientes em diálise peritoneal ambulatorial contínua (CAPD), níveis elevados de BMP7 no dialisato foi relacionado com a melhora do transporte [Szeto CC et al., 2008].

Os mecanismos anti-fibróticos da BMP7 ainda não foram completamente elucidados e, por este motivo, as investigações sobre estes mecanismos são constantes. Neste sentido, Wang e colaboradores demonstraram que células mesangiais em cultura estimuladas com TGF- β produzem proteínas de matriz extracelular e que o tratamento das células com BMP7 diminuiu a expressão destas proteínas [Wang S et al., 2004]. Outro grupo mostrou que em modelo de

ablação renal 5/6 em ratos, um modelo amplamente utilizado para o estudo dos mecanismos envolvidos nas nefropatias crônicas progressivas, a administração de BMP7 recombinante aumenta a proliferação das células tubulares induzindo a regeneração tubular [Dube PH et al., 2004]. Na tentativa de tornar estes mecanismos mais claros, Xu e colaboradores em um estudo in vitro demonstrou que a incubação de células tubulares (linhagem HK-2) com TGF- β induz a diferenciação destas células em fibroblastos, evidenciada pela diminuição de E-caderina (marcador de célula epitelial), pelo aumento de α -actina de músculo liso (marcador de miofibroblastos) e pelo aumento de componentes de matriz extracelular, e a adição de BMP7 bloqueia este efeito desencadeado pelo TGF- β [Xu YF et al., 2009].

Apesar dos importantes achados científicos citados acima, ainda não há um estudo que mostre os efeitos do tamoxifeno da BMP7 e em um modelo experimental que associe a fibrose peritoneal com DRC. Com base nestas afirmações, o estudo destas duas moléculas pode representar um importante avanço no entendimento bem como no tratamento da fibrose peritoneal.

1.4. MODELO EXPERIMENTAL DE DRC

Yokozawa e colaboradores descreveram um modelo de insuficiência renal crônica em ratos baseado na administração de dieta rica em adenina [Yokozawa T et al., 1986]. Como demonstrado neste estudo, a administração de ração com 0,75% de adenina (320 mg/Kg/dia) por 60 dias, levou ao desenvolvimento de insuficiência renal em 100% dos animais. O desenvolvimento da insuficiência renal induzida pela adenina resulta no fato da adenina, após sua administração oral, ser imediatamente metabolizada a 2,8-Dihidroxiadenina (DHOA), composto este extremamente insolúvel, que se precipita nos túbulos renais formando cristais, os quais se depositam nas microvilosidades e região apical do epitélio tubular proximal. Portanto, além de promover a oclusão tubular, os cristais de DHOA levam à formação de granulomas nos túbulos renais, com posterior desenvolvimento de pronunciada fibrose túbulo-intersticial.

Ressalta-se o fato de que a deposição de cristais de DHOA começa a ocorrer apenas dois dias após o início da dieta à base de adenina, e as alterações renais tornam-se irreversíveis a partir da quarta semana de administração desta dieta [Yokozawa T et al., 1986].

Em termos hematológicos, os animais tratados com ração à base de adenina desenvolvem anemia grave e, quando avaliados os parâmetros bioquímicos, observa-se importante elevação dos níveis plasmáticos de uréia, creatinina e fosfatos inorgânicos, paratormônio (PTH), bem como hipocalcemia

[Yokozawa T et al., 1986; Tamagaki K et al., 2006], parâmetros estes que caracterizam o estado de uremia.

Em nosso laboratório, o modelo experimental foi amplamente estabelecido e validado, tanto em ratos como em camundongos. De fato, Santana e colaboradores publicaram um estudo em que o modelo experimental de DRC foi induzido pela dieta rica em adenina [Santana AC et al., 2013] (Figura 2). Além das alterações bioquímicas, este estudo mostrou as diversas alterações morfológicas e inflamatórias que ocorrem nos rins devido à administração de adenina na dieta [Santana AC et al., 2013]. Neste mesmo estudo, Santana AC quantificou a expressão de RNA mensageiro (mRNA) e os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 sendo que estes marcadores foram significativamente maiores no grupo que recebeu dieta com adenina em relação ao grupo controle [Santana AC et al., 2013].

Figura 2. Alterações histológicas em seções no rim de animais submetidos a dieta rica em adenina: perda de borda em escova, dilatação tubular e inflamação intersticial são evidentes; (A) Significativa dilatação tubular; (B) Note a presença de cristais de adenina nos túbulos (seta); (C) presença proeminente de fibrose intersticial [Santana AC et al., 2013].

Neste sentido, a elucidação dos mecanismos envolvidos na fibrose peritoneal bem como a análise dos fatores fibróticos e inflamatórios envolvidos na lesão peritoneal são de extrema importância para o estabelecimento de estratégias que possibilitem um tratamento efetivo para tais complicações que levam à falência da DP.

2. RACIONAL

Dentre as principais complicações da DRC, a uremia e a inflamação sistêmica, sem dúvida, merecem ser citadas. Pacientes com DRC em fase pré-dialítica já apresentam alterações morfológicas e funcionais na membrana peritoneal. Certamente, alterações e distúrbios devido a DRC não ocorrem apenas na membrana peritoneal, mas também em outros órgãos.

De fato, pacientes com DRC tem poucas alternativas de tratamento. No que se refere ao transplante renal, sem dúvida, é a melhor alternativa para os pacientes. No entanto, o primeiro problema surge com a fila de espera por um órgão viável até as complicações relacionadas com a rejeição do enxerto.

A hemodiálise é a terapia mais difundida no mundo para a substituição da função renal. Entretanto, o acesso vascular para essa terapia representa um impasse. Além disso, tal terapia tem um elevado custo não apenas com as máquinas e filtros necessários, mas com o treinamento da equipe multidisciplinar que é de fundamental importância nesta modalidade dialítica.

Contudo, a diálise peritoneal, atualmente, apresenta resultados tão eficientes quanto aos da hemodiálise. Ainda, a DP está relacionada com a preservação da função renal residual e pode oferecer ao paciente relativa qualidade de vida superior à hemodiálise. Todavia, esta modalidade também possui limitações. Com o tempo, é preciso lidar com a perda da ultrafiltração bem como infecções de repetição. Em longo prazo, uma complicação rara chamada peritonite esclerosante encapsulante pode acontecer e nestes casos, uma intervenção cirúrgica é necessária.

Estratégias que previnem, ou bloqueiem a progressão das complicações relacionadas à DP e a perda da função da membrana, são de extrema relevância.

Neste contexto, o tamoxifeno já é uma droga conhecida pelo seu potencial efeito anti-fibrótico. Como abordado anteriormente, o tamoxifeno foi utilizado com sucesso no tratamento de casos de peritonite esclerosante encapsulante e outras complicações que envolvem a formação de fibrose. Sem dúvida, estudar esta molécula em um modelo que mimetize a DRC com fibrose peritoneal, pode ajudar a elucidar alguns dos mecanismos envolvidos nesta condição clínica.

A BMP7 possui um papel fundamental no desenvolvimento renal e de outros órgãos como indutora de diferenciação de células mesenquimais. Esta molécula é abundantemente expressa em rins adultos normais, particularmente em células epiteliais tubulares e em podócitos. Estudos tem mostrado o papel da BMP7 em bloquear a progressão da fibrose em diferentes situações. O papel da BMP7 em proteger a membrana peritoneal ainda é pouco abordado. A proteína em questão foi estudada em modelos experimentais que apenas simulam a fibrose peritoneal, desconsiderando desta forma, o fator sistêmico.

Diante do exposto acima, modelos experimentais que mimetizem a situação clínica encontrada nos pacientes com DRC submetidos à DP são de suma importância. Existem diversos estudos que usam modelos experimentais que simulam apenas a fibrose ou esclerose da membrana peritoneal. Por outro lado, poucos artigos abrangem a questão da uremia associada à fibrose peritoneal em um único modelo experimental.

Portanto, o principal objetivo deste estudo foi, primeiramente, estabelecer um modelo experimental inédito que associe a DRC com uremia e a fibrose peritoneal. Além disso, analisar os efeitos e mecanismos que o tamoxifeno e a BMP7 podem ter em relação à membrana peritoneal em um ambiente urêmico com inflamação sistêmica.

3. OBJETIVOS

O objetivo central do presente estudo foi estabelecer um modelo experimental inédito de fibrose peritoneal associado à DRC com uremia e analisar o efeito do tamoxifeno e do BMP7 na prevenção da fibrose peritoneal neste modelo.

Os seguintes objetivos específicos foram delineados:

1. Estabelecer o modelo de peritonite fibrosante (induzido por GC) associado ao modelo de DRC com uremia (induzido por dieta rica em adenina);
2. Avaliação histológica do peritônio, analisando o grau de espessamento peritoneal e a fibrose da camada subserosa do peritônio (coloração com Tricrômio de Masson);
3. Análise de imunohistoquímica do peritônio para identificar e quantificar macrófagos (ED1) e linfócitos T (CD43);
4. Análise da expressão gênica e dos níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) no peritônio através de PCR em tempo real e Multiplex;
5. Análise por imunohistoquímica de miofibroblastos (α -actina) e proliferação celular (PCNA);
6. Análise da expressão fatores envolvidos na fibrogênese (colágeno III, fibronectina, TGF- β 1 e FSP-1) bem como a expressão de VEGF no peritônio através de PCR em tempo real;

7. Análise da via SMAD no processo de fibrogênese no peritônio através de PCR em tempo real para SMAD 3 bem como imunohistoquímica para SMAD 3 fosforilada;
8. Análise da função peritoneal no último dia do protocolo através de teste de ultrafiltração (UF) e massa transferida de glicose (MTG).

4. MATERIAIS e MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Para a realização do presente estudo foram utilizados 90 ratos Wistar machos pesando entre 300 e 350g. Os animais foram obtidos através do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Toda a metodologia aplicada para o estudo foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa da FMUSP (protocolo 460/11).

A primeira etapa consistiu no desenvolvimento do modelo experimental de doença renal crônica em ratos através da ingestão de dieta rica em adenina. A segunda etapa baseou-se no estabelecimento do modelo experimental de fibrose peritoneal.

4.2. MODELOS EXPERIMENTAIS

4.2.1. INDUÇÃO DA DRC EXPERIMENTAL

O modelo de DRC baseia-se na administração de dieta rica em adenina. A dieta foi fornecida aos animais em forma de ração obtida comercialmente (Rhoister, São Paulo, Brasil). A ração com adenina na concentração de 0,75% foi

administrada para os animais por 30 dias (320 mg/Kg/dia). Além disso, os animais tiveram livre acesso à dieta e à água.

4.2.2. MODELO DE FIBROSE PERITONEAL

A fibrose peritoneal foi induzida através de injeções intraperitoneais de gluconato de clorexidina (GC) a 0,1% em etanol a 15% (1ml/100g). As injeções foram aplicadas a partir do 15º dia de tratamento com a dieta rica em adenina. As injeções foram aplicadas diariamente por 2 semanas.

4.2.3. PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE FIBROSE PERITONEAL ASSOCIADO À DRC

A primeira etapa consistiu no desenvolvimento do modelo experimental de doença renal crônica através da ingestão de dieta rica em adenina. Nesta etapa os animais foram submetidos há tempos diferentes a dieta com adenina, para adequarmos melhor o nível da lesão renal, associada à taxa de mortalidade. Em um primeiro protocolo, um grupo (n=5) de animais foi submetido à dieta rica em adenina pelo período de 60 dias. Posteriormente, em um novo protocolo, os animais (n=9) receberam dieta rica em adenina 0,75% por 30 dias, e posteriormente ração normal por mais 30 dias.

A segunda etapa baseou-se no estabelecimento do modelo experimental de fibrose peritoneal. Para este modelo, foi adotado o protocolo estabelecido em estudos anteriores por Mondello e colaboradores [Mondello S et al., 2009], em

que demonstraram que injeções intraperitoneais de gluconato de clorexidina a 1% por 15 dias consecutivos promoveu o desenvolvimento de fibrose peritoneal.

4.3. ESTRATÉGIAS PARA BLOQUEIO DA FIBROSE

4.3.1. TAMOXIFENO

No 15º dia de tratamento com adenina, além de receberem injeções intraperitoneais de GC, os animais receberam tamoxifeno via gavagem na concentração única de 10mg/Kg/dia (Salutas Pharma GmbH, Barleben-Sachsen-Anhalt, Alemanha). Os comprimidos de 20mg foram diluídos em 2ml de solução fisiológica no momento da administração.

4.3.2. BMP-7

A partir do 15º dia de tratamento com adenina, os animais passaram a receber a cada 3 dias injeções intraperitoneais de BMP-7 a 30µg/Kg, sempre duas horas após a injeção de GC. A proteína foi fornecida pelo NUCEL-USP (Núcleo de Terapia Celular e Molecular da Universidade de São Paulo), chefiado pela Profa. Dra. Mari Sogayar, que está como colaboradora do presente estudo.

4.4. DESENHO DO ESTUDO e GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram formados seis grupos com 15 animais cada. Estes animais foram divididos da seguinte forma (Figura 2):

- **Grupo CONTROLE:** animais que receberam apenas dieta normal;
- **Grupo DRC:** animais que receberam dieta rica em adenina (0,75%);
- **Grupo FP:** animais que receberam injeções intraperitoneais de GC;
- **Grupo DRC/FP:** animais que receberam dieta rica em adenina + IP de GC;
- **Grupo DRC/FP+TAM:** animais com DRC e FP tratados com tamoxifeno;
- **Grupo DRC/FP+BMP7:** animais com DRC e FP tratados com BMP7;

Figura 3: Protocolo experimental

Após o período do protocolo experimental, os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal do coquetel de ketamina/xilazina (Ketamin-S, Cristália e Ronpun, Bayer, respectivamente) utilizado para indução anestésica, administrado na dose letal de 70mg/kg/12mg/kg. O peritônio e o rim esquerdo foram removidos para análise.

4.5. MÉTODOS

4.5.1. COLORAÇÃO HISTOLÓGICA

Os fragmentos de peritônio foram previamente lavados em solução fisiológica e permaneceram 45 minutos em solução de Duboscq-Brazil. Em seguida, os fragmentos foram identificados e colocados em caixetas perfuradas e mantidos em solução de formol 10% em tampão fosfato até a inclusão em blocos de parafina. Para a realização da coloração histológica, fragmentos de 4µm de espessura foram cortados e aderidos a lâminas, que passaram por um processo de desparafinização. Após 30 minutos em estufa a 60°C, as lâminas foram imersas em xilol durante 9 minutos, por 3 vezes. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos (2 vezes), em etanol 96% por 3 minutos (2 vezes) e em água destilada.

Para analisar o espessamento e o grau de fibrose na membrana peritoneal, foi empregada a técnica de Tricrômio de Masson. Após a desparafinização, as

lâminas foram incubadas em Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 3 minutos e 30 segundos, e em seguida em solução de Cromotrop (Cromotrop + Azul de Anilina + Ác. Fosfotungstico) por 25 minutos. As lâminas foram então lavadas em água destilada e imediatamente desidratadas na sequencia de banhos de etanol e xilol a partir do etanol 96%.

4.5.2. BIOQUÍMICA

4.5.2.a) Uréia

A dosagem de uréia sérica foi realizada nas amostras nos dias 01, 15 e 30 através do método de Crocker modificado (Celm, Brasil). Resumidamente, foi adicionado 20µL de amostra a 3mL do reagente de cor e 2,5mL do reagente ácido. O mesmo procedimento foi realizado com o padrão e o branco. As amostras foram vortexadas e deixadas no banho-maria por 10 minutos. Após, foram lidas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 530nm. Para obtenção do valor de uréia sérica em mg/dL os valores foram aplicados a fórmula a seguir:

$$(\text{Amostra/Padrão}) \times 50 = \text{Valor da Uréia em mg/dL}$$

4.5.2.b) Creatinina

Para a dosagem da creatinina sérica, foram colhidas amostras de sangue nos dias 0, 15 e 30 e foi utilizado um kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, Brasil), que baseia na reação de Jaffé-picrato alcalino. De forma resumida, a creatinina presente no soro reage com a solução de picrato em meio alcalino e a 37°C forma um complexo de cor amarelada, que possui absorbância a 510nm que pode ser determinada pelo espectrofotômetro (Spectronic 20 Genesys, Thermo Fisher

Scientific, Marietta, EUA). Após, é adicionado um acidificante, que consequentemente abaixa o pH para 5,0 decompondo o picrato de creatinina, porém a cor derivada dos cromógenos permanece inalterada. A absorbância é mensurada novamente através do espectrofotômetro. O valor para creatinina sérica é determinado em mg/dL através da diferença entre as duas leituras.

4.5.3. IMUNOHISTOQUÍMICA

4.5.3.a) Macrófagos e linfócitos T

Os macrófagos foram identificados no peritônio através do anticorpo monoclonal anti-monócito/macrófago de rato (anti-CD68, clone ED-1) (Serotec, Raleigh, EUA), produzido em camundongo. Para a identificação de linfócitos T foi utilizado o anticorpo de camundongo anti-linfócito T de rato (anti-CD43) (Serotec, Raleigh, EUA).

O método de imunohistoquímica utilizado para a marcação deste anticorpo foi o LSAB-AP (*Labeled Streptavidin-Biotin Alkaline Phosphatase* – Dako, Carpinteria, USA). Todo o processo foi realizado em câmara úmida.

Com o objetivo de aumentar a expressão antigênica, após a desparafinização, as lâminas foram imersas em tampão citrato 10 mM, pH=6,0 e levados em forno micro-ondas (Sanyo, São Paulo, Brasil) com potência de 2400 watts durante 15 minutos. Após atingir a temperatura ambiente as lâminas foram lavadas com água destilada para a retirada do tampão citrato e transferidas para TBS (*Tris buffered saline*, pH=7,6).

Para o bloqueio da biotina endógena os cortes foram incubados com solução de avidina D (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 minutos, sendo posteriormente lavadas com TBS durante 5 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com uma solução de biotina (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 minutos e posteriormente lavados com TBS por 5 minutos. Os cortes foram então incubados com soro de cavalo (Vector, Burlingame, EUA), diluído 70 vezes em TBS, durante 30 minutos e, após a retirada do excesso do soro, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-ED-1 (1:200) ou anti-CD43 (1:100), durante a noite, a 4°C.

No dia seguinte, os cortes foram lavados em TBS por 5 minutos e incubados com o *pool* de anticorpos biotinilados anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako, Carpinteria, USA) por 30 minutos. Após lavagem com TBS, para completar a reação, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina (Dako, Carpinteria, EUA) por 30 minutos e lavados novamente com TBS e destinados à revelação.

Para a revelação, os cortes foram incubados com uma solução contendo substrato para a enzima fosfatase e o corante fast-red (Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, EUA), preparada da seguinte maneira: 1 mg de fosfato de naftol AS-MX (Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA) foram diluídos em 100 µL de dimetilformamida (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, a solução foi diluída em 4,9 mL de tampão Tris 0,1M (pH=8,2) e 10 µL de levamisol 1M (Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA) foram acrescentados. Esta solução ficou

armazenada a -20°C e, no momento da revelação foi misturada com 5 mg do corante fast-red.

A revelação foi realizada sob microscopia em aumento de 100 X e as células positivas apresentaram coloração avermelhada. O tempo de revelação foi de aproximadamente 15 minutos. As lâminas foram contra coradas com hemalunbre de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 2 minutos, lavadas em água destilada e montadas com glicergel (Merck, Darmstadt, Alemanha).

4.5.3.b) Miofibroblastos

Para a realização da técnica de imunohistoquímica, os fragmentos de tecido aderidos às lâminas foram desparafinizados, e em seguida foram transferidas para tampão citrato 10 mM pH 6,0 e levadas ao forno de micro-ondas com potência de 2400 watts durante 15 minutos para a exposição antigênica. Ao término, as lâminas foram resfriadas lentamente até atingir a temperatura ambiente, lavadas com água destilada para a retirada do tampão citrato e transferidas para TBS.

Em seguida foi realizado o bloqueio da biotina endógena do tecido, incubando-o por 15 minutos com solução de avidina e por 15 minutos com solução de biotina (Vector, Burlingame, EUA). O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado incubando o tecido com albumina sérica bovina a 1% por 15 minutos. Os cortes foram incubados com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-alfa-actina de músculo liso (Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA), na diluição de 1:800, durante a noite, a 4°C e em câmara úmida.

A seguir, os fragmentos foram incubados com o *pool* de imunoglobulinas biotinizadas anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (LSAB Biotinylated Link Universal, Dako) por 30 minutos, seguida pela incubação com o complexo estreptavidina-biotina/fosfatase alcalina (LSAB Streptavidin-AP, Dako), por 30 minutos.

A revelação foi realizada incubando o tecido por cerca de 10 minutos em solução de substrato para fosfatase alcalina (naftol fosfato 0,54 mM, dimetilformamida 0,005%, Tris 0,098 M e levamisol 0,002M) contendo o corante fast-red a 0,01%. A contra coloração foi feita com hemalumbre de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 1 minuto. As lâminas foram montadas com glicergel (Merck, Darmstadt, Alemanha).

4.5.3.c) Atividade de proliferação celular (PCNA)

A identificação de células em proliferação foi realizada através da marcação de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen, Dako, Carpinteria, USA) utilizando o kit LSAB-HRP (*Labeled Streptavidin-Biotin Horseradish Peroxidase*). Para a realização da técnica foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-PCNA de rato produzido em camundongo (Dako, Carpinteria, USA). Após a desparafinização e recuperação de antígenos a peroxidase endógena do tecido foi bloqueada com *Peroxidase Block Solution* (Dako Co, Glostrup, Dinamarca) por 15 minutos, seguido de lavagem com TBS por 5 minutos.

A biotina endógena do tecido foi bloqueada como descrito anteriormente, e os fragmentos foram então incubados com *Protein Block Solution* (Dako Co,

Glostrup, Dinamarca) por 15 minutos para bloqueio de antígenos inespecíficos. Os fragmentos foram então incubados com o anticorpo, diluído 200 vezes em TBS durante a noite à 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em TBS por 5 minutos e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente com o *pool* de anticorpos biotinilados anti-camundongo, anti-coelho e anti-cabra (Dako, Carpinteria, USA).

As lâminas foram lavadas em TBS por 5 minutos e incubadas por 30 minutos com o complexo *Streptavidin-Biotin-HRP* do kit. As lâminas foram novamente lavadas com TBS e submetidas à revelação com *DAB⁺ Chromogen kit* (Dako, Carpinteria, USA) por 12 minutos. O tecido foi contra corado por 7 minutos em Methyl Green (Dako, Carpinteria, USA) e as lâminas foram montadas como descrito no item anterior.

4.5.3.d) Detecção de SMAD-3 fosforilada

A detecção da proteína SMAD 3 fosforilada foi realizada através do anticorpo *Rabbit anti-Smad3 fosforilada* (Abcam, EUA), utilizando o kit NovoLink (Leica Biosystems Newcastle LTDA, Reino Unido). Após a desparafinização, as lâminas foram colocadas no tampão citrato 10 mM pH 6,0 para recuperação do antígeno e levadas ao forno de micro-ondas com potência de 2400 watts durante 15 minutos para a exposição antigênica. Ao término, as lâminas foram resfriadas lentamente até atingir a temperatura ambiente, lavadas com água destilada para a retirada do tampão citrato e transferidas para TBS.

Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase por 5 minutos. Ao término, foram realizadas duas lavagens com TBS 1X por 5 minutos cada. O próximo passo foi incubação por 5 minutos também com Protein Block pertencente ao kit. A lavagem com TBS 1X foi realizada novamente por duas vezes para posterior incubação *overnight* a 4°C com o anticorpo anti-SMAD 3 fosforilada na diluição 1:1000.

No outro dia, as lâminas foram lavadas duas vezes no TBS 1X por 5 minutos. Após foram incubadas com bloqueio pós-primário por 30 minutos, seguido por lavagens com TBS 1X novamente. Em seguida foi realizada a incubação com polímero por 30 minutos. Após a última incubação as lâminas foram lavadas mais duas vezes com TBS 1X por 5 minutos.

Por fim, foi realizada a revelação com AEC (Aminoetilcarbazol) por 6 minutos e contra coloração com banho na hemalunbre de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) e montadas com glicergel (Merck, Darmstadt, Alemanha).

4.5.4. PCR EM TEMPO REAL

4.5.4.a) Extração de RNA

Todas as soluções utilizadas para a extração de RNA foram feitas com água deionizada através do sistema Milli-Q (Millipore, Milli-Q Element A10 System, Massachusetts, EUA) e tratada com dietilpirocarbonato (Sigma, St. Louis, EUA). Para cada litro de água deionizada, foram adicionados 1,0 mL de dietilpirocarbonato e a solução foi mantida a 60°C sob agitação por aproximadamente 12 horas, sendo em seguida autoclavada (121°C por 20 minutos). RNA total foi extraído da membrana peritoneal com o reagente Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA), seguindo-se o protocolo sugerido pelo fabricante. Cada 100 mg de tecido foi homogenizado com 1 mL de Trizol com auxílio de um dispersador de tecidos (IKA – Labortechnik Ultra Turrax T25 Janke & Kunkel, Alemanha). A cada mL de homogenato, foram adicionados 200µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha), a mistura foi novamente homogeneizada e mantida por 3 minutos a temperatura ambiente.

Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 12.000 g a 4°C por 20 minutos. A fase superior contendo RNA foi transferida para um microtubo de 2 mL contendo o mesmo volume de isopropanol gelado (Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA). As amostras foram centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, o pellet de RNA foi ressuspensionado em 1 mL de etanol 70% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e centrifugado novamente a 12.000g por 10 minutos. Este procedimento foi repetido e o pellet foi resuspensionado com 50µL de água previamente tratada com dietilpirocarbonato.

A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Marietta, EUA) medindo-se absorvância nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Foi feito o cálculo da concentração de RNA expresso em $\mu\text{g/mL}$ a partir da absorvância a 260 nm. A leitura de 1 OD corresponde a uma solução pura de RNA em fita-simples na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$. A leitura a 280 nm foi utilizada para determinar a contaminação das amostras com proteínas. A análise foi feita baseando-se na razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm e o valor aceitável foi de 1,7 a 2,0.

4.5.4.b) Síntese de cDNA

Todos reagentes utilizados para a reação de síntese do DNA complementar (cDNA) foram da marca Promega (Promega, San Luis Obispo, EUA). Um microlitro de *oligo dT primer* (500 $\mu\text{g/mL}$) foi misturado a 11 μL de uma solução de RNA a 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$. A solução foi aquecida a 70°C por 10 minutos e resfriada em gelo por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado 4 μL de tampão [5X] (Tris-HCl 250 mM pH=8,3, KCL 375 mM, MgCl_2 15 mM) , 2 μL de DTT 0,1M, 1 μL de dNTP Mix (10mM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e 1 μL (200u) da enzima transcriptase reversa M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*). A reação foi realizada a 42°C por 50 minutos, passando posteriormente por um período de 15 minutos a 70°C para a inativação da enzima. O cDNA foi mantido em freezer a – 20°C até a realização da reação de PCR em tempo real.

Para esta etapa foram confeccionados pares de primers para a obtenção de amplicons com no máximo 250 pb, conforme a recomendação para PCR em tempo real. Os primers utilizados estão representados na tabela 1.

Para a PCR em tempo real foi utilizado o kit SYBR GreenEr qPCR SuperMix Universal (Invitrogen, Califórnia, EUA). Um microlitro de cDNA foi acrescido a 7,5 µL de mix do kit, 0,6 µL de primer forward (10 µM), 0,6 µL de primer reverse (10 µM), 5,75 µL de água deionizada e 0,15 µL de Rox. Todas as reações foram realizadas em triplicatas. A mistura foi aquecida a 50°C por 10 minutos e depois a 95°C por 5 minutos, seguindo 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A curva de melting foi feita à 65°C com variação de 1°C.

O equipamento utilizado foi o *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Singapura). A expressão gênica foi determinada como a expressão relativa entre o gene alvo e o gene *housekeeping* β-actina, calculadas pelo *software* do aparelho *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Singapura), a partir dos *cycle threshold* (CT) das reações.

Tabela 1. Primers utilizados para os experimentos de PCR em tempo real

Gene alvo	Primers
β -Actina	Sense 5' AGGAGTACGATGAGTCCGGCCC 3' Antisense 5' GCAGCTCAGTAACAGTCCGCCT3'
IL-1 β	Sense 5'CCTTGTGCAAGTGTCTGAAGCAGC3' Antisense 5'GCCACAGCTTCTCCACAGCCA3'
IL-6	Sense 5'CCGGAGAGGAGACTTCACAGAGGA3' Antisense 5'AGCCTCCGACTTGTGAAGTGGTATA3'
TNF- α	Sense 5'TGGCCCAGACCCTCACACTCA3' Antisense 5'GGCTCAGCCACTCCAGCTGC3'
Colágeno III	Sense 5'TCCTGGCTCCCCTGGAATCTGTGAA3' Antisense 5'CTGGAGGGCCTGGTGGACCAG3'
Fibronectina	Sense 5'TGACCCAGACTTACGGTGGCA3' Antisense 5'GGAGTAGAAGGTCCTACCGTTGTAGTG3'
TGF- β	Sense 5'CAACCCGGGTGCTTCCGCAT3' Antisense 5'TGCTCCACCTTGGGCTTGCG3'
VEGF	Sense 5'ACTGTGAGCCTTGTTTCAGAGCGG3' Antisense 5'TCAAGCTGCCTCGCCTTGCA3'
FSP-1	Sense 5'GGCAACGAGGGTGACAAGTT3' Antisense 5'CCCTGGTCAGTAGTCCCTTGA3'
SMAD 3	Sense 5'TCAACGGAACCTTGGGAATGAG3' Antisense 5'GTAGTGCGGAGCTCTCCTTCA3'
SMAD 7	Sense 5'CCTGGCCGGTGTAATGTCT3' Antisense 5'GCGGATCCCTTGGAAAGG3'

4.5.5. ANÁLISE DE CITOCINAS POR MULTIPLEX

A quantificação das citocinas foi realizada através do método multiplex/luminex com o kit MILLIPLEX[®] MAP (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). O ensaio foi realizado no fragmento de peritônio dos animais. Foi utilizado o painel *Rat* (cytokine/chemokine - immunoassay), composto por anticorpos para quantificar as seguintes citocinas: TNF- α , IL-1 β e IL-6. Todo o ensaio foi desenvolvido de acordo com o protocolo do fabricante.

Inicialmente, para a extração da proteína total, o fragmento de peritônio foi pulverizado em pistilo de vidro contendo nitrogênio líquido e ressuspenso em 1mL de tampão de lise de proteína (RIPA *Buffer*, Millipore[®]) juntamente com o inibidor de protease. Em seguida, as amostras foram deixadas em repouso por 30 minutos a 4°C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então coletado e acondicionado a -80°C até o momento das dosagens. O filtro da placa contendo 96 poços foi lavado com *Bioplex Wash Buffer*. Em seguida, foram adicionadas *beads* conjugadas com os anticorpos anti-citocinas e lavados com *Bioplex Wash Buffer*, sendo posteriormente adicionadas as amostras preparadas previamente.

As amostras permaneceram então incubadas por 2 horas e, posteriormente, foram novamente lavadas com *Bioplex Wash Buffer*. Em seguida, foi adicionado em cada poço anticorpo biotinilado e incubados por 1 hora. Novas lavagens foram realizadas com *Bioplex Wash Buffer*. Foi utilizado o *Software Bio-Plex Manager*, versão 4.0 (Bio-Rad) para análise dos resultados no sistema *Bioplex Suspension Array System/Luminex* (Bio-Rad).

4.5.6. TESTE DE FUNÇÃO PERITONEAL

4.5.6.a) Ultrafiltração (UF)

No último dia de protocolo, antes da eutanásia, foi infundida solução de diálise a 4,25% de glicose (Baxter, Dianeal PD-2), na dose de 0,09ml/g de peso via intraperitoneal com permanência na cavidade por 2 horas. Após este período, os animais foram anestesiados e foi realizada a drenagem do dialisato. As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos e depois o volume drenado foi quantificado e a seguinte fórmula foi aplicada: (volume drenado) – (volume infundido)

4.5.6.b) Massa transferida de glicose (MTG)

Logo depois de realizar o procedimento descrito acima, o dialisato foi armazenado e posteriormente a concentração de glicose foi analisada utilizando o aparelho Cobas C111 analyzer (Roche, Indianapolis, EUA).

A massa de transferência de glicose foi calculada usando a seguinte fórmula: (glicose no dialisato inicial X volume inicial) – (glicose no dialisato final X volume final).

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise foi baseada na comparação de grupos, utilizando para os cálculos o software GraphPad Prism versão 5.01 (Graphpad Software, La Jolla, EUA). Inicialmente as diversas variáveis foram testadas para normalidade e então o teste ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls foi aplicado. Em relação aos resultados de PCR em tempo real, após a obtenção dos valores de *cicle trashold* (CT) de cada amostra referente ao gene alvo, foi determinado a diferença de CT entre o gene constitutivo e o gene de interesse. Após, foi realizada a normalização destes valores sendo que para o resultado final é calculado o logaritmo da média dos valores normalizado. O desvio padrão foi calculado a partir dos valores normalizados de CT. Todos os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão. A significância estatística foi considerada a partir do $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. PADRONIZAÇÃO DOS MODELOS

No modelo experimental utilizado no estudo, associou-se modelo de DRC com uremia com o modelo de fibrose peritoneal. Durante o processo de padronização, a maior dificuldade encontrada foi estabelecer o tempo da administração da adenina necessário para induzir lesão renal característica da doença renal crônica com uremia, sem proporcionar altas taxas de mortalidade.

Durante o desenvolvimento do modelo experimental de fibrose peritoneal, a dificuldade encontrada foi definir o melhor momento do modelo de doença renal crônica para iniciar as injeções de gluconato de clorexidina.

Assim, após a realização de alguns pilotos e análise dos resultados observados a seguir, estabeleceu-se que para o desenvolvimento da doença renal crônica, a dieta rica em adenina seria administrada por 30 dias, dando início às injeções diárias de gluconato de clorexidina a partir do 15º dia para desencadear a fibrose peritoneal.

5.1.1. Modelo de doença renal crônica com uremia

A doença renal crônica foi induzida através da dieta rica em adenina (0,75%). A adenina é absorvida imediatamente no intestino e posteriormente metabolizada em 2,8-dihidroxiadenina (DHOA).

5.1.1.a Piloto 1

Após o 30º dia houve alta mortalidade dos animais, sobrevivendo apenas um animal até o 60º dia. Portanto, o protocolo mostrou-se inadequado devido à alta mortalidade dos animais.

5.1.1.b Piloto 2

Ao término dos 30 dias de dieta rica em adenina, os animais apresentaram uma diminuição significativa de peso corpóreo (212 ± 13 g vs. 330 ± 5 g no dia 1; $p < 0,0001$) (Figura 4A). Neste mesmo período, houve um aumento significativo da pressão arterial sistólica (170 ± 4 mmHg no dia 30 vs. 135 ± 15 mmHg no dia 1; $p < 0,01$) (Figura 4B), um aumento significativo dos níveis séricos de uréia (375 ± 27 mg/dL no dia 30 vs. 44 ± 4 mg/dL no dia 1; $p < 0,0001$) (Figura 4C) e creatinina ($2,92$ mg/dL no dia 30 vs. $0,47 \pm 0,06$ mg/dL no dia 1; $p < 0,001$) (Figura 4D). No entanto, no período com dieta normal que começou a partir do dia 30, foi possível perceber que os animais ganharam peso (258 ± 10 g; $p < 0,05$ vs. dia 30) (Figura 4A), mantiveram-se hipertensos (165 ± 5 mmHg) (Figura 4B) e apresentaram níveis séricos de uréia e creatinina significativamente diminuídos em relação ao dia 30 (236 ± 24 mg/dL e $1,62 \pm 0,18$ mg/dL, respectivamente; $p < 0,01$) (Figuras 4C e 4D).

Com 30 dias da administração da ração rica em adenina foi possível observar por cortes histológicos, dilatação tubular, fibrose intersticial e formação de cristais de adenina (Figuras 5A e 5B).

Figura 4: Resultados do piloto 2. Os gráficos apresentam a evolução do (A) Peso corpóreo (g); (B) PA (mmHg); (C) Creatinina sérica (mg/dL) e (D) Uréia sérica (mg/dL).nos dias 0, 15, 30 e 45 após o início do protocolo.

Figura 5: Histologia renal do modelo adenina padronizado. (A) Rim de animal que recebeu ração normal por 30 dias e (B) Rim de animal de recebeu dieta rica em adenina por 30 dias. Nota-se, dentre outras alterações, a presença de dilatação tubular (cruz) e cristais de adenina intratubulares (seta).

5.1.2. Modelo de fibrose peritoneal

A fibrose peritoneal nos animais foi induzida através de injeções intraperitoneais de GC a 0,1%, que conseqüentemente ocasionam irritação química e peritonite asséptica. O gluconato de clorexidina desencadeia a lesão da membrana peritoneal através do rompimento das junções entre células mesoteliais, com conseqüente dano ao tecido subseroso culminando com um infiltrado inflamatório local e progressivo espessamento da zona compacta submesotelial.

Os animais submetidos às injeções de GC a 0,1% diluído em etanol a 15% por 15 dias consecutivos apresentaram infiltrado inflamatório e espessamento da membrana peritoneal, mostrando esse ser um excelente modelo experimental para análise da fibrose peritoneal (Figura 6A e 6B).

Figura 6: Cortes histológicos de peritônio do modelo de FP padronizado: (A) Peritônio de animal normal e (B) Peritônio de animal que recebeu injeções de GC por 15 dias (400X).

5.2. PESO CORPÓREO

Todos os animais apresentaram peso corpóreo semelhante no início do protocolo (média de 319g no dia 0) (Tabela 2). Ao longo do estudo, tanto no grupo CONTROLE quanto no grupo FP houve um aumento significativo do peso (Tabela 2). Entretanto, nos demais grupos houve uma redução significativa do peso tanto no dia 15 quanto no dia 30 em relação ao dia 0 (Tabela 2). Além disso, nos dias 15 e 30, o peso corpóreo dos animais dos grupos DRC, DRC/FP, DRC/FP+TAM e DRC/FP+BMP7 foi significativamente menor em relação aos grupos CONTROLE e FP. Não houve diferença significativa em relação aos tratamentos.

Tabela 2. Peso corpóreo grupos do estudo nos dia 0, 15 e 30.

Grupos	dia 0 (g)	dia 15 (g)	dia 30 (g)
CONTROLE	334 ± 4	362 ± 4^ψ	429 ± 5^{ψφ}
FP	319 ± 6	362 ± 8^ψ	361 ± 8^{ψ e}
DRC	321 ± 5	297 ± 5^{ψ a c}	239 ± 8^{ψφ eg}
DRC/FP	312 ± 5	267 ± 3^{ψ a b}	243 ± 10^{ψ eg}
DRC/FP+TAM	320 ± 9	263 ± 8^{ψ a b c}	226 ± 11^{ψφ eg}
DRC/FP+BMP7	312 ± 4	253 ± 5^{ψ a b c}	231 ± 6^{ψ eg}

^ψ p<0,01 vs dia 0

^φ p<0,01 vs dia 15

^a p<0,01 vs CONTROLE no dia 15

^b p<0,01 vs DRC no dia 15

^c p<0,01 vs FP no dia 15

^e p<0,01 vs CONTROLE no dia 30

^g p<0,01 vs FP no dia 30

5.3. PRESSÃO ARTERIAL

Os animais dos seis grupos estudados apresentaram valores semelhantes de pressão arterial no dia 0 do protocolo de estudo (Tabela 3). Com 15 dias de administração de adenina, os animais apresentaram níveis significativamente elevados da PA (Tabela 3). Após 30 dias de dieta, os animais mantiveram elevados níveis de PA e os tratamentos com tamoxifeno e BMP7 não influenciaram significativamente (Tabela 3).

Tabela 3. Pressão arterial nos grupos do estudo nos dias 0, 15 e 30.

Grupos	dia 0 (mmHg)	dia 15 (mmHg)	dia 30 (mmHg)
CONTROLE	120 ± 4	126 ± 4	123 ± 3
FP	122 ± 8	128 ± 12	131 ± 6
DRC	129 ± 2	170 ± 4^{ψ a c}	174 ± 6^{ψ e g}
DRC/FP	126 ± 3	178 ± 9^{ψ a c}	169 ± 4^{ψ e g}
DRC/FP+TAM	128 ± 2	176 ± 5^{ψ a c}	166 ± 3^{ψ e g}
DRC/FP+BMP7	129 ± 3	167 ± 5^{ψ a c}	180 ± 7^{ψ e g}

^ψ p<0,01 vs dia 0

^a p<0,01 vs CONTROLE no dia 15

^c p<0,01 vs FP no dia 15

^e p<0,01 vs CONTROLE no dia 30

^g p<0,01 vs FP no dia 30

5.4. MORTALIDADE

Nenhum animal dos grupos CONTROLE e FP foram a óbito. Contudo, houve mortalidade nos grupos DRC e DRC/FP. De fato, no grupo DRC, do total de 15 animais, 4 faleceram durante o protocolo, representando mortalidade de 26,6% neste grupo. O grupo DRC/FP também apresentou mortalidade totalizando 5 óbitos dos 15 animais para este grupo. Este número representa mortalidade de 33,3% dentro do grupo DRC/FP.

Por outro lado, não houve mortalidade nos grupos tratados com TAM e BMP7 durante o protocolo de estudo.

5.5. BIOQUÍMICA

5.5.1. Uréia sérica

Os animais de todos os grupos apresentaram valores de uréia sérica semelhante no início do experimento (dia 0) (Tabela 4). Todavia, no dia 15, os animais dos grupos DRC, DRC/FP, DRC/FP+TAM e DRC/FP+BMP7 apresentaram elevação dos níveis séricos de uréia 0 (Tabela 4). No dia 30, houve um aumento significativo dos níveis séricos de uréia nos animais dos grupos DRC, DRC/FP, DRC/FP+TAM e DRC/FP+BMP7 comparados com o dia 15 do protocolo (Tabela 4). Os tratamentos não influenciaram este parâmetro (Tabela 4).

Tabela 4. Uréia sérica nos grupos do estudo nos dias 0, 15 e 30.

Grupos	dia 0 (mg/dL)	dia 15 (mg/dL)	dia 30 (mg/dL)
CONTROLE	48 ± 3	41 ± 3	45 ± 5
FP	42 ± 2	39 ± 1	35 ± 2
DRC	44 ± 3	167 ± 18^{ψ a c}	287 ± 37^{ψ φ e g}
DRC/FP	39 ± 2	171 ± 21^{ψ a c}	266 ± 36^{ψ φ e g}
DRC/FP+TAM	38 ± 4	166 ± 10^{ψ a c}	332 ± 27^{ψ φ e g}
DRC/FP+BMP7	51 ± 7	176 ± 22^{ψ a c}	260 ± 18^{ψ φ e g}

^ψ p<0,01 vs dia 0

^φ p<0,01 vs dia 15

^a p<0,01 vs CONTROLE no dia 15

^c p<0,01 vs FP no dia 15

^e p<0,01 vs CONTROLE no dia 30

^g p<0,01 vs FP no dia 30

5.5.2. Creatinina sérica

Quinze dias após a administração de dieta rica em adenina, os animais dos grupos DRC, DRC/FP, DRC/FP+TAM e DRC/FP+BMP7 apresentaram valores significativamente elevados de creatinina sérica (Tabela 5). O aumento da creatinina sérica foi ainda maior 30 dias da ingestão da dieta rica em adenina quando comparado ao dia 0 e dia 15 (Tabela 5). O tratamento com tamoxifeno ou BMP7 não teve influencia nos níveis séricos de creatinina (Tabela 5).

Tabela 5. Creatinina sérica nos grupos do estudo nos dias 0, 15 e 30.

Grupos	dia 0 (mg/dL)	dia 15 (mg/dL)	dia 30 (mg/dL)
CONTROLE	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1
FP	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1
DRC	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1^{ψ a c}	1,8 ± 0,1^{ψ φ e g}
DRC/FP	0,3 ± 0,1	1,1 ± 0,4^{ψ a c}	2,1 ± 0,6^{ψ φ e g}
DRC/FP+TAM	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1^{ψ a c}	1,7 ± 0,1^{ψ φ e g}
DRC/FP+BMP7	0,4 ± 0,0	1,2 ± 0,1^{ψ a c}	1,7 ± 0,1^{ψ φ e g}

^ψ p<0,01 vs dia 0

^φ p<0,01 vs dia 15

^a p<0,01 vs CONTROLE no dia 15

^c p<0,01 vs FP no dia 15

^e p<0,01 vs CONTROLE no dia 30

^g p<0,01 vs FP no dia 30

5.6. HISTOMORFOMETRIA – ESPESSURA PERITONEAL

Nos animais do grupo CONTROLE, a membrana peritoneal estava preservada, como esperado. O grupo DRC, não apresentou alterações morfológicas em sua membrana. Entretanto, os animais do grupo FP e DRC/FP apresentaram um significativo espessamento da membrana peritoneal quando comparado aos grupos CONTROLE e DRC. Os animais tratados com TAM e BMP7 apresentaram uma diminuição significativa da espessura peritoneal. (Figuras 7 e 8 e Tabela 6).

Figura 7: Espessura média da membrana peritoneal dos animais dos diferentes grupos do estudo após 30 dias.

Figura 8: Imagem representativa da espessura da membrana peritoneal. Cortes histológicos do peritônio de animais dos grupos: **(A)** CONTROLE; **(B)** DRC; **(C)** FP; **(D)** DRC/FP; **(E)** DRC/FP+TAM e **(F)** DRC/FP+BMP7. Aumento de 200X.

Tabela 6. Características da membrana peritoneal dos animais no dia 30: espessura, presença de macrófagos (ED1⁺), de linfócitos T (CD43⁺), de miofibroblastos (α -SMA) e proliferação celular (PCNA).

Grupos	Espessura μm	ED1⁺ célis/mm ²	CD43⁺ célis/mm ²	α-SMA % área	PCNA célis/mm ²
CONTROLE	36 $\pm$ 2	199 $\pm$ 75	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
DRC	27 $\pm$ 6	229 $\pm$ 46	11 $\pm$ 4	2 $\pm$ 1	25 $\pm$ 8
FP	130 $\pm$ 33^{*§}	688 $\pm$ 80^{*§}	30 $\pm$ 14[*]	5 $\pm$ 0,1^{*§}	291 $\pm$ 13^{*§}
DRC/FP	132 $\pm$ 26^{*§}	1211 $\pm$ 233^{*§#}	182 $\pm$ 53^{*§#}	7 $\pm$ 1^{*§}	325 $\pm$ 44^{*§}
DRC/FP+TAM	42 $\pm$ 2^{#†}	337 $\pm$ 48^{#†&}	8 $\pm$ 4^{†&}	0,6 $\pm$ 0,1^{#†}	175 $\pm$ 38^{*§#†}
DRC/FP+BMP7	53 $\pm$ 7^{#†}	658 $\pm$ 35^{*#†}	70 $\pm$ 19^{*†}	0,7 $\pm$ 0,1^{#†}	181 $\pm$ 32^{*§#†}

*p<0,01 vs CONTROLE;

§p<0,01 vs DRC;

#p<0,01 vs FP;

†p<0,01 vs DRC/FP;

&p<0,01 vs DRC/FP+BMP7.

5.7. ESTUDO DO PERFIL INFLAMATÓRIO

5.7.1. Imunohistoquímica para Macrófagos

No grupo FP houve um aumento significativo de macrófagos no peritônio em comparação aos grupos CONTROLE e DRC. Entretanto, o grupo DRC/FP apresentou um significativo infiltrado inflamatório no peritônio (Figura 10D) (Tabela 6). Os tratamentos com TAM e BMP7 diminuíram este infiltrado inflamatório de forma significativa. Cabe salientar que o tamoxifeno foi significativamente mais eficaz em proteger o peritônio contra o infiltrado inflamatório do que o BMP7. (Figuras 9 e 10) (Tabela 6).

Figura 9: Quantificação do infiltrado de macrófagos (ED-1⁺) na membrana peritoneal nos diferentes grupos estudados.

Figura 10: Imunohistoquímica para detecção de macrófagos (ED-1⁺) no peritônio de animais dos grupos (A) CONTROLE; (B) DRC; (C) FP; (D) DRC/FP; (E) DRC/FP+TAM e (F) DRC/FP+BMP7. Aumento de 200X.

5.7.2. Imunohistoquímica para Linfócitos

Os animais do grupo DRC apresentaram um aumento do número de linfócitos T no peritônio, porém, este aumento não foi significativo quando comparado ao grupo CONTROLE. Os animais do grupo FP apresentaram significativa presença de células inflamatórias em comparação ao grupo CONTROLE. Contudo, os animais do grupo DRC/FP apresentaram um significativo infiltrado inflamatório de células T em comparação aos grupos CONTROLE, DRC e FP. Em contrapartida, nos grupos TAM e BMP7, os tratamentos foram eficazes em proteger o peritônio contra os linfócitos T (Figuras 11 e 12 e Tabela 6).

Figura 11: Quantificação do infiltrado de linfócitos (CD43⁺) na membrana peritoneal nos diferentes grupos estudados.

Figura 12: Imunohistoquímica para detecção de linfócitos (CD43⁺) no peritônio de animais dos grupos (A) CONTROLE; (B) DRC; (C) FP; (D) DRC/FP; (E) DRC/FP+TAM e (F) DRC/FP+BMP7. Aumento de 200X.

5.7.3. PCR em Tempo Real e ensaio multiplex para perfil pró-inflamatório

5.7.3.a) *TNF- α*

Os grupos DRC e FP apresentaram uma expressão significativamente maior de $TNF-\alpha$ em relação ao grupo CONTROLE, sendo marcante no grupo DRC/FP. Os tratamentos reduziram a expressão de $TNF-\alpha$, sendo que o tratamento com tamoxifeno foi o mais efetivo para bloquear a expressão de $TNF-\alpha$ (Figura 13A e Tabela 7).

A análise por Multiplex, que avaliou a presença da proteína $TNF-\alpha$ no peritônio, revelou um perfil semelhante ao detectado por RNA, porém em níveis mais baixos (Figura 13B e Tabela 7).

Figura 13: Expressão relativa (A) e concentração proteica (B) de $TNF-\alpha$, no peritônio dos grupos estudados.

5.7.3.b) *IL - 1 β*

A expressão de IL-1 β foi significativamente maior nos grupos DRC e FP em relação ao grupo CONTROLE. No entanto, o maior aumento da expressão desta citocina foi observado nos animais do grupo DRC/FP. Já os animais tratados com tamoxifeno e BMP7 diminuíram significativamente a expressão de IL-1 β em relação ao grupo DRC/FP (Figura 14A e Tabela 7).

A expressão proteica de IL-1 β detectada no peritônio foi marcante nos grupos DRC e DRC/FP, além de significativa também no grupo FP. Os tratamentos foram eficazes em diminuir a síntese desta proteína em relação aos grupos DRC, FP e DRC/FP. (Figura 14B e Tabela 7).

Figura 14: Expressão relativa (A) e concentração proteica (B) de IL-1 β no peritônio dos grupos estudados.

5.7.3.c) *IL-6*

Houve diferença significativa entre os grupos DRC e FP referente a expressão de IL-6 sendo mais evidente no grupo DRC/FP em relação ao grupo CONTROLE. Contudo, os animais tratados com tamoxifeno e BMP7 diminuíram de forma significativa a expressão gênica de IL-6 no peritônio em relação ao grupo DRC/FP. (Figura 15A e Tabela 7).

O nível proteico de IL-6 foi significativamente maior no grupo DRC em relação ao grupo CONTROLE. Embora houvesse uma tendência no aumento da síntese desta proteína nos grupos FP e DRC/FP, esta diferença não foi significativa. Os grupos que receberam tamoxifeno e BMP7 não diminuíram os níveis desta proteína no peritônio. (Figura 15B e Tabela 7).

Figura 15: Expressão relativa (A) e concentração proteica (B) de IL-6 no peritônio dos grupos estudados.

Tabela 7. Expressão gênica e concentração proteica das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 no peritônio.

Grupos	TNF-α		IL-1β		IL-6	
	expressão relativa	pg/ml	expressão relativa	pg/ml	expressão relativa	pg/ml
CONTROLE	1 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0,4	13 $\pm$ 2	1 $\pm$ 0,5	4 $\pm$ 1
DRC	2,5 $\pm$ 0,6[*]	12 $\pm$ 1[*]	5,1 $\pm$ 0,1[*]	107 $\pm$ 12^{*#}	2,2 $\pm$ 0,1[*]	40 $\pm$ 9[*]
FP	3,2 $\pm$ 0,4[*]	11 $\pm$ 1,3[*]	5,7 $\pm$ 0,7[*]	56 $\pm$ 8[*]	2,6 $\pm$ 0,4[*]	29 $\pm$ 11
DRC/FP	10 $\pm$ 0,5^{*\$#}	11 $\pm$ 1,2[*]	22,5 $\pm$ 2,9^{*\$#}	118 $\pm$ 3^{*#}	11,1 $\pm$ 0,7^{*\$#}	20 $\pm$ 4
DRC/FP+TAM	2,3 $\pm$ 0,9^{†&}	1,3 $\pm$ 0,2^{\$#†}	4,6 $\pm$ 0,8^{*†}	32 $\pm$ 8^{\$#†}	2,6 $\pm$ 0,8[†]	32 $\pm$ 9[*]
DRC/FP+BMP7	4,9 $\pm$ 0,5^{*\$#†}	3 $\pm$ 1,8^{\$#†}	4,7 $\pm$ 0,5^{*†}	28 $\pm$ 2^{\$#†}	1,2 $\pm$ 0,3[†]	43 $\pm$ 23

*p<0,01 vs CONTROLE

\$p<0,01 vs DRC

#p<0,01 vs FP

†p<0,01 vs DRC/FP

&p<0,01 vs DRC/FP+BMP7

5.8. ESTUDO DO PERFIL FIBRÓTICO

5.8.1. Imunohistoquímica para Miofibroblastos

Os animais do grupo CONTROLE apresentaram pouca marcação para α -actina no peritônio, enquanto que os animais do grupo DRC e FP apresentaram aumento da expressão de α -actina, sendo que apenas o grupo FP foi significativo em relação ao grupo CONTROLE. Por outro lado, os animais do grupo DRC/FP apresentaram um aumento significativo de miofibroblastos na membrana peritoneal. O tratamento com tamoxifeno e BMP7 diminuiu a marcação de α -actina no peritônio em comparação aos grupos FP e DRC/FP de forma significativa, refletindo numa diminuição do número de miofibroblastos neste compartimento. (Figuras 16 e 17 e Tabela 6).

Figura 16: Quantificação α -actina presente na membrana peritoneal nos diferentes grupos estudados.

Figura 17: Imunohistoquímica para detecção de miofibroblastos (α -actina) no peritônio de animais dos grupos (A) CONTROLE; (B) DRC; (C) FP; (D) DRC/FP; (E) DRC/FP+TAM e (F) DRC/FP+BMP7. Aumento de 200X

5.8.2. Imunohistoquímica para PCNA

Os animais do grupo DRC apresentaram um discreto, não significativo, aumento da proliferação celular na membrana peritoneal. Por outro lado, os animais dos grupos FP e DRC/FP apresentaram um aumento significativo da atividade proliferativa quando comparados com o grupo CONTROLE e DRC. O tratamento com tamoxifeno e BMP7 foram eficazes em reduzir a proliferação celular de forma significativa em relação aos grupos FP e DRC/FP. (Figuras 18 e 19 e Tabela 6).

Figura 18: Quantificação das células em proliferação (PCNA) na membrana peritoneal nos diferentes grupos estudados.

Figura 19: Imunohistoquímica para detecção de células em proliferação (PCNA) no peritônio de animais dos grupos (A) CONTROLE; (B) DRC; (C) FP; (D) DRC/FP; (E) DRC/FP+TAM e (F) DRC/FP+BMP7.

5.8.3. PCR em Tempo Real para perfil fibrótico

5.8.3.a) Colágeno III

No grupo CONTROLE e DRC houve apenas expressão basal deste gene (Figura 20). No entanto, nos grupos FP e DRC/FP houve um aumento significativo da expressão de colágeno III em comparação com os grupos CONTROLE e DRC, sendo que o aumento no grupo DRC/FP foi significativamente maior do que o grupo que recebeu somente injeções intraperitoneais de GC. O tamoxifeno diminuiu significativamente a expressão de colágeno III quando comparado ao grupo DRC/FP. Já a BMP7 foi eficaz em diminuir a expressão deste gene no peritônio de forma significativa em comparação ao grupo FP e DRC/FP. (Figura 20 e Tabela 9).

Figura 20: Expressão de colágeno III no peritônio dos grupos estudados.

5.8.3.b) Fibronectina

No grupo DRC, a expressão de fibronectina no peritônio foi significativamente maior do que no grupo CONTROLE. No grupo FP, a expressão de fibronectina foi significativamente maior do que nos grupos CONTROLE e DRC. No entanto, a maior expressão de fibronectina foi observada no grupo DRC/FP, cuja expressão deste gene foi significativamente maior do que os grupos CONTROLE, DRC e FP. Os tratamentos com tamoxifeno ou BMP7 diminuíram a expressão de fibronectina de forma significativa quando comparados ao grupo DRC/FP. Além disso, foi possível observar que o grupo tratado com tamoxifeno apresentou uma menor expressão de fibronectina do que os animais tratados com BMP7 (Figura 21 e Tabela 9).

Figura 21: Expressão de fibronectina no peritônio dos grupos estudados.

5.8.3.c) VEGF

A expressão de VEGF no grupo FP foi significativamente maior em relação aos grupos CONTROLE e DRC. No entanto, um aumento mais relevante foi detectado no grupo DRC/FP. Porém, os animais tratados com tamoxifeno e BMP7 diminuíram significativamente a expressão de VEGF no peritônio. (Figura 22 e Tabela 8).

Tabela 8. Expressão de VEGF no peritônio dos grupos estudados.

Grupos	VEGF (expressão relativa)
CONTROLE	1 ± 0,2
DRC	2,7 ± 1,1
FP	4 ± 0,4 [*]
DRC/FP	5,6 ± 1,1 ^{*\$#}
DRC/FP+TAM	1,3 ± 0,6 ^{#†}
DRC/FP+BMP7	0,9 ± 0,5 ^{#†}

* p<0,01 vs CONTROLE; \$ p<0,01 vs DRC; # p<0,01 vs FP; † p<0,01 vs DRC/FP;

Figura 22: Expressão de VEGF no peritônio dos grupos estudados

5.8.3.d) FSP-1

Não houve diferença estatística entre os grupos CONTROLE e DRC referente à expressão deste gene. No grupo FP o aumento da expressão deste gene foi significante em comparação ao grupo CONTROLE. Entretanto, no grupo DRC/FP, a expressão de FSP-1 no peritônio foi significativamente maior em relação aos grupos CONTROLE, DRC e FP. Os tratamentos (tamoxifeno e BMP7) foram eficazes em diminuir de forma significativa a expressão de FSP-1 (Figura 23 e Tabela 9).

Figura 23: Expressão de FSP-1 no peritônio dos grupos estudados.

5.8.3.e) TGF- β

Um aumento significativo da expressão de TGF- β no peritônio foi observado no grupo DRC e no grupo FP. Entretanto, a maior expressão de TGF- β foi detectada no grupo DRC/FP em relação aos grupos CONTROLE, DRC e FP. Por outro lado, o grupo que recebeu tamoxifeno apresentou uma expressão significativamente menor de TGF- β em relação ao grupo DRC/FP. Resultado similar foi encontrado no grupo que recebeu BMP7 em que a expressão de TGF- β foi significativamente menor em relação ao grupo DRC/FP e também significativamente menor em relação ao grupo tratado com tamoxifeno. (Figura 24 e Tabela 9).

Figura 24: Expressão de TGF- β no peritônio dos grupos estudados.

Tabela 9. Expressão gênica dos marcadores de fibrose no peritônio dos grupos estudados.

Grupos	Colágeno III Expressão relativa	Fibronectina Expressão relativa	FSP-1 Expressão relativa	TGF-β Expressão relativa
CONTROLE	1 $\pm$ 0,5	1 $\pm$ 0,3	1 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,2
DRC	0,8 $\pm$ 0,7	3,3 $\pm$ 0,7*	1,9 $\pm$ 1,1	10,9 $\pm$ 0,2*
FP	3,4 $\pm$ 1*§	6,5 $\pm$ 0,8*§	2,9 $\pm$ 0,3*	13,2 $\pm$ 0,9*§
DRC/FP	10,3 $\pm$ 2,4*§#	29,2 $\pm$ 1*§#	9,2 $\pm$ 1,2*§#	30,3 $\pm$ 0,1*§#
DRC/FP+TAM	1,5 $\pm$ 0,9†	6,6 $\pm$ 1,2*§†&	0,8 $\pm$ 0,3†	17,7 $\pm$ 0,2*§†
DRC/FP+BMP7	0,2 $\pm$ 0,1#†	9,7 $\pm$ 0,5*§†	2,1 $\pm$ 1,0†	16,2 $\pm$ 0,1*§†Ω

*p<0,01 vs CONTROLE;

§p<0,01 vs DRC;

#p<0,01 vs FP;

†p<0,01 vs DRC/FP;

&p<0,01 vs DRC/FP+BMP7;

 Ω p<0,01 vs DRC/FP+TAM;

5.9. ANÁLISE DA VIA SMAD

5.9.1. Imunohistoquímica para SMAD 3 fosforilada

A presença de SMAD 3 em sua forma fosforilada foi significativamente maior nos grupos FP e DRC/FP em comparação com os grupos CONTROLE e DRC. Entretanto, os grupos tratados com tamoxifeno e BMP7 diminuíram significativamente a presença de SMAD 3 fosforilada no peritônio (Figuras 25 e 26 e Tabela 10).

Tabela 10. Quantificação de SMAD3 fosforilada no peritônio dos grupos estudados.

Grupos	Céls/mm ²
CONTROLE	22 ± 5
DRC	49 ± 3
FP	82 ± 14 ^{*§}
DRC/FP	143 ± 12 ^{*§#}
DRC/FP+TAM	106 ± 8 [†]
DRC/FP+BMP7	109 ± 5 [†]

*p<0,01 vs CONTROLE; §p<0,01 vs DRC; #p<0,01 vs FP; †p<0,01 vs DRC/FP

Figura 25: Quantificação de SMAD 3 fosforilada na membrana peritoneal nos grupos estudados.

Figura 26: Imunohistoquímica para detecção de SMAD 3 fosforilada no peritônio de animais dos grupos (A) CONTROLE; (B) DRC; (C) FP; (D) DRC/FP; (E) DRC/FP+TAM e (F) DRC/FP+BMP7. Aumento de 200X.

5.9.2. PCR em tempo real para SMAD 3

A expressão de SMAD 3 no peritônio foi significativamente maior no grupo FP e DRC/FP em relação aos grupos CONTROLE e DRC. Entretanto, os animais tratados com tamoxifeno e BMP7 diminuíram de forma significativa a expressão de SMAD 3 no peritônio. (Figura 27 e Tabela 11).

Tabela 11. Expressão de SMAD 3 no peritônio dos grupos estudados.

Grupos	Smad 3 (expressão relativa)
CONTROLE	1 ± 0,2
DRC	1,3 ± 0,6
FP	3,7 ± 0,3[*]
DRC/FP	4,6 ± 0,3^{§#}
DRC/FP+TAM	1,1 ± 0,6^{#†}
DRC/FP+BMP7	1,1 ± 0,7^{#†}

^{*}p<0,01 vs CONTROLE; [§]p<0,01 vs DRC; [#]p<0,01 vs FP; [†]p<0,01 vs DRC/FP;

Figura 27: Expressão de SMAD 3 no peritônio dos grupos estudados.

5.9.3. PCR em tempo real para SMAD 7

Os grupos FP e DRC/FP não apresentaram diferença estatística na expressão de SMAD 7 em comparação aos grupos Controle e DRC. Por outro lado, os grupos DRC/FP+TAM e DRC/FP+BMP7 apresentaram um aumento significativo da expressão de SMAD 7 na membrana peritoneal em comparação aos controles e aos grupos FP e DRC/FP (Figura 28 e Tabela 12).

Tabela 12. Expressão de SMAD 7 no peritônio dos grupos estudados.

<i>Grupos</i>	SMAD 7 (expressão relativa)
CONTROLE	1 ± 0,1
DRC	1,2 ± 0,4
FP	0,3 ± 0,2
DRC/FP	1,0 ± 0,3
DRC/FP+TAM	2,8 ± 0,5^{*§#†}
DRC/FP+BMP7	3,7 ± 0,5^{*§#†}

*p<0,01 vs CONTROLE; p<0,01 vs DRC; #p<0,01 vs FP; †p<0,01 vs DRC/FP

Figura 28: Expressão de SMAD 7 no peritônio dos grupos estudados.

5.10. ANÁLISE DA FUNÇÃO PERITONEAL

5.10.1. Ultrafiltração

O teste de ultrafiltração (UF) realizado no dia da eutanásia mostrou que não houve diferença entre os grupos Controle e DRC. A UF foi reduzida de forma significativa nos grupos FP e DRC/FP em relação aos controles. Contudo, TAM e BMP7 preservaram significativamente a UF em comparação aos grupos com FP (Figura 29 e Tabela 13).

Tabela 13. Ultrafiltração da membrana peritoneal dos grupos estudados

Grupos	UF (mL)
CONTROLE	3,3 ± 3
DRC	3,1 ± 2,3
FP	-10 ± 2,5*§
DRC/FP	-11 ± 1,7*§
DRC/FP+TAM	5,4 ± 1 ^{#†}
DRC/FP+BMP7	6,8 ± 0,6 ^{#†}

*p<0,01 vs CONTROLE; §p<0,01 vs DRC; [#]p<0,01 vs FP; [†]p<0,01 vs DRC/FP

Figura 29: Volume de ultrafiltração da membrana peritoneal dos grupos estudados.

5.10.2. Massa transferida de glicose

A análise do dialisato dos animais mostrou que não houve diferença da massa transferida de glicose (MTG) entre os grupos Controle e DRC. A MTG foi significativamente maior nos grupos FP e DRC/FP em relação aos controles. No entanto, TAM e BMP7 mantiveram a MTG em níveis similares aos grupos Controle e DRC sendo essa diferença significativa em relação aos grupos FP e DRC/FP (Figura 30 e Tabela 14).

Tabela 14. Taxa de glicose transferida pela membrana peritoneal nos grupos estudados.

Grupos	MTG (g/Kg de peso corpóreo)
CONTROLE	343 ± 4
DRC	350 ± 14
FP	398 ± 2^{*§}
DRC/FP	405 ± 8^{*§}
DRC/FP+TAM	340 ± 6^{#†}
DRC/FP+BMP7	353 ± 3^{#†}

*p<0,01 vs CONTROLE; §p<0,01 vs DRC; #p<0,01 vs FP; †p<0,01 vs DRC/FP

Figura 30: Taxa de glicose transferida pela membrana peritoneal nos grupos estudados.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que tanto o TAM como a BMP7 foram eficazes em preservar a estrutura e a função da membrana peritoneal em um modelo experimental inédito de fibrose da membrana peritoneal induzida em ratos urêmicos.

Inicialmente foram realizados experimentos para padronização do modelo de DRC e fibrose peritoneal. Os animais alimentados com dieta rica em adenina desenvolveram ao longo de 30 dias características da DRC em humanos como azotemia e aumento da pressão arterial. Conforme observado em estudos anteriores [Yokozama T et al., 1986; Ataka K et al., 2003; Eto N et al., 2005; Ikeda R et al., 2010], a dieta rica em adenina induziu aumento da ureia sérica sete vezes maior do que nos animais controles, além disso, os valores de creatinina sérica quadruplicaram. Os mecanismos pelos quais foi induzida hipertensão arterial não foram detalhadamente estudados, porém especula-se que estas alterações sejam reflexo da DRC instalada. Interessantemente, observamos que essas alterações reverteram-se parcialmente após a suspensão da dieta rica em adenina. Além da uremia e hipertensão arterial, esse modelo de DRC também se caracteriza por inflamação sistêmica [Santana AC et al., 2013]. Estudos realizados no nosso laboratório demonstraram que as concentrações séricas e no tecido renal de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 estão significativamente elevadas [Santana AC et al., 2013].

A administração diária de GC 0.1% por 15 dias induziu inflamação e fibrose intensa do peritônio semelhante à observada em alguns pacientes em diálise peritoneal por longo tempo e, muitas vezes, os animais apresentavam adesões peritoneais características da peritonite esclerosante encapsulante. Outros modelos como a lesão mecânica de peritônio por raspagem e utilização de solução de diálise a 4,25% através de cateter peritoneal [Wang J et al., 2015; Zareie M et al., 2005] requerem anestesia para processo cirúrgico e, mesmo após longo período experimental (5 semanas), não induzem fibrose peritoneal intensa. Conforme abordado na introdução, o modelo utilizado nos nossos experimentos é essencialmente baseado na irritação química e peritonite asséptica através da injeção intraperitoneal de solução de GC a 0,1%. O GC induz lesão na membrana peritoneal através do rompimento das junções entre as células mesoteliais, com dano subsequente ao tecido subseroso, causando uma resposta inflamatória que leva à fibrose tecidual [Hoff CM, 2005]. A capacidade de induzir fibrose peritoneal intensa em um curto período de tempo e com baixa mortalidade faz esse modelo ser de especial interesse para o estudo de peritonite esclerosante encapsulante [Io H et al., 2004; Wang J et al., 2015]. Por estas razões, optamos pelo modelo de indução de fibrose peritoneal por GC.

Na sequência, o modelo de fibrose peritoneal em animais com uremia foi estabelecido. De fato, houve desafios como o de determinar o melhor tempo de administração da dieta com adenina sem que houvesse significativa mortalidade. A reversibilidade parcial da uremia após suspensão da adenina nos indicou que a indução da fibrose pelo GC deveria ocorrer de forma concomitante à dieta com adenina. No entanto, observamos uma alta taxa de mortalidade ao associarmos os

dois modelos por um período de 30 dias. Por isso, optamos por dividir o período em duas partes: os primeiros 15 dias para estabelecimento da DRC com uremia e, do 15º ao 30º para injeções intraperitoneais de GC concomitante com a dieta rica em adenina. Com esse protocolo, um intenso espessamento peritoneal foi induzido acompanhado por aumento da proliferação celular, marcante infiltrado inflamatório e acúmulo de matriz extracelular na camada submesotelial do peritônio.

Quanto ao efeito do tratamento com TAM e BMP7 no desenvolvimento da DRC, não observamos melhora dos parâmetros de pressão arterial, uréia e creatinina séricas. Ao contrário dos nossos resultados, estudos anteriores demonstraram que essas terapias podem ser renoprotetoras [Hruska KA et al., 2000; Morrissey J et al., 2002; Delle H et al., 2012; Vukicevic S et al., 1998; Shirazi M et al., 2007]. No entanto, no nosso protocolo experimental, tanto o TAM como a BMP7 foram iniciados em uma fase de DRC avançada, o que pode ter limitado o efeito renoprotetor.

Tendo em vista o principal foco deste estudo, foi realizada a análise da espessura do peritônio pela coloração do tricrômio de masson. Observamos que, enquanto os grupos Controle e DRC não apresentaram alterações morfológicas na membrana, os animais dos grupos FP e DRC/FP exibiram marcante espessamento da membrana peritoneal. Contudo, os tratamentos com TAM e BMP7 foram capazes de prevenir expressivamente as alterações peritoneais induzidas pelo GC. Pela análise dos dados histomorfométricos, nota-se que não há diferença entre a espessura peritoneal dos animais normais (Controle) em relação aos animais que receberam TAM e BMP7. Esses resultados estão de acordo com dados da

literatura, em que essas duas terapias foram eficazes em proteger o peritônio quando utilizadas em outros de modelos de fibrose peritoneal em animais não urêmicos [Loureiro J et al., 2013; Loureiro J et al., 2010].

O espessamento da membrana peritoneal foi acompanhado por importante infiltrado de células inflamatórias. Enquanto que no grupo Controle e DRC poucas células inflamatórias foram detectadas, um marcado aumento do número de macrófagos (ED-1⁺) e linfócitos-T (CD43) na membrana peritoneal dos animais que receberam injeções de GC foi observado. Ainda, naqueles em que a DRC foi associada às injeções de GC, a presença de células ED1 positivas foi significativamente maior até mesmo em relação ao grupo FP. Interessantemente, foi observado um predomínio de macrófagos sobre os linfócitos. Isto ocorre pelo fato do tipo de lesão induzida pelo GC, uma injúria química, promover uma resposta inflamatória do tipo Th1 [Nakazawa M et al., 2013; Kitamura M et al., 2014].

O presente estudo investigou a via pela qual o processo inflamatório se instalou na membrana peritoneal dos animais que receberam as injeções de GC. A expressão do mRNA das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 mostrou-se significativamente aumentada no peritônio dos grupos DRC, FP e DRC/FP em relação ao grupo Controle. Primeiramente, é digno de nota observar que o grupo DRC (sem injeções de GC) apresentou uma expressão significativa destes genes em relação ao Controle. Este resultado corrobora os achados clínicos de que a uremia está associada à inflamação bem como a alterações morfológicas da membrana peritoneal e reforça a importância de que modelos experimentais de fibrose peritoneal sejam utilizados em animais urêmicos [Lai KN et al., 2010;

Pecoits-Filho et al., 2006; Willams JD et al., 2002; Wang HY et al., 2012]. Além disso, as injeções de GC associada à uremia aumentaram em média 3 vezes mais a expressão de TNF- α e IL-1 β . Concordante com os dados de expressão gênica, a análise por Multiplex identificou níveis elevados de IL-1 β e TNF- α nos grupos DRC, FP e DRC/FP. Estes achados evidenciam o processo inflamatório no peritônio dos animais e estão de acordo com dados da literatura. Por exemplo, já foi demonstrado em modelo experimental de peritonite bacteriana induzida por *Staphylococcus epidermidis* que citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e INF- γ estão associadas com o espessamento da membrana peritoneal [Fielding CA et al., 2014]. Além disso, estudos clínicos demonstraram que a presença de citocinas pró-inflamatórias no dialisato está associada com a piora da ultrafiltração em pacientes em diálise peritoneal [Ates K et al., 2000; Davies SJ et al., 1996].

Este estudo analisou o efeito da administração de TAM e BMP7 nos animais urêmicos com FP. Ambas as intervenções bloquearam o processo inflamatório de forma significativa em relação ao grupo DRC/FP. De fato, houve uma redução do número de células ED1 e CD43 positivas nos animais tratados com TAM e BMP7. Isso foi acompanhado por redução significativa da expressão gênica e das proteínas das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 nos animais tratados em relação ao grupo DRC/FP.

Os efeitos anti-inflamatórios das duas moléculas (TAM e BMP7) ainda não foram totalmente elucidados. Na membrana peritoneal, as células mesoteliais desempenham um papel crucial no desenvolvimento da inflamação e consequente fibrose local [Lai KN et al., 2010]. Por secretar citocinas pró-inflamatórias, as células mesoteliais contribuem para o recrutamento de células inflamatórias como

os macrófagos, os quais exercem papel chave no processo inflamatório da membrana [Lai KN et al., 2010]. Conforme o presente estudo demonstrou, TNF- α e IL-1 β estavam significativamente elevadas nos DRC, FP e DRC/FP. Todavia, o principal fator de transcrição dessas citocinas é o *Nuclear factor-kappaB* (NF- κ B). De fato, diversos estudos com modelos de experimentais de injúria renal, inclusive o de dieta com adenina, demonstram seu papel crucial no processo inflamatório por estimular e prolongar a produção de citocinas como TNF- α e IL-1 β [Santana AC et al., 2013; Wang W et al., 2005].

No que se refere ao TAM, seus efeitos anti-inflamatórios podem estar relacionados à sua habilidade de modular o receptor de estrógeno alfa (ER- α). Ao se ligar no ER- α o TAM induz a expressão de SMAD 7 que por sua vez estimula a síntese de I κ B- α [Matsuda T et al., 2001; Lan HY et al., 2011; Kim D et al., 2014]. Esta proteína é capaz de se ligar às subunidades p65 e p50 do NF- κ B e retê-lo no citoplasma impedindo sua translocação nuclear para estimular a síntese de fatores pró-inflamatórios [Wang W et al., 2005; Jacobs MD et al., 1998; Kim D et al., 2014]. No presente estudo, foi demonstrado por PCR em tempo real que não houve diferença da expressão de SMAD 7 entre os grupos DRC, FP e DRC/FP em relação ao grupo Controle. Todavia, o TAM aumentou de forma significativa a expressão do mRNA de SMAD 7 no tecido peritoneal. Sendo assim, podemos especular que uma atividade aumentada I κ B- α induzida pelo *upregulation* da SMAD 7 seja o mecanismo que explica em parte a ação anti-inflamatória do TAM no nosso estudo, porém mais experimentos são necessários para comprovar essa hipótese.

A BMP7 também foi capaz de bloquear a expressão gênica e reduzir a concentração de TNF- α e IL-1 β no peritônio em relação ao grupo DRC/FP. A BMP7 faz parte da superfamília TGF- β . Essa molécula se liga aos receptores T β R-I nas subunidades ALK4 e 5, as quais fosforilam a SMAD 5 que forma um heterodímero com a SMAD 4, sofrendo translocação nuclear e estimulando a síntese de SMAD 7 [Akhurst RJ et al., 2012; Schmierer B et al., 2007; Chen BL et al., 2013]. De fato, em modelo experimental de fibrose hepática, a administração exógena de BMP7 foi associada com o aumento da expressão de SMAD 7 e consequente proteção do tecido hepático [Chen BL et al., 2013]. Assim como o TAM, a administração da BMP7 também induziu um aumento da expressão do mRNA da SMAD 7 o que pode ter mediado os efeitos anti-inflamatórios observados.

Este estudo também investigou a proliferação celular e a presença de miofibroblastos na membrana peritoneal dos animais. Os grupos FP e DRC/FP apresentaram uma elevada taxa de proliferação celular a qual foi significativa em relação aos grupos Controle e DRC. Além disso, demonstramos uma elevada marcação para α -actina, um marcador de miofibroblastos, nos grupos FP e DRC/FP. Apesar da controvérsia quanto a origem dos miofibroblastos, um recente estudo demonstrou que ao invés de as células mesoteliais sofrerem um processo de transição epitélio mesenquimal, os miofibroblastos se originam dos fibroblastos residentes no peritônio ativados por fatores de crescimento e citocinas secretados pelas células mesoteliais lesadas [Chen YT et al., 2014].

TAM e BMP7 foram eficazes em bloquear a proliferação celular e também a expressão de α -actina de forma significativa em relação aos animais com FP e DRC associada à FP. No que se refere ao TAM, Yi-Ting e colaboradores demonstraram que esta molécula pode bloquear a expressão de α -actina modulando dessa forma a proliferação dos miofibroblastos [Chen YT et al., 2014]. Ainda, um estudo realizado em nosso laboratório com modelo de nefropatia crônica progressiva demonstrou que o tamoxifeno foi eficaz em diminuir significativamente a quantidade de miofibroblastos no interstício renal dos animais [Dellê H et al., 2012]. A BMP7, por sua vez, também foi eficiente em bloquear a proliferação celular, bem como, reduziu significativamente o número de miofibroblastos no peritônio. O TAM e a BMP7 podem ter bloqueado estes fatores por impedir a expressão de VEGF. Diferente de modelos de lesões renais crônicas em que a melhora da lesão renal está associada a maior expressão de VEGF e consequente maior vascularização, no caso da fibrose peritoneal este fator de crescimento está relacionado à inflamação, neoangiogênese, perda da capacidade de ultrafiltração e a fibrose da membrana peritoneal [Pecoits-Filho R et al., 2002]. Neste sentido, estudos experimentais de fibrose peritoneal demonstraram que a menor expressão de VEGF e α -actina está relacionada ao bloqueio da diferenciação de células mesoteliais em miofibroblastos e fibroblastos [Loureiro J et al., 2013; Loureiro J et al., 2010].

Todos estes fatores como inflamação, proliferação celular, presença de miofibroblastos e neoangiogênese, contribuem e culminam com a fibrose da membrana peritoneal. O modelo experimental utilizado no presente estudo

possibilitou a análise dos principais fatores pró-fibróticos envolvidos neste processo. Deveras, a maior expressão de mRNA para colágeno do tipo III, fibronectina e FSP-1 nos grupos FP e DRC/FP se correlacionam com o aumento significativo da espessura da membrana nos grupos que receberam injeções de GC. Ainda, merece destaque o fato de que em média, estes fatores fibrogênicos foram expressos quatro vezes mais no grupo em que a DRC foi associada à FP, indicando desta forma, que a DRC pode potencializar a fibrogênese no peritônio. Estabelecendo um paralelo a estes dados, Hong Guo e colaboradores associaram o modelo de fibrose peritoneal induzido por solução de diálise ao modelo de nefrectomia 5/6 que provoca um estado de uremia não tão severo quanto ao modelo adenina [Guo H et al., 2007]. Neste artigo, os autores demonstraram que a uremia isoladamente induz um aumento da expressão peritoneal de colágeno tipo I e III, fibronectina e VEGF, e a associação dos modelos potencializou a presença destes marcadores de forma significativa [Guo H et al., 2007].

Para avançar na compreensão do mecanismo acima citado neste modelo, primeiramente, PCR em tempo real para TGF- β foi realizado. Houve significativa expressão desta molécula nos grupos DRC e FP em comparação ao grupo Controle. Além disso, a expressão de TGF- β no grupo DRC/FP foi marcante, chegando a trinta vezes mais em relação ao grupo Controle e mais que o dobro em relação ao grupo FP. Ainda, demonstramos um aumento da expressão gênica e da expressão da SMAD 3 tecidual detectada por imunohistoquímica nos animais expostos ao GC. Assim, demonstramos a importância da via TGF- β /SMAD no nosso modelo.

Os tratamentos com TAM e BMP7 bloquearam significativamente a expressão de colágeno III, fibronectina e FSP-1 em relação ao grupo DRC/FP. Os efeitos anti-fibróticos destas duas moléculas tem sido cada vez mais estudados. Uma série de estudos em modelos experimentais diferentes apontam que o principal mecanismo anti-fibrótico do TAM e da BMP7 estão relacionados com o bloqueio da via TGF- β /SMAD [Loureiro J et al., 2013; Loureiro J et al., 2010; Dellê H et al., 2012; Zeisberg M et al., 2003].

As duas moléculas estudadas neste trabalho, TAM e BMP7, bloquearam de forma notável a expressão de TGF- β e das SMADs. Aliás, bloquearam o aumento da expressão de SMAD 3 e preveniram a fosforilação desta SMAD no peritônio dos animais de forma significativa. Resultados semelhantes já foram demonstrados em outros modelos de fibrose [Matsuda T et al., 2001; Loureiro J et al., 2013; Akhurst RJ et al., 2012; Schmierer B et al., 2007; Chen BL et al., 2013; Dellê H et al., 2012].

Primeiramente, em relação ao TAM, podemos relacionar seus efeitos anti-fibróticos de duas formas. O TAM se liga ao seu receptor de membrana ER- α , o mesmo interage fisicamente com a subunidade MH2 da SMAD 3 impedindo sua fosforilação e, desta maneira, bloqueia sua translocação nuclear e síntese de fatores fibrogênicos [Matsuda T et al., 2001]. Ademais, o TAM pode estimular a síntese de SMAD 7 que exerce efeito de feedback negativo na via TFG- β /SMAD impedindo a fosforilação da SMAD 3 [Kim D et al., 2014]. Dal Kim e colaboradores demonstraram em modelo experimento de obstrução ureteral

unilateral que o aumento da expressão de SMAD 7 pelo TAM melhora da fibrose intersticial renal [Kim D et al., 2014].

Ao analisar os efeitos da BMP7, fica claro que o bloqueio da fibrose se deve à indução da expressão de SMAD 7. O presente estudo demonstrou por PCR em tempo real que os animais que receberam BMP7 tiveram um aumento significativo da expressão do mRNA que codifica a SMAD 7, evidenciando seu mecanismo anti-fibrótico.

De fato, é possível bloquear a fibrose peritoneal por modulação da via SMAD, impedindo que o TGF- β estimule a produção de fatores fibróticos. Dois estudos experimentais demonstraram que a transfecção de SMAD 7 nas células mesoteliais da membrana peritoneal é capaz de bloquear o desenvolvimento de fibrose [Guo H et al., 2007; Nie J et al., 2007]. Além disso, no modelo de fibrose intersticial por obstrução ureteral, Wansheng Wang e colaboradores associaram a maior expressão de SMAD 7 com a melhora do tecido renal [Wang W et al., 2005].

Não obstante, tão importante quanto impedir um processo inflamatório, proliferação celular e bloquear a fibrose, manter uma adequada capacidade de ultrafiltração é de suma relevância. Por isso, testes de função peritoneal como avaliação do volume de UF e MTG foram realizados. Demonstramos que as injeções de GC e sua associação com a DRC prejudicaram de forma significativa, em relação aos controles, a função da membrana peritoneal, caracterizada por redução da capacidade de ultrafiltração e aumento da transferência de glicose. Conquanto, os animais do grupo DRC/FP+TAM e DRC/FP+BMP7 tiveram a

função dos seus peritônios protegida e isso ficou caracterizado pela preservação da UF e pela redução da MTG. Certamente, isto foi possível graças a todos os mecanismos já abordados acima em relação ao bloqueio da inflamação e da expressão de VEGF, bem como a prevenção da fibrose peritoneal.

Até o momento, não há relatos de administração de BMP7 exógena em humanos a fim de proteger a membrana peritoneal. O TAM já foi utilizado com sucesso no tratamento da peritonite encapsulante. Em uma série de casos [Eltoum MA et al., 2006] e um estudo clínico multicêntrico [Korte M et al., 2011], o TAM foi associado a redução de mortalidade em pacientes com peritonite encapsulante evidenciando seu potencial uso no combate a esta patologia.

Nestes últimos anos, bloquear a fibrose peritoneal e elucidar seus mecanismos tem sido alvo de diversas pesquisas. Estes estudos aumentam as possibilidades de novas estratégias, como o TAM e a BMP7, serem investigadas em estudos clínicos. O presente estudo estimula exatamente isso, o avanço na compreensão dos mecanismos possíveis para a prevenção da fibrose peritoneal.

7. RESUMO DOS ACHADOS

1) O modelo experimental de DRC induzido por dieta rica em adenina associado à FP por injeções intraperitoneais de GC, foi padronizado e estabelecido com sucesso de forma inédita.

2) Os animais dos grupos FP e DRC/FP desenvolveram um significativo espessamento da membrana peritoneal.

3) Foi encontrado nos animais dos grupos FP e DRC/FP um marcante infiltrado inflamatório na membrana peritoneal dos animais. Além disso, nos grupos DRC, FP e DRC/FP, foi detectado aumento na expressão do RNA mensageiro, além da concentração proteica dos mediadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β e IL-6 na membrana peritoneal dos animais.

5) Os grupos FP e DRC/FP apresentaram maior proliferação celular e presença de miofibroblastos no peritônio em comparação aos animais do grupo CONTROLE.

6) Foi detectado nos animais dos grupos FP e DRC/FP maior expressão do RNA mensageiro para os genes dos componentes da matriz extracelular como colágeno III e fibronectina bem como VEGF, FSP-1 e TGF- β na membrana peritoneal. Ainda, foi encontrado um aumento da expressão de SMAD 3 bem como a presença dessa proteína em sua forma fosforilada no peritônio dos animais dos grupos FP e DRC/FP.

7) A ultrafiltração foi prejudicada nos animais dos grupos FP e DRC/FP.

8) TAM e BMP7 foram eficazes em prevenir o espessamento da membrana peritoneal de forma significativa.

9) Os grupos tratados com TAM e BMP7 foram protegidos contra a presença de células inflamatórias como macrófagos e linfócitos T de forma significativa. Além disso, bloquearam a expressão do mRNA do TNF- α , IL-1 β e IL-6. Ademais, os tratamentos também impediram a presença dessas citocinas em sua forma proteica na membrana peritoneal.

10) Animais tratados com TAM e BMP7 apresentaram menor proliferação celular e também, menor presença de miofibroblastos no peritônio.

11) TAM e BMP7 protegeram o peritônio dos animais contra a expressão de fatores pró-fibróticos (colágeno III e fibronectina bem como VEGF, FSP-1 e TGF- β na membrana peritoneal), e bloquearam a via SMAD por diminuir a expressão de SMAD 3 e sua presença em forma fosforilada no peritônio por aumentar de forma significativa a expressão de SMAD 7 na membrana peritoneal.

12) A terapia com TAM e BMP7 foi eficaz em proteger a capacidade de ultrafiltração da membrana peritoneal.

8. CONCLUSÕES

O modelo experimental, padronizado e estabelecido com sucesso, de FP associado à DRC inédito mimetiza de forma eficaz os parâmetros clínicos encontrados em pacientes com DRC em DP. Além disso, os animais tratados com Tamoxifeno e BMP7 tiveram sua membrana peritoneal protegida contra infiltrado inflamatório, presença de miofibroblastos, proliferação celular, expressão de VEGF e ainda, bloquearam a formação de fibrose na membrana por agir na via SMAD do TGF- β . A influência destas duas moléculas em mecanismos inflamatórios e fibróticos podem estar relacionadas com a maior expressão de SMAD 7 observada nos grupos que receberam tratamentos. Por fim, tanto TAM quanto BMP7 protegeram a função da membrana peritoneal por preservar a UF e diminuir a MTG. Portanto, diante de todo o exposto cabe concluir que, TAM e BMP7 representam estratégias promissoras no bloqueio da fibrose peritoneal e que estudos clínicos são necessários para validar ambas as estratégias em relação a esta situação clínica.

9. REFERÊNCIAS

- ABENSUR H. Compreendendo a cavidade peritoneal nos pacientes em diálise peritoneal. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Livre-Docência, 2002.
- AKHURST RJ, HATA A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. **Nat reviews Drug Discov.** 11(10): 790-811, 2012.
- ALLARIA PM, GIANGRANDE A, GANDINI E, PISONI IB. Continuous ambulatory peritoneal dialysis and sclerosing encapsulating peritonitis: tamoxifen as a new therapeutic agent? **J Nephrol.** 12(6): 395-397, 1999.
- ATAKA K, MARUYAMA H, NEICHI T, MIYAZAKI J, GEJYO F. Effects of erythropoietin-gene electrotransfer in rats with adenine-induced renal failure. **Am J Nephrol.** 23(5): 315-323, 2003.
- ATES K, KOC R, NERGIZOGLU G, ERTUK S, KEVEN K, SEN A, KARATAN O. The longitudinal effect of a single peritonitis episode on peritoneal membrane transport in CAPD patients. **Perit Dial Int.** 20(2): 220-226, 2000.
- BARONI G, SCHUINSKI A, MORAES TP, MEYER F, PECOITS-FILHO R. Inflammation and the peritoneal membrane: causes and impact on structure and function during peritoneal dialysis. **Mediators of inflamm.** ID912595, 2012.
- BOUDVILLE N, KEMP A, CLAYTON P, LIM W, BADVE SV, Hawley CM, McDonald SP, Wiggins KJ, Bannister KM, Brown FG and Johnson DW. Recent Peritonitis Associates with Mortality among Patients Treated with Peritoneal Dialysis. **JASN** Aug 1, 2012 23: 1398-1405;
- CHEN BL, PENG J, LI QF, YANG M, WANG Y, CHEN W. Exogenous bone morphogenetic protein-7 reduces hepatic fibrosis in *Schistosoma japonicum*-infected mice via transforming growth factor- β /Smad signaling. **World J Gastroenterol.** 19(9): 1405-1415, 2013.
- CHEN YT, CHANG YT, PAN SY, CHOU YH, CHANG FC, YEH PY, LIU YH, CHIANG WC, CHEN YM, WU KD, TSAI TJ, DUFFIELD JS, LIN SL. Lineage Tracing Reveals Distinctive Fates for Mesothelial Cells and Submesothelial Fibroblasts during Peritoneal Injury. **J Am Soc Nephrol.** 25(12): 2847-2858, 2014.

- COHEN EP. Fibrosis causes progressive kidney failure. **Med Hypotheses**. 45(5): 459-462, 1995.
- CRUZ CF, CUNHA GOD, SOUZA SRP. Custo do tratamento dos pacientes com insuficiência renal crônica em estágio terminal no município de São Paulo, no período de 2008 a 2012. • Science in Health • jan-abr 2014; 5(1): 6-11
- CRUZ J, PRAXEDES JN, CRUZ HMM. Nefrologia. 2ªedição. São Paulo: Sarvier; 2006
- CUSHMAN M, COSTANTINO JP, TRACY RP, SONG K, BUCKLEY L, ROBERTS JD, HKRAG DNH. Tamoxifen and cardiac risk factors in healthy women: Suggestion of an anti-inflammatory effect. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 21(2): 255-261, 2001.
- DAVENPORT A. Peritonitis remains the major clinical complication of peritoneal dialysis: the london, uk, peritonitis audit 2002–2003. **Perit Dial Int** May-June 2009 29:297-302
- DAVIES SJ, BRYAN J, PHILLIPS L, RUSSEL GI. Longitudinal changes in peritoneal kinetics: the effects of peritoneal dialysis and peritonitis. **Nephrol Dial Transplant**. 11(3): 498-506, 1996.
- DELLÊ H, ROCHA JR, CAVAGLIERI RC, VIEIRA JM JR, MALHEIROS DM, NORONHA IL. Antifibrotic effect of tamoxifen in an experimental model of progressive renal disease. **J Am Soc Nephrol**. 23(1): 37-48, 2012.
- DUBE PH, ALMANZAR MM, FRAZIER KS, JONES WK, CHARETTE MF, AND PAREDES A. Osteogenic Protein-1: Gene Expression and Treatment in the Rat Remnant Kidney Model. **Toxicol Pathol** June 2004 32: 384-392
- ELTOUM MA, WRIGHT S, ATCHLEY J, MASON JC. Four consecutive cases of peritoneal dialysis-related encapsulating peritoneal sclerosis treated successfully with tamoxifeno. **Perit Dial Int**. 26(2): 203-206, 2006.
- ETO N, MIYATA Y, OHNO H, YAMASHITA T. Nicotinamide prevents the development of hyperphosphataemia by suppressing intestinal sodium dependent phosphate transporter in rats with adenine-induced renal failure. **Nephrol Dial Transplant**. 20(7): 1378-1384, 2005.
- FALLER B, MARICHAL JF, BRIGNON P. Local immunologic reactions induced by CAPD. **Nephrologie** 10: S30-33, 1989.
- FIELDING CA, JONES GW, MCLOUGHLIN RM, MCLEOD L, HAMMOND VJ, UCEDA J, WILLIAMS AS, LAMBIE M, FOSTER TL, LIAO CT, RICE CM, GREENHILL CJ, COLMONT CS, HAMS E, COLES B, KIFT-MORGAN A, NEWTON Z, CRAIG KJ, WILLIAMS JD, WILLIAMS GT,

- DAVIES SJ, HUMPHREYS IR, O'DONNELL VB, TAYLOR PR, JENKINS BJ, JONES N. 2014. Interleukin-6 Signaling Drives Fibrosis in Unresolved Inflammation. **Cell Immunity** 40, 40–50, January 16, 2014
- FINE A. Relevance of C-reactive protein levels in peritoneal dialysis patients. *Kidney International* (2002) 61, 615–620;
- FLESSNER MF. The transport barrier in intraperitoneal therapy. **Am J Physiol Renal Physiol**. 288(3): F433-F442, 2005.
- FRESENIUS MEDICAL CARE. Fresenius Medical Care Annual Report 2012 - Dialysis Market, Bad Homburg, Germany, **Fresenius Medical Care**. 2012.
- GRAINGER, DJ, SCHOFIELD PM. Tamoxifen for the Prevention of Myocardial Infarction in Humans: Preclinical and Early Clinical Evidence. **Circulation**. 112(19): 3018-3024, 2005.
- GREAVES P, GOONETILLEKE R, NUNN G, TOPHAM J, ORTON T. Two-Year Carcinogenicity Study of Tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived Rats. **Cancer Res**. 53(17): 3919-3924, 1993.
- GU L, RUTLEDGE B, FIORILLO J, ERNEST C, GREWAL I, FLAVELL R, GLADUE R, ROLLINS B. In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1. **J Leukoc Biol**. 62(5): 577-580, 1997.
- GUEST S. Tamoxifen therapy for encapsulating peritoneal sclerosis: mechanism of action and update on clinical experiences. **Perit Dial Int**. 29(3): 252-255, 2009.
- GUO H, LEUNG JC, LAM MF, CHAN LY, TSANG AW, LAN HY, LAI KN. Smad7 Transgene Attenuates Peritoneal Fibrosis in Uremic Rats Treated with Peritoneal Dialysis. **J Am Soc. Nephrol**. 18(10): 2689-2703, 2007.
- HOFF CM. Experimental animal models of encapsulating peritoneal sclerosis. **Perit Dial Int**. Supp 4:S57-66, 2005.
- HRUSKA KA, GUO G, WOZNIAK M, MARTIN D, MILLER S, LIAPIS H, LOVEDAY K, KLAHR S, SAMPATH TK, MORRISSEY J. Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. **Am J Physiol Renal Physiol**. 279(1): F130-143, 2000.
- IKEDA R, IMAI Y, MARUYAMA W, MIZOGUCHI K. Systemic disorders of calcium dynamics in rats with adenine-induced renal failure: implication for chronic kidney disease-related complications. **Nephrology (Carlton)**. 15(1): 54-62, 2010.

- IO H, HAMADA C, RO Y, ITO Y, HIRAHARA I, TOMINO Y. Morphologic changes of peritoneum and expression of VEGF in encapsulated peritoneal sclerosis rat models. **Kidney Int.** 65(5): 1927-1936, 2004.
- ISMAILOGLU O, ORAL B, GORGULU A, SUTÇU R, DEMIR N. Neuroprotective effects of tamoxifeno on experimental spinal cord injury. **J Clin Neuroscience.** 17(10): 1306-1310, 2010.
- JACOBS MD, HARRISON SC. Structure of an I κ B α /NF- κ B Complex. **Cell.** 95(6): 749-758, 1998.
- JENA N, MARTÍN-SEISDEDOS C, MCCUE P. and CROCE CM. BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye. **Exp. Cell Research.** 1997. 230;28-37.
- KIM D, LEE AS, JUNG YJ, YANG KH, LEE S, PARK SK, KIM W, KANG KP. Tamoxifen ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis by modulation of estrogen receptor α -mediated transforming growth factor- β 1/Smad signaling pathway. **Nephrol. Dial. Transplant.** 29(11): 2043-2053, 2014.
- KINZBRUNNER B, SEYMOUR R. Remission of rapidly growing desmoid tumors after tamoxifen therapy. **Cancer.** 52(12): 2201-2204, 1983.
- KITAMURA M, NISHINO T, OBATA Y, OZONO Y, KOJI T, KOHNO S. New Insights into Therapeutic Strategies for the Treatment of Peritoneal Fibrosis: Learning from Histochemical Analyses of Animal Models. **Acta Histochemica et Cytochemica.** 47(4): 133-143, 2014.
- KLARENBACH SW, TONELLI M, CHUI B & MANNS BJ. Economic evaluation of dialysis therapies. **Nature Reviews Nephrology** 10, 644–652 (2014)
- KOPP JB. BMP receptors in kidney. **Kidney Int.** 58(5): 2237-2238, 2000.
- KORTE MR, SAMPIMON DE, BETJES MGh, KREDIET RT. Encapsulating peritoneal sclerosis: the state of affairs. **Nat Rev Nephrol.** 7(9): 528-538, 2011.
- KORTE MR, FIEREN MW, SAMPIMON DE, LINGSMA HF, WEIMAR W, BETJES MG; Investigators of the Dutch Multicentre EPS Study. Tamoxifen is associated with lower mortality of encapsulating peritoneal sclerosis: results of the Dutch Multicentre EPS Study. **Nephrol. Dial. Transplant.** 26(2): 691-697 2011.
- LAI KN, LEUNG JCK. Inflammation in peritoneal dialysis. **Nephron Clin Pract.** 116(1): c11-c18, 2010.

- LAN HY. Diverse Roles of TGF- β /Smads in Renal Fibrosis and Inflammation. **Int J Biol Sci.** 7(7): 1056-1067, 2011.
- LIU F, HATA A, BAKER JC, DOODY J, CARCAMO J, HARLAND RM, MASSAGUÉ J. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. **Nature.** 381:620-623, 1996.
- LIU H., XHANG N. and TIAN D. MiR-30b is involved in methylglyoxal-induced epithelial–mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells in rats. **Cell & Mol Bio Letters.** 2013;
- LOUREIRO J, SCHILTE M, AGUILERA A, ALBAR-VIZCAÍNO P, RAMÍREZ-HUESCA M, PÉREZ –LOZANO ML, PÉREZ-LOZANO, GUADALUPE GONZÁLEZ-MATEO, LUIZ S. AROEIRA, RAFAEL SELGAS, LOREA MENDOZA, ALBERTO ORTIZ, MARTA RUÍZ-ORTEGA, JACOB VAN DEN BORN, ROBERT H.J. BEELEN AND MANUEL LÓPEZ-CABRERA. BMP-7 blocks mesenchymal conversion of mesothelial cells and prevents peritoneal damage induced by dialysis fluid exposure. **Nephrol Dial Transplant.** 25(4):1098-1108, 2010.
- LOUREIRO J, AGUILERA A, SELGAS R, SANDOVAL P, ALBAR-VIZCAÍNO P, LOZANO-PÉREZ ML, RUIZ-CARPIO V, MAJANO PL, LAMAS S, RODRÍGUES-PASCUAL F, BORRAS-CUESTA F, DOTOR J AND LÓPEZ-CABRERA M. Blocking TGF- β 1 protects the peritoneal membrane from dialysate-induced damage. **J Am Soc Nephrol.** 22(9): 1682-1695, 2011.
- LOUREIRO J, SANDOVAL P, DEL PESO G, GÓNZALEZ-MATEO G, FERNÁNDEZ-MILLARA V, SANTAMARIA B, BAJO MA, SÁNCHEZ-TOMERO JA, GUERRA-AZCONA G, SELGAS R, LÓPEZ-CABRERA M, AGUILERA AI. Tamoxifen Ameliorates Peritoneal Membrane Damage by Blocking Mesothelial to Mesenchymal Transition in Peritoneal Dialysis. **PLoS ONE.** 8(4): e61165, 2013.
- LUO G, HOFMANN C, BRONCKERS AL, SOHOCKI M, BRADLEY A, KARSENTY G. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. **Genes Dev.** 9: 2808-2820, 1995.
- MARGETTS PJ, KOLB M, YU L, HOFF CM, HOLMES CJ, ANTHONY DC, GAULDIE J. Inflammatory cytokines, angiogenesis, and fibrosis in the rat peritoneum. **Am J Pathol.** 160(6): 2285-2294, 2002.
- MASSAGUÉ J, SEOANE J and WOTTON D. Smad transcriptional factors. **Genes Dev.** 2005 19: 2783-2810

- MASSAGUÉ J. TGF β signaling in context. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 13(10): 616-30, 2012.
- MATEIJSEN MA, VAN DER WAL AC, HENDRIKS PM, ZWEERS MM, MULDER J, STRUIJK DG, KREDIET RT. Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. **Perit Dial Int.** 19(6): 517-525, 1999.
- MATSUDA T, YAMAMOTO T, MURAGUCHI A, SAATCIOGLU F. Cross-talk between Transforming Growth Factor- β and Estrogen Receptor Signaling through Smad3; **J. Biol. Chem.** 276(46): 42908-42914, 2001.
- MILLAN FA, DENHEZ F, KONDAIAH P & AKHURST RJ. Embryonic gene expression patterns of TGF β 1, β 2 and β 3 suggest different developmental functions in vivo. **Development** 111, 131-143 (1991).
- MITU G, HIRSCHBERG R. Bone morphogenic protein-7 in chronic kidney disease. **Frontiers in Bioscience.** 13: 4726-4739, 2008.
- MONDELLO S, MAZZON E, DI PAOLA R, CRISAFULLI C, MONDELLO P, BUEMI M, ALOISI C, CUZZOCREA S. Thalidomide suppresses sclerosing encapsulating peritonitis in a rat experimental model. **Shock:** September 2009 - Volume 32 - Issue 3 - pp 332-339
- MORRISSEY J, HRUSKA K, GUO G, WANG S, CHEN Q, KLAHR S. Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function. **J Am Soc Nephrol.** 1: S14-21, 2002.
- NAKAZAWA M, OBATA Y, NISHINO T, ABE S, NAKAZAWA Y, ABE K, FURUSU A, MIYAZAKI M, KOJI T, KOHNO S. Involvement of leptin in the progression of experimentally induced peritoneal fibrosis in mice. **Acta Histochem. Cytochem.** 46(2): 75-84, 2013.
- NIE J, DOU X, HAO W, WANG X, PENG W, JIA Z, CHEN W, LI X, LUO N, LAN HY, YU XQ. Smad7 gene transfer inhibits peritoneal fibrosis. **Kidney Int.** 72(11): 1336-1344, 2007.
- NILSSON UW, JÖNSSON JA, DABROSIN C. Tamoxifen decreases extracellular TGF- β 1 secreted from breast cancer cells-a post-translational regulation involving matrix metalloproteinase activity. **Exp Cell Res.** 315(1): 1-9, 2009.
- OKADA H, INOUE T, KANNO Y, KOBAYASHI T, WATANABE Y, BAN S, NEISON EG, SUZUKI H. Selective depletion of fibroblast preserves morphology and the functional integrity of peritoneum in transgenic mice with peritoneal fibrosing syndrome. **Kidney Int.** 64(5): 1722-1732, 2003.

- ÖZENER Ç, KIRIS S, LAWRENCE R, ILKER Y, AKOGLU E. Potential beneficial effect of tamoxifen in retroperitoneal fibrosis. **Nephrol Dial Transplant.** 12(10): 2166-2168, 1997.
- OZKAYNAK E, RUEGER DC, DRIER, EA, CORBETT C, RIDGE RJ, SAMPATH TK, OPPERMAN H. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. **EMBO J.** 9(7): 2085-2093, 1990.
- PECOITS-FILHO R, ARAÚJO MRT, LINDHOLM B, STENVINKEL P, ABENSUR H, ROMÃO JR JR, MARCONDES M, OLIVEIRA AHF, NORONHA IL. Plasma and dialysate IL-6 and VEGF concentrations are associated with high peritoneal solute transport rate. **Nephrol. Dial. Transplant.** (2002) 17 (8): 1480-1486
- POWELL DW, MIFFLIN RC, VALENTICH JD, CROWE SE, SAADA JI, WEST AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. **Am J Physiol.** 277(1): C1-C19, 1999.
- SAMPATH TK, COUGHLIN JE, WHETSTONE RM, BANACH D, CORBETT C, RIDGE RJ, OZKAYNAK E, OPPERMAN H, RUEGER DC. Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor-beta superfamily. **J. Biol. Chem.** 265:13198-13205, 1990.
- SANTANA AC, DEGASPARI S, CATANOZI S, DELLÊ H, LIMA LS, SILVA C, BLANCO P, SOLEZ K, SCAVONE C, NORONHA IL. Thalidomide suppresses inflammation in adenine-induced CKD with uraemia in mice. **Nephrol Dial Transplant.** 28(5): 1140-1149, 2013.
- SAVELLI BA, PARSHLEY M, MORGANROTH ML. Successful treatment of sclerosing cervicitis and fibrosing mediastinitis with tamoxifen. **Chest.** 111(4): 1137-40, 1997.
- SAWASHIMA K, MIZUNO S, MIZUNO-HORIKAWA Y, SHIMADA A, KUDO T, KUROSAWA T. Expression of alpha-smooth muscle actin and fibronectin in tubulointerstitial lesions of cats with chronic renal failure. **Am J Vet Res.** 2000 Sep;61(9):1080-6.
- SCHMIERER B, HILL CS. TGFβ-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. **Nature Reviews Molecular Cell Biol.** 8(12): 970-982, 2007.
- SEGKLIA A, SEUNTJENS E, ELKOURIS M, TSALAVOS S, STAPPERS E, MITSIADIS TA, HUYLEBROECK D, REMBOUTSIKA E AND GRAF D: Bmp7 Regulates the Survival, Proliferation, and Neurogenic Properties of Neural Progenitor Cells during Corticogenesis in the Mouse. **PLoS ONE.** 7(3): e34088, 2012.

- SESSO RCC, LOPES AA, THOMÉ FS, LUGON JR, WATANABE Y, SANTOS DANIEL R. Chronic Dialysis in Brazil - Report of the Brazilian Dialysis Census, **Jornal Brasileiro de Nefrologia** 34(3): 272-277, 2012.
- SHIRAZI M, NOORAFSHAN A, KROUP M, TANIDEH N. Comparison of the effects of captopril, tamoxifen and L-carnitine on renal structure and fibrosis after total unilateral ureteral obstruction in the rat. **Scand J Urol Nephrol.** 41(2): 91-7, 2007.
- STENVINKEL, P. Inflammatory and atherosclerotic interaction in the depleted uremic patient. **Blood Purif.** 19(1): 53-61, 2001.
- STRUTZ F, OKADA H, LO CW, DANOFF T, CARONE RL, TOMASZEWSKI JE, NEILSON EG. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. **J Cell Biol.** 130(2): 393-405, 1995.
- SUGA H, TERAOKA S, OTA K, KOMEMUSHI S, FURUTANI S, YAMAUCHI S, MARGOLIN S. Preventive effect of pirfenidone against experimental sclerosing peritonitis in rats. **H Exp Toxicol Pathol** 47(4): 287-291, 1995.
- SZETO CC, CHOW KM, KWAN BC, LAI KB, CHUNG KY, LEUNG CB, LI PK. The relationship between bone morphogenic protein-7 and peritoneal transport characteristics. **Nephrol Dial Transplant.** 23(9): 2989-2994, 2008.
- TAMAGAKI K, YUAN Q, OHKAWA H, IMAZEKI I, MORIGUCHI Y, IMAI N, SASAKI S, TAKEDA K, FUKAGAWA M. Severe hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcification in rats with adenine-induced uraemia. **Nephrol Dial Transplant** 21(3): 651-659, 2006.
- US Renal Data System, USRDS 2012 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2012.
- VUKICEVIC S, BASIC V, ROGIC D, BASIC N, SHIH MS, SHEPARD A, JIN D, DATTATREYAMURTY B, JONES W, DORAI H, RYAN S, GRIFFITHS D, MALIAKAL J, JELIC M, PASTORCIC M, STAVLJENIC A, SAMPATH TK. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. **J Clin Invest.** 102(1): 202-214, 1998.
- WANG S and HIRSCHBERG R. Bone Morphogenetic Protein-7 Signals Opposing Transforming Growth Factor β in Mesangial Cells. **J. Biol. Chem.** 2004 279: 23200-23206.

- WANG AY, LAI KN. The importance of residual renal function in dialysis patients. **Kidney Int.** 69(10): 1726-1732, 2006.
- WANG HY, LIN CY, CHIEN CC, KAN WC, TIAN YF, LIAO PC, WU HY, SU SB. Impact of uremic environment on peritoneum: A proteomic view. **J. Proteomics.** 75(7): 2053-2063, 2012.
- WANG J, LIU S, LI H, SUN J, ZHANG S, XU X, LIU Y, WANG Y, MIAO L. A review of rodent models of peritoneal dialysis and its complications. **Int Urol Nephrol** 47(1): 209–215, 2015.
- WANG W, HUANG XR, LI AG, LIU F, LI JH, TRUONG LD, WANG XJ, LAN HY. Signaling Mechanism of TGF-1 in Prevention of Renal Inflammation: Role of Smad7. **J Am Soc Nephrol.** 16(5): 1371-1383, 2005.
- WEINHANDL ED, FOLEY RN, GILBERTSON DT, ARNESON TJ, SNYDER JJ, COLLINS AJ. Propensity-matched mortality comparison of incident hemodialysis and peritoneal dialysis patients. **J Am Soc Nephrol.** 21(3): 499-506, 2010.
- WILLIAMS JD, CRAIG KJ, TOPLEY N, RUHLAND CV, FALLON M, NEYMAN GR, MACKENZIE RK, WILLIAMS GT. Morphological changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. **J Am Soc Nephrol.** 13(2): 470-479, 2002.
- XU X, RIVKIND A, PAPPO O, PIKARSKY A, LEVI-SCHAFFER F. Role of mast cells and myofibroblasts in human peritoneal adhesion formation. **Annals of Surgery** 236(5): : 593-601, 2002.
- XU YF, WAN JX, JIANG DW. Effects of bone morphogenic protein-7 on transdifferentiation and the expression of connective tissue growth factor of human renal tubular epithelial cells induced by transforming growth factor-beta1. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi** Jun 16;89(23):1639-44. 2009.
- YOKOZAWA T, ZHENG PD, OURA H, KOIZUMI F. Animal Model of Adenine-Induced Chronic Renal Failure in Rats. **Nephron.** 44(3): 230-234, 1986.
- YOSHIO Y, MIYAZAKI M, ABE K, NISHINO T, FURUSU A, MIZUTA Y, HARADA T, OZONO Y, KOJI T, KOHNO S. TNP-470, an angiogenesis inhibitor, suppresses the progression of peritoneal fibrosis in mouse experimental model. **Kidney Int.** 66(4): 1677-1685, 2004.
- ZAREIE M, DE VRIESE AS, HEKKING LH, WEE PM, SCHALKWIJK CG, DRIESPRONG BA, SCHADEE-EESTERMANS IL, BEELEN RH, LAMEIRE N, VAN DEN BORN J. Immunopathological changes in a

uraemic rat model for peritoneal dialysis. **Nephrol Dial Transplant.** 20(7): 1350-1361, 2005.

ZEISBERG M, HANAI J, SUGIMOTO H, MAMMOTO T, CHARYTAN D, STRUTZ F AND KALLURI R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. **Nat Med.** 9(7): 964-968, 2003.