Camile Alba Pereira

**Efeito da pirfenidona em modelo experimental
de nefropatia crônica progressiva**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Irene de Lourdes Noronha

São Paulo
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Camile Alba

Efeito da pirfenidona em modelo experimental de nefropatia crônica progressiva /
Camile Alba Pereira. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Irene de Lourdes Noronha.

Descritores: 1.Piridonas/uso terapêutico 2.Nefropatias 3.Fibrose/fisiopatologia
4.Ratos Wistar

USP/FM/SBD-211/07

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao Senhor meu Deus e ao seu filho amado Senhor Jesus Cristo, que me deu saúde para continuar em pé todos os dias dessa minha jornada. Obrigada meu Deus, pela paciência e discernimento. e principalmente obrigada por ter confiado em mim e me enviando anjinhos tão lindos, minhas filhas amadas, Ana Clara e Ana Luiza.

A minha amada mãe, Marta, que sempre, sempre me deram amor e carinho. Além de todo o apoio em todos os momentos em que mais necessitei. Muito obrigada por acreditar em mim. Agradeço pelo alto investimento que fez para que eu chegasse aonde cheguei, que Deus lhe abençoe sempre. NEOQEAV!!!

Ao meu querido esposo, Leandro, que me conheceu em meio uma tempestade, e com muito carinho conseguiu fazer com que meu barco chegasse inteiro em um porto seguro. Muito obrigada, amo você.

Agradeço a toda minha família que de alguma forma participaram, contribuíram para com a realização deste sonho.

A Prof^a. Dra. Irene Noronha, exemplo de seriedade e dedicação à pesquisa e clínica. Agradeço muito por me permitir fazer parte do seu grupo. Levarei comigo seus conselhos e farei o possível para aplicá-los no decorrer da minha existência nesta vida.

Às minhas amigas do laboratório: Ivone, Cleonice, Tatiana, Ritinha, Daninha, Andréia e Camila (pena que você não está mais trabalhando conosco), que em todos os momentos, mas em todos os momentos mesmo

deste trabalho estiveram sempre presentes e ajudando, contribuindo para que tudinho saísse da melhor forma possível. Amigas, muito obrigada. Levo isto por toda minha vida!

Aos meninos do laboratório: Wagner (meu cunhado) muito obrigada mesmo, você não é deste mundo! Dimitri, você foi um também que sempre contribuiu para a realização deste trabalho, seja sacrificando meu ratinhos, seja sendo divertido nos momentos de stress, você me deu uma super mão, muito obrigada, meu amigo! Becker, você, bem não tem palavras...mesmo você estando longe me ajudou muito. Valeu. Humberto, com você aprendi que para se conquistar coisas temos que ter momentos de seriedade e muito discernimento, que não é possível fazer ciência sem ficar algumas vezes 10X concentrado. Obrigada.

A Dra Denise pela preciosa análise histológica.

A todos, sem exceção, que fazem parte da equipe da Dra Vanda. Vocês, nossa, são tantos os nomes...vocês foram demais. Muito obrigada.

Agradeço também ao Dr Joel e todas as suas pupilas, obrigado pelos conselhos, e força nos momentos críticos.

Por fim agradeço a todo que fazem parte da grande família que é o laboratório de fisiopatologia experimental. Obrigada a todos...Neide, Denise, Luciana (pessoa)...enfim obrigada a todos novamente.

Sumário

RESUMO

SUMMARY

I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Fibrose.....	2
I.2. TGF- β	4
I.3. Plasminogênio e PAI	5
I.4. Metaloproteinases	6
I.5. Modelo de nefropatia crônica induzida pela inibição da síntese do óxido nítrico.....	7
I.6. Tratamento das nefropatias progressivas	9
I.7. Pirfenidona.....	11
II. OBJETIVOS	14
III. MATERIAIS E MÉTODOS	16
III.1. Estudo “<i>in vivo</i>”	16
III.1.1. Animais.....	16
III.1.2. Dietas	16
III.1.3. Indução do modelo experimental de nefropatia crônica progressiva.....	17
III.1.4. Drogas terapêuticas	17
III.1.5. Grupos experimentais.....	18
III.1.6. Pressão arterial	20
III.1.7. Albuminúria.....	20
III.1.8. Creatinina sérica.....	22
III.1.9. Histologia.....	22
III.1.10. Zimografia.....	26
III.1.11. Imuno-histoquímica	28
III.2. Estudo “<i>in vitro</i>”	34
III.2.1. Cultura Celular.....	34
III.2.2. Determinação da proliferação celular pela incorporação de timidina.....	39
III.2.3. Imunocitoquímica para caracterização dos fibroblastos	39
III.2.4. Técnicas de Biologia Molecular	43
III.2.5. Ensaio para TGF- β pela técnica de ELISA.....	46
III.3. Análise Estatística	47

IV. RESULTADOS	50
IV.1. Resultados do estudo “<i>in vivo</i>”	50
IV.1.1. Parâmetros de doença renal	50
IV.1.1.a) <i>Pressão caudal</i>	52
IV.1.1.b) <i>Albuminúria</i>	53
IV.1.1.c) <i>Creatinina sérica</i>	54
IV.1.1.d) <i>Glomerulosclerose</i>	55
IV.1.1.e) <i>Isquemia glomerular</i>	56
IV.1.2. Análise da fibrose intersticial e atividade das MMPs	57
IV.1.3.a) <i>Quantificação da fibrose intersticial</i>	58
IV.1.3.b) <i>Análise da atividade de metaloproteinases</i> <i>MMP-2 e MMP-9</i>	59
IV.1.4. Componente celular	62
IV.1.4.a) <i>Macrófagos</i>	64
IV.1.4.b) <i>Linfócitos T</i>	65
IV.1.4.c) <i>Miofibroblastos</i>	66
IV.1.4.d) <i>PCNA</i>	67
IV.2. Resultados do estudo “<i>in vitro</i>”	68
IV.2.1. Caracterização das células cultivadas derivadas de explante de rim de rato e derivadas de linhagem celular (NRK-49F)	68
IV.2.2. Proliferação celular pela incorporação de Timidina- ³ H em cultura de fibroblasto renal derivado de explante e de célula de linhagem celular (NRK-49F)	70
IV.2.3. RT-PCR para colágenos tipo I e III e TGF- β de cultura de fibroblastos renais derivados linhagem celular (NRK-49F)	73
IV.2.4. Ensaio de ELISA para TGF- β no sobrenadante de cultura de fibroblastos renais derivados de explante e de linhagem celular (NRK-49F)	75
V. DISCUSSÃO	77
VI. RESUMO E CONCLUSÕES	89
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

RESUMO

Pereira,CA. *Efeito da pirfenidona em modelo experimental de nefropatia crônica progressiva* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Considerando-se a importância do mecanismo de fibrose na doença renal crônica progressiva, o presente projeto visou estudar o efeito da pirfenidona, droga potencialmente anti-fibrótica, na lesão renal em modelo experimental da nefropatia progressiva. Foi utilizado o modelo experimental de nefropatia crônica progressiva, através da inibição da síntese do óxido nítrico. A indução da doença renal foi feita utilizando-se ratos Wistar machos que receberam L-NAME (200 mg/L na água do bebedouro) e dieta hipersódica (3,2% Na) durante 30 dias. Após o período de tratamento (30 dias) foi avaliado o grau de lesão renal através da dosagem da albuminúria, creatinina sérica, grau de glomerulosclerose e grau de isquemia glomerular e fibrose intersticial, através de análise histológica. Foi também analisado o efeito da pirfenidona na inflamação local, através da avaliação dos componentes celulares (macrófagos, linfócitos e miofibroblastos) e da análise da atividade proliferativa (PCNA), através de imuno-histoquímica. Além disso, foi investigado o efeito da pirfenidona na atividade das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) por zimografia.

Além de analisar o efeito isolado da pirfenidona na nefropatia crônica progressiva experimental, o presente projeto se propôs a analisar o efeito da associação da pirfenidona ao losartan, micofenolato mofetil (MMF) e hidralazina, visando o bloqueio efetivo da progressão da doença renal.

Os resultados obtidos demonstraram que em modelo experimental de nefropatia crônica a monoterapia com pirfenidona em dose alta apresenta um importante efeito renoprotetor. A associação desta droga, com efeito anti-fibrótico, ao losartan, MMF e hidralazina produziu efeito ainda mais marcante demonstrando que a associação de drogas que agem em diferentes mecanismos patogênicos, podem representar uma importante alternativa de tratamento para a doença renal crônica progressiva.

Descritores: 1. Piridonas/uso terapêutico 2. Nefropatias
3. Fibrose/fisiopatologia 4. ratos Wistar

SUMMARY

Pereira,CA. *Effects of pirfenidone in an experimental model of chronic progressive renal disease* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007.

Considering the importance of the mechanism of fibrosis in the chronic progressive renal disease, the present project aimed to study the effect of pirfenidone, potentially antifibrotic drug, in the renal injury in experimental model of progressive renal disease. The experimental model of progressive renal disease was used, through the chronic inhibition of the synthesis of nitric oxide. The induction of the renal disease was made using male Wistar rats that had received L-NAME (200 mg/L in the water of the water through) and high salt diet (3.2% Na⁺) during 30 days. After the period of treatment (30 days) the degree of renal injury measured by the albuminuria and serum creatinine, and the interstitial degree of glomerulosclerosis and fibrosis was evaluated. The effect of pirfenidone on metalloproteinases MMP2 e MMP9 was investigated by zymography. The effect of pirfenidone in the local of inflammation was also analyzed by evaluating of the cellular components (macrophages, lymphocytes and myofibroblasts) and the analysis of the proliferative activity (PCNA), by means of immunohistochemistry. Besides analyzing the isolated effect of pirfenidone in the experimental chronic model of progressive renal disease, the present project analyzed the effect of the association of pirfenidone to losartan, mycophenolate mofetil (MMF) and hidralazine, aiming at the effective blockade of the progression of the renal disease. The results demonstrated that in experimental chronic progressive renal the monotherapy with pirfenidone presents an important renoprotector effect. The association of this drug, with antifibrotic effect, to losartan in, MMF and hidralazine presented a marked renoprotector effect, demonstrating that the association of drugs that act in different mechanisms, can represent an important alternative of treatment for the progression of the renal disease.

Descriptors: 1. piridone/ , 2.kidney disease,
3.fibrosis/fisiopathology 4. Wistar rats.

I – INTRODUÇÃO

A progressão das doenças renais apresenta mecanismos específicos que atuam desde o insulto inicial até a fibrose cicatricial. Independente da causa primária da doença renal, o padrão histológico comum às nefropatias crônicas inclui o desenvolvimento de glomerulosclerose e fibrose intersticial.

Diversos fatores levam à lesão renal provocando a disfunção deste órgão (ZATZ et al., 2002). Dentre as condições clínicas representantes de doença renal progressiva, podemos incluir as glomerulopatias, a nefropatia diabética, a nefroesclerose hipertensiva, as nefropatias túbulo-intersticiais e a rejeição crônica ao aloenxerto entre outras (KINCAID-SMITH et al., 2004; FORMAN et al., 2006).

Após um insulto inicial, ocorre uma deterioração progressiva da função renal, caracterizada por alterações da hemodinâmica renal e inflamação local (NORONHA et al., 2002). O processo de fibrose resultante destes eventos tem como principal consequência a perda de um grande número de néfrons (SCHOR et al., 1998).

A participação dos mecanismos hemodinâmicos é relevante principalmente por desencadear a hipertensão glomerular (ZATZ et al., 1990; HERRERA-ACOSTA et al., 1994; DIRKS et al., 1994), a qual é composta pelas etapas de agressão endotelial, estiramento mesangial com acúmulo dos componentes da matriz extracelular, lesão dos podócitos e aumento do transporte de macromoléculas como albumina, frações do complemento, transferrina e lipídios.

Além disso, fenômenos celulares inflamatórios, citocinas e fatores de crescimento fazem parte dos mecanismos de propagação da lesão renal após o insulto inicial (KELLEY et al., 1993; REMUZZI et al., 1997;

NORONHA et al., 2002). Nos últimos anos, tem sido intensamente investigada a participação de mecanismos celulares e inflamatórios não somente nas fases iniciais das glomerulopatias, como também na progressão das doenças renais (FUJIHARA et al., 2001; IWANO et al. 2004; UTIMURA et al., 2004; MITCH, 2006). A infiltração de células inflamatórias como macrófagos, linfócitos e mastócitos no rim ocorrem tanto em processos de origem imunológica como também em modelos experimentais de origem não imunológica (FUJIHARA et al., 1998; JONES et al., 2003; BLANK et al., 2007).

I.1 – Fibrose renal

Com o processo inflamatório instalado, tem início a fibrogênese, onde duas etapas são fundamentais para o desenvolvimento da fibrose. A primeira consiste na migração, proliferação e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e a segunda caracteriza-se pela excessiva produção e deposição de matriz extracelular preenchendo desordenadamente o espaço intersticial.

Os fibroblastos são as principais células efetoras da fibrogênese. Neste processo, apresentam alta taxa de proliferação, bem como a capacidade de se transdiferenciar em miofibroblastos (RUIZ-ORTEGA et al., 1997; GROTHENDORST et al., 2005; DARBY et al., 2007;). Os miofibroblastos apresentam semelhança fenotípica com as células da musculatura lisa vascular e podem ser identificados através da expressão da proteína α -actina de músculo liso (*alpha-smooth muscle actin*) (GABBIANI, 2003). Esta é uma proteína constituinte do citoesqueleto e, por isto, está implicada na habilidade do miofibroblasto se contrair e assim retrair o tecido

no processo de cicatrização (SAWASHIMA et al., 2000). O aparecimento de miofibroblastos no mecanismo de fibrogênese é resultado de um processo de diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (onde fibroblastos adquirem filamentos de α -actina) ou mesmo resultado de um processo de transdiferenciação a partir de células tubulares renais (JINDE et al 2001; LAN, et al. 2003). Neste processo de adquirir filamentos de α -actina as células apresentam uma mudança fenotípica (de aspecto cuboidal para alongado) (GABBIANI, 2003). Ambos os processos são desencadeados e estimulados pela presença de citocinas fibrogênicas como TGF- β , PDGF, TNF- α , FGF, interleucina-1 e angiotensina II produzidas no local do processo inflamatório (DESMOULIERE et al., 1993; RUIZ-ORTEGA et al., 1997; KRUM et al., 2007). O aumento da expressão de α -actina está diretamente relacionado com a progressão das doenças renais e está sendo considerado um marcador prognóstico (YANG et al., 1974; STRUTZ et al., 1996; SAWASHIMA et al., 2000).

Outra característica da fibrose é o acúmulo de proteínas da matriz extracelular (MEC) no interstício renal (ZEISBERG et al., 2000; KLIEM et al., 1996). Com o processo instalado, ocorre um aumento da síntese dos componentes da matriz, sejam eles protéicos como os colágenos (I, III, IV, VI e VII) e a fibronectina, glicoproteicos (tenascina e laminina), proteoglicanos extracelulares ou polissacarídeos. No entanto, o aumento da MEC, que ocorre durante a progressão da doença renal, é consequência não só do aumento da síntese dos seus componentes, mas também da redução da taxa de degradação desses elementos (BARONI et al., 1999; CHENG et al., 2006). Dentre os fatores envolvidos na regulação da MEC destacam-se a

produção de plasmina a partir do plaminogênio, o inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), as metaloproteinases (MMPs) e os inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPS) (STERNLICHT, 2001; CATARINA et al., 2006).

Assim, a fibrose intersticial depende da ativação, proliferação, migração e diferenciação de vários tipos celulares incluindo principalmente fibroblastos, miofibroblastos, macrófagos e células epiteliais dos túbulos renais. Neste processo de reparação e cicatrização tecidual destaca-se o fator de crescimento TGF- β (*transforming growth factor- β*).

1.2 – TGF- β

O TGF- β é membro da superfamília TGF que abrange um grande número de proteínas extracelulares solúveis. Apresenta-se sob a forma de polipeptídeos capazes de ativar, induzir e inibir o crescimento e/ou a diferenciação celular, sendo um de seus efeitos biológicos mais relevantes a habilidade de regular a produção e a degradação (“*turnover*”) da MEC. Esta propriedade confere ao TGF- β a característica de fator fibrogênico (COHEN, 1995; EDDY, 2005; GAGLIARDINI et al., 2007).

Um efeito primário do TGF- β é o aumento da síntese de proteínas da matriz, como o colágeno, a fibronectina e proteoglicanos, levando ao acúmulo de MEC (BORDER et al., 1990; DOUTHWAITE et al., 1999). Além disso, o TGF- β inibe a degradação da MEC por inibir a expressão das MMPs e induzir a expressão e a ativação do PAI e dos TIMPs (SCHNAPER, et al., 1996; KRAG, et al., 2000; WANG et al., 2005).

Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a importância do TGF- β no desenvolvimento da fibrose renal (SHARMA et al., 1993; YAMAMOTO et al., 1996; BORDER et al., 1997). Em 1990, Border et

al. em modelo experimental de glomerulonefrite, demonstraram que a administração de anti-TGF- β suprimiu o aumento da produção de MEC, atenuando histologicamente a manifestação da glomerulonefrite. Ainda nesta década, em nova pesquisa, Border et al. (1992) ao utilizarem decorina (um proteoglicano regulador natural da atividade do TGF- β) em ratos com glomerulonefrite proliferativa mesangial, demonstraram que sua administração levou à inibição do processo de produção aumentada de MEC, além de atenuar os sintomas da doença. Em 1993, Isaka et al. transfectaram o gene de TGF- β em rim de rato normal, causando um aumento da expressão glomerular de TGF- β . Houve aumento da matriz extracelular com lesão glomerular grave, progredindo posteriormente para uma glomerulosclerose.

I.3 – Plasminogênio e PAI

Um sistema envolvido na degradação de moléculas da MEC é a cascata de ativação da plasmina. A plasmina é gerada a partir do plasminogênio que sofre a ação do ativador do plasminogênio (*PAI, plasminogen activator*). Esta reação é controlada pelo PAI-1, que está relacionado com a formação de fibrose intersticial em modelos experimentais (BARNES et al., 1995; KEETON et al., 1995; DUYMELINCK et al., 1997; EDDY et al., 2006).

O PAI-1, identificado há cerca de 20 anos, tem papel proeminente na regulação da fibrólise extra e intravenosa (KRUITHOF, 1988). Além disso, o PAI-1 está envolvido em uma variedade de outros processos biológicos incluindo a remodelagem da MEC, mobilidade celular, implantação do embrião, desenvolvimento e proliferação tumoral. O PAI-1 também está

relacionado a vários processos patológicos tais como a formação tromboembólica de certas doenças, da aterosclerose e da fibrose, particularmente nos rins e no pulmão. A inibição da síntese e/ou da atividade do PAI-1 parecem ser mecanismos importantes que podem ter implicações terapêuticas, inclusive na doença renal (KRAIG et al., 2005).

I.4 – Metaloproteinases

As metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem um importante grupo de endopeptidases responsáveis pela degradação da maioria das macromoléculas da MEC. As MMPs participam de diversos processos fisiológicos e patológicos, tais como na embriogênese normal e em remodelagem tecidual nos muitos processos de doenças como artrite, câncer, periodontites, osteoporose e também nas nefropatias.

Todos os membros da família das MMPs são secretados como precursores que perdem peptídeos de aproximadamente 10.000 daltons durante a ativação. Muitos fatores (citocinas, fatores químicos, fatores de crescimento, envelhecimento celular) podem regular a expressão das MMPs no nível transcricional (STERNLICHT & WERB, 2001).

Ao ser sintetizada, a estrutura da MMP é mantida latente no interior da célula pela presença de um resíduo conservado de cisteína ligada ao íon zinco presente no sítio ativo, imprescindível para o funcionamento da protease (STERNLICHT & WERB, 2001). A ativação da MMP depende da separação da cisteína do zinco, o que pode ocorrer tanto por ação de proteases (específicas ou não), como por agentes químicos que desestabilizam a ligação entre o aminoácido e íon zinco (sais de mercúrio, íons superóxido e dissulfetos). No espaço extracelular, a atividade das MMPs é controlada por inibidores específicos, os TIMPs (MARTI, 2000).

No rim, as MMPs são produzidas pelas células glomerulares e pelas células tubulares. A hipótese de que as MMPs desempenham um papel importante na progressão das nefropatias é baseada principalmente em sua habilidade de degradar os componentes da ECM, associada a presença de uma expressão alterada nas doenças renais. Além disso, especificamente a MMP-2 induz ou sustenta um fenótipo inflamatório das células mesangiais. (MARTI, 2000).

Entretanto, visto que ainda sabe-se pouco a respeito dos padrões funcionais das MMPs e seus inibidores (os TIMPs), supõem-se que a regulação anormal de MMPs e de TIMPs represente uma causa, ou simplesmente um efeito e uma consequência da progressão das doenças renais. Ainda assim, nas nefropatias as MMPs parecem desempenhar um papel duplo, podendo atuar tanto como enzimas antiinflamatórias como também como mediadores pró-inflamatórios. Sua função biológica exata no desarranjo estrutural das células renais pode depender do nível elevado de sua atividade na progressão das doenças renais. (MARTI, 2000; STERNLICHT et al., 2001).

I.5 -Modelo de nefropatia crônica induzida pela inibição da síntese do óxido nítrico

Em 1980, Furchgott e colaboradores realizaram um estudo no qual verificaram que o relaxamento arterial induzido pela acetilcolina estava relacionado à integridade do endotélio vascular, pois após a retirada do tapete endotelial a aorta era incapaz de relaxar (FURCHGOTT & ZAWADRKI, 1980). Considerou-se então, que o endotélio produzisse uma substância intermediária entre o neurotransmissor e a ação de relaxamento

arterial. Esta substância foi denominada fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), o qual foi posteriormente identificado como sendo o óxido nítrico (NO), (PALMER et al., 1987).

O NO é gerado a partir de reações de redução catalizadas por um grupo de enzimas conhecidas como sintetases de NO. Estas enzimas catalizam uma reação tendo a L-arginina como substrato e a citrulina e o NO como produtos.

Ao se inibir cronicamente a síntese do NO, usando um análogo da L-arginina, o N^o-nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME), ocorre hipertensão arterial que se mantém enquanto perdurar o efeito do L-NAME. A hipertensão arterial é acompanhada de aumento marcante da pressão hidráulica capilar (RIBEIRO et al., 1992; BAYLIS et al., 1996). Além disso, sem a síntese de NO há aumento da proliferação de células mesangiais e a inibição da adesão e agregação de plaquetas (GARG et al., 1989; BROEKMAN et al., 1991). Assim, a administração crônica de L-NAME leva ao comprometimento renal, onde pode ser observado o aparecimento de glomerulosclerose, isquemia glomerular (colapso do tufo glomerular com estrangulamento capilar e pronunciado espessamento da membrana basal com freqüente duplicação) e expansão intersticial (infiltração de células inflamatórias, migração de miofibroblastos e depósito excessivo MEC), (RIBEIRO et al., 1992; FUJIHARA et al., 1994).

A sobrecarga de sal pode acentuar tais efeitos, levando a um quadro de hipertensão arterial e glomerular mais graves e associadas a albuminúria

maciça (FUJIHARA et al., 1994; YAMADA et al., 1996; ARCOS et al., 2000; GRACIANO et al., 2004).

Os eventos anteriormente citados levam à formação de fibrose no modelo da inibição da síntese do NO, o que o torna consistente para estudos de possíveis terapias para as nefropatias crônicas progressivas.

I.6 – Tratamento das nefropatias progressivas

Muitos dos graves mecanismos envolvidos na progressão da doença renal já foram identificados, mas ainda não foi obtido um tratamento eficiente da progressão da doença.

Apesar dos avanços relacionados ao reconhecimento dos mediadores do processo inflamatório, a patogênese da fibrose renal continua muito pouco compreendida. A fibrose túbulo-intersticial é a via final comum das nefropatias levando à insuficiência renal crônica (OKON, 2003). A gravidade da inflamação nesta região e o grau de fibrose têm sido considerados como determinantes da lesão renal progressiva e parâmetros de prognóstico tanto em doenças renais em humanos como em modelos experimentais. O emprego de modelos experimentais tem permitido uma melhor compreensão da progressão das doenças renais e, desta forma, possibilitado a investigação de estratégias terapêuticas que interfiram neste processo. Terapias com o uso de anti-hipertensivos, antiinflamatórios, anticoagulantes, dietas, além de outras, têm sido fortemente exploradas, com sucesso apenas parcial (WU et al., 1997; FUJIHARA et al., 1998; IKEGUSHI et al., 2002; GONÇALVES et al., 2004; SRINIVASAN et al., 2005; BLOUDICKOVA et al., 2006).

Há várias terapias atualmente em uso, que levam a uma queda dos níveis da pressão arterial, tanto em modelos experimentais como na clínica. Drogas que agem como bloqueadores da angiotensina como o losartan, inibidores da enzima conversora da angiotensina como o enalapril e vasodilatadores como a hidralazina têm sido utilizadas (RANG et al 1999; ELLERSHAW e GURNEY, 2001; SRINIVASAN et al., 2005).

Estudos clínicos e experimentais focando apenas a inibição da hipertensão arterial mostraram que não há reversão da progressão da doença renal quando apenas a pressão arterial é normalizada. Tais resultados indicam que os mecanismos envolvidos na progressão da doença renal foram apenas parcialmente controlados.

O uso de intervenções terapêuticas alternativas e mais eficientes, como por exemplo, a utilização em paralelo de drogas que ajam sobre o processo inflamatório, com o intuito de obter um quadro de renoproteção mais amplo se faz necessário. Partindo-se desta constatação, terapias associando drogas anti-hipertensivas como as citadas acima, e antiinflamatórias não esteróides como nitroflurbiprofen, inibidores da COX-2, imunomoduladores específicos com ação na inibição de linfócitos T, além de imunossupresores como o micofenolato mofetil (MMF), têm sido sugeridas. (FUJIHARA et al., 1998; FUJIHARA et al., 2003; GONÇALVES et al., 2004).

Entretanto, a associação de drogas que controlam a pressão arterial e de drogas antiinflamatórias também não tem mostrado um bloqueio por completo da progressão da doença renal. Uma vez que o depósito de componentes da MEC é considerado um dos principais mecanismos de desarranjo estrutural renal conduzindo à perda de função nas doenças progressivas, o uso de um fármaco que possa inibir ou reduzir a formação de fibrose renal parece ser uma alternativa promissora (em associação com

as drogas anti-hipertensivas e os antiinflamatórios e/ou imunossupressores). Uma droga agindo diretamente na deposição da MEC parece ser essencial para o bloqueio da fibrose e eventualmente, para sua reversão. Neste contexto, estudos preliminares usando a pirfenidona têm mostrado efeito promissor em diminuir a fibrose intersticial (KEHRER et al., 1997; SHIMIZU et al., 1998; LASKY et al., 2001; MIRIC, et al., 2001; SHIHAB et al., 2002).

I.7– Pirfenidona

A pirfenidona (5-methyl-1-phenyl-2-(1H)-pyridone) é um agente antifibrótico que tem se mostrado eficiente na prevenção da deposição de colágeno e no bloqueio da expansão da fibrose em uma variedade de modelos experimentais.

Os primeiros estudos foram realizados em modelos de fibrose pulmonar e, em seguida, foram realizados estudos clínicos preliminares em pacientes com insuficiência pulmonar crônica, com resultados animadores (KEHRER et al., 1997; LASKY et al., 2001). A partir destes estudos, a pirfenidona foi utilizada em modelos de nefropatia crônica também com resultados promissores, reduzindo a fibrose em casos de nefropatia diabética, fibrose pós-obstrução ureteral e em nefrotoxicidade a ciclosporina e tacrolimo (SHIMIZU et al., 1998; MIRIC et al., 2001; SHIHAB et al., 2002; BROOK, 2005).

A pirfenidona parece diminuir a expressão de TGF- β , a expressão de colágeno e fibronectina (SHIMIZU et al., 1998), sugerindo que também possa inibir a proliferação de fibroblastos (HEWITSON et al., 2001). Em 2005, LIU e cols, demonstraram haver uma ligação entre o efeito antifibrótico da pirfenidona e a inibição da atividade da arginase, uma enzima essencial para a síntese do colágeno (MORRIS et al., 2003). A expressão da

arginase é induzida *in vitro* e *in vivo* pelo TGF- β (BOUTARD et al., 1995; KEHRER et al., 1997; IYER et al., 1999; BIVALACQUA, 2001; SHIHAB et al., 2002). A pirfenidona, ao suprimir a expressão do TGF- β , leva à inibição da atividade da enzima arginase e, conseqüentemente à queda na taxa de síntese de colágeno. Com estas características, a pirfenidona tem sido apontada como uma droga com potencial efeito anti-fibrótico.

Considerando-se a importância do mecanismo de fibrose na doença renal crônica progressiva, o presente projeto visou estudar o efeito da pirfenidona, uma droga potencialmente anti-fibrótica, em modelo experimental de nefropatia crônica progressiva, induzida através da inibição da síntese do óxido nítrico.

Adicionalmente, levando-se em consideração a complexidade dos mecanismos envolvidos na progressão da doença renal, o presente projeto se propôs a analisar o efeito da associação da pirfenidona a drogas que controlam a hipertensão arterial e o quadro inflamatório. Tal abordagem pode ser o ponto chave para o bloqueio, e até mesmo a reversão das nefropatias progressivas.

Inicialmente, utilizamos uma droga inibindo a ação da angiotensina II (losartan) e uma outra droga anti-hipertensiva (hidralazina), levando à diminuição da hipertensão arterial. Além disso, a inibição da atividade da angiotensina II também contribui para a diminuição da produção de mediadores pró-inflamatórios e pró-fibróticos como, por exemplo, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e TGF- β , respectivamente. Em associação, usamos micofenolato mofetil (MMF), que tem um efeito anti-proliferativo para linfócitos, além de ser inibidor da expressão de moléculas de adesão,

levando à diminuição do influxo de células inflamatórias para o parênquima renal. Utilizamos também uma droga anti-fibrótica, a pirfenidona, levando a diminuição da síntese de colágeno e de deposição de MEC, bloqueando a fibrogênese.

Em associação, estas drogas podem agir em sinergia, ampliando seus efeitos renoprotetores, o que pode vir a constituir uma terapia mais eficiente para o tratamento das nefropatias crônicas progressivas.

II – OBJETIVOS

1ª FASE – “in vivo”

O objetivo do estudo foi o de analisar o efeito da droga pirfenidona na fibrose renal no modelo de inibição crônica da síntese do óxido nítrico (NAME). Além disso, esta fase teve como objetivo analisar o efeito da associação da pirfenidona com losartan, MMF e hidralazina no mesmo modelo proposto.

Mais especificamente, foram analisados os efeitos destes tratamentos, através da:

1. Avaliação da medida da pressão arterial, da dosagem de albuminúria e creatinina sérica;
2. Avaliação da lesão renal através da análise histológica do grau de glomerulosclerose e de isquemia glomerular, pela coloração de PAS;
3. Avaliação do grau de fibrose renal através da análise histológica, pela coloração de Tricrômio de Masson;
4. Análise da expressão de metaloproteinases (MMPs) tipos 2 e 9, para avaliar a participação do mecanismo de degradação da MEC
5. Análise do componente inflamatório quantificando o número de macrófagos, linfócitos T e miofibroblastos (através da expressão de α -actina) nos diferentes grupos;
6. Análise da atividade proliferativa das células renais, através da marcação com antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA);

2ª FASE – “in vitro”

O objetivo da segunda fase foi o de investigar o possível mecanismo de ação da pirfenidona sobre fibroblastos renais derivados de explante de rim de rato e fibroblastos derivados de linhagem (NRK-49F) em cultura. Os fibroblastos foram estimulados com interleucina 1 β (IL-1 β) e angiotensina II.

Assim, o objetivo deste estudo foi o de avaliar o efeito da pirfenidona sobre:

1. Atividade proliferativa dos fibroblastos, medida através da incorporação da [^3H] timidina;
2. Expressão de colágeno I e colágeno III em fibroblastos medida através de RT-PCR;
3. Expressão de TGF- β , através de RT-PCR e dosagem de TGF- β no sobrenadante de cultura celular (ELISA).

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. ESTUDO “*in vivo*”

III.1.1. Animais

Foram utilizados 69 ratos Wistar machos, entre 7 e 8 semanas de idade. Os animais foram obtidos de uma colônia mantida pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Toda metodologia aplicada para o estudo foi aprovada pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (protocolo nº 730/01).

Para sacrifício dos animais foi administrado pentobarbital sódico a 3%, injetado intraperitonealmente, em dose letal (80mg/kg).

III.1.2. Dietas

As dietas foram fornecidas aos animais em forma de ração e foram obtidas comercialmente (Rhoster, Brasil). Duas diferentes dietas foram utilizadas durante o trabalho: dieta hipersódica – HS (3,2% de sódio e 25% de proteína) e dieta hipersódica (3,2% de sódio e 25% de proteína) acrescida de pirfenidona adquirida através de contrato de colaboração com a empresa norte americana Marnac Inc., na concentração 0,075%. Esta ração com pirfenidona foi preparada pela empresa brasileira Rhoster e entregue pronta para o uso. Os animais tiveram livre acesso à dieta e à água.

III.1.3. Indução do modelo experimental de nefropatia crônica progressiva

A nefropatia crônica foi induzida pela inibição crônica da síntese do óxido nítrico associada à dieta hipersódica. A síntese do óxido nítrico foi inibida utilizando-se o N^o-nitro-L-arginina metil-éster (L-NAME), (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA). O L-NAME foi misturado na água do bebedouro na concentração de 70mg/kg/dia. Os animais tiveram livre acesso à água, a qual foi medida diariamente para o controle da ingestão de L-NAME.

III.1.4. Drogas terapêuticas

As drogas utilizadas para fim terapêutico foram: **pirfenidona** (PIRF) na dose de 750 mg/Kg/dia misturada na ração; **losartan** (LOS), (Cozaar, Merck Sharp e Dohme) na dose de 500 mg/Kg/dia e **hidralazina** (HIDRA), (Nepresol, Cristalia prod. Quim. e farmac. Ltda., Brasil) na dose de 20 mg/Kg/dia, dissolvidos na água do bebedouro; **micofenolato mofetil** (MMF), (CellCept, Roche, Suíça) na dose de 10 mg/kg/dia, dissolvido em óleo de oliva contendo 5% de DMSO e administrado por gavagem. Óleo de oliva contendo 5% de DMSO foi utilizado como veículo e administrado por gavagem.

III.1.5. Grupos experimentais

Os animais de todos os grupos experimentais foram previamente adaptados à dieta hipersódica durante 15 dias. Após este período, todos os animais, exceto o grupo controle, foram submetidos ao tratamento com NAME+HS durante 30 dias com o objetivo de induzir a nefropatia crônica progressiva e foram tratados com pirfenidona, losartan, MMF e com esquema tríplice, conforme os diferentes grupos.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

1. **CONTROLE:** (n=10) animais recebendo dieta HS e Veículo por gavagem;
2. **NAME:** (n=13) animais que receberam L-NAME + dieta HS e Veículo por gavagem;
3. **LOS:** (n=7) animais que receberam L-NAME + dieta HS + LOS dose alta e Veículo por gavagem;
4. **MMF:** (n=12) animais que receberam L-NAME + dieta HS + MMF por gavagem;
5. **PIRF:** (n=9) animais que receberam L-NAME + dieta HS + PIRF + Veículo por gavagem;
6. **PIRF+LOS+HIDRA:** (n=9) animais que receberam L-NAME + dieta HS contendo PIRF + LOS + HIDRA e Veículo por gavagem;
7. **PIRF+LOS+MMF+HIDRA:** (n=9) animais que receberam L-NAME + dieta HS contendo PIRF+LOS+ HIDRA +MMF por gavagem.

Após o período de tratamento de 30 dias, os animais foram confinados em gaiolas metabólicas durante 24 horas para a coleta da urina. A urina foi reservada para dosagem de albuminúria. Os animais foram então retirados das gaiolas metabólicas e preparados para o sacrifício e realização da nefrectomia. Para isso foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (Cristalia, São Paulo, Brasil) (60mg/kg). O rim esquerdo foi seccionado em fragmentos coronais de aproximadamente 5mm. Um fragmento foi utilizado para análise histológica e de imuno-histoquímica e os demais para extração de proteínas.

A eutanásia foi realizada através de dose letal de pentobarbital sódico (80 mg/Kg), administrado pela via intraperitoneal.

O protocolo resumido é apresentado a seguir:

III.1.6. Pressão arterial

A pressão arterial foi medida pelo método oscilométrico e os valores obtidos correspondem à pressão arterial sistólica. Para tal medida, os ratos foram colocados em sala apropriada no período da manhã. A pressão caudal foi medida por meio de um equipamento acoplado a um transdutor de pressão (RTBP 2000 - Kent Scientific Corporation, Torrington, Connecticut, USA), o qual fornece um sinal analógico. Este sinal analógico foi digitalizado e registrado utilizando-se um sistema computadorizado de aquisição e análise dos dados utilizando o programa DASyLab 7.0 (DASyTec, National Instruments Company, Amherst, New Hampshire, USA). A pressão de cada animal foi verificada em três dias consecutivos antes do término do período de tratamento.

As medidas foram realizadas com os animais acordados e foram consideradas apenas aquelas obtidas em condição de ausência de movimentação do animal.

III.1.7. Albuminúria

Para a avaliação da albuminúria foi utilizado o método da imunodifusão radial, e para tal a urina foi processada da seguinte forma: O volume urinário excretado durante 24 horas foi medido e centrifugado a 1.500 rpm durante 10 minutos. Foi verificada a quantidade de proteína total excretada na urina para estimar a diluição adequada para a avaliação da albuminúria. Para tanto, 0,5 ml de urina foram misturados com 4,5 ml de uma solução de ácido sulfossalicílico 10% (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA). Em paralelo,

foram misturados 0,5 ml de cada padrão (0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml e 2,0 mg/ml de albumina bovina, Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA, em água destilada) com 4,5 ml da mesma solução de ácido sulfossalicílico. Após 10 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (Hitach U-2000, Pleasanton, EUA) sob comprimento de onda de 530nm. Através das absorbâncias dos padrões, construiu-se uma curva padrão. A concentração de proteína nas amostras de urina foi inferida a partir dos valores de absorbância plotados na curva padrão. Os animais que excretaram até 20 mg de proteína por 24 horas não tiveram suas urinas diluídas para a avaliação da albuminúria. Porém, animais que excretaram de 20 a 100 mg tiveram suas urinas diluídas 20 vezes em solução fisiológica e animais que excretaram acima de 100 mg tiveram suas urinas diluídas 40 vezes.

Placas de gel foram preparadas misturando 3 ml de agarose (Gibco RDL, Paisley, Escócia) 2% com 3 ml de uma solução de anticorpo anti-albumina de rato (Cappel, Aurora, EUA) 1:30 em tampão Tris-Barbital 0,06 M (pH 8,8). Após homogenização a 55°C, 1,25 ml desta solução foi colocada em uma placa de imunodifusão radial para 6 poços, sobre uma base plana. A agarose foi então solidificada a 4°C, por aproximadamente 4 horas em câmara úmida.

Cada poço foi perfurado e preenchido com 7,5 µl de amostra de urina (pura ou previamente diluída em solução fisiológica), sendo que 3 poços foram preenchidos com padrões de albumina de rato a 2,5 mg%, 10 mg% e 20 mg% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). A placa foi coberta com tampa de acrílico e colocada por 24 horas em câmara úmida a 4°C.

O halo formado em torno do poço foi medido com régua apropriada, a qual fornece o quadrado do diâmetro do halo em leitura direta. Foi construído uma curva padrão relacionando-se o quadrado do diâmetro observado com a concentração do padrão correspondente, através de regressão linear. A leitura do quadrado do diâmetro obtido para cada amostra foi plotada na curva padrão, obtendo-se a concentração de albumina da amostra em mg%.

III.1.8. Creatinina sérica

A dosagem da creatinina sérica das amostras de sangue colhidas foi feita através de um kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, Brasil) baseado na reação de Jaffé-picrato alcalino. Resumidamente, a creatinina do soro reage com a solução de picrato em meio alcalino, formando a 37°C um complexo de cor amarelada que é medido fotometricamente a 510 nm. A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromogênios, que também é medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina verdadeira, em mg/dL.

III.1.9. Histologia

III.1.9.a. Parafinização e desparafinização

Os fragmentos de rim de aproximadamente 5mm 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.

O processo de parafinização foi realizado pelo processador automático de tecido “histoquine” (Jung-Histokinette 2000 Leica, Nussloch, Alemanha) e durou cerca de 14 horas. O processo foi iniciado pela desidratação dos tecidos em álcoois com concentrações progressivas (álcool 50%, álcool 70%, álcool 96% (2 banhos), álcool absoluto (2 banhos), seguida da diafanização, passando os tecidos em uma solução de álcool absoluto + xilol (v/v) e em três banhos de xilol, sendo então imersos em parafina fundida a 60°C. O material parafinado foi incluído em blocos/moldes e permaneceu em temperatura ambiente.

Os blocos de parafina permaneceram 30 minutos a -20°C e, em seguida, foram cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) com navalhas descartáveis. Os fragmentos, com espessura de 3 a 4 µm, foram aderidos em lâminas previamente revestidas por gelatina 2% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). As lâminas com os cortes permaneceram em estufa (Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil) a 60°C por 2 horas e em seguida foram armazenadas a 4°C.

Para a realização das colorações histológicas, as lâminas passaram por um processo de desparafinização, ou seja, permaneceram 9 minutos em xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 2 vezes. Em seguida, as lâminas foram desidratadas, através de banho em etanol absoluto (2 vezes) (Merck, Darmstadt, Alemanha), etanol 96% e etanol 70%. Para finalizar este

processo, as lâminas foram imersas em água destilada e processadas para as colorações histológicas.

III.1.9.b. Coloração de PAS

Após terem passado pelo processo de desparafinização, as lâminas foram lavadas em água destilada e permaneceram em ácido periódico 1% durante 10 minutos, sendo lavadas em seguida em água destilada. As lâminas foram coradas pelo reativo de Schiff durante 45 minutos, em ambiente escuro, e lavadas em água corrente durante 10 minutos. A contra-coloração foi realizada com a hematoxilina de Harris por 5 minutos, lavadas em água corrente e montadas com lamínulas Com o meio permanente Permunt (Fisher Chemical, Pittsburgh, EUA).

A coloração do PAS foi utilizada para a avaliação dos índices de glomeruloesclerose (GS) e isquemia glomerular (IG), examinando-se sucessivamente um número aproximado de 250 glomérulos por lâmina. A glomeruloesclerose se caracteriza por expansão da matriz mesangial, obstrução das alças capilares e formação freqüente de sinéquias no tufo glomerular da cápsula de Bowman, enquanto que a isquemia glomerular apresentasse com espessamento da membrana basal além do colapso das alças glomerulares levando à redução da área glomerular. A freqüência de cada categoria de lesão glomerular é expressa como porcentagem total do número de glomérulos acometidos (GS% ou IG%).

III.1.9.c. Coloração de Tricrômio de Masson

Após desparafinização, as lâminas foram imersas em uma solução de hematoxilina de Harris durante 5 minutos. Em seguida, foram lavadas rapidamente em água corrente, permanecendo no escarlate de Briebrich (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) durante 5 minutos e novamente lavadas em água corrente. Em seguida, as lâminas foram submersas em diferenciador de Masson durante 5 minutos, seguindo-se para uma solução de anilina a 5%. As lâminas foram então lavadas em água corrente. O próximo procedimento foi a lavagem das lâminas em água acética a 1%, para a fixação da anilina. Em seguida, as lâminas passaram pelo processo de desidratação e diafanização e foram montadas com meio permanente Permout (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A coloração pelo tricrômico de Masson foi utilizada para analisar a expansão intersticial provocada pela deposição de material Masson-positivo (colágeno). A expansão foi determinada pela técnica de contagem de pontos. Esta técnica consiste em um sistema de microscópio acoplado a um monitor de vídeo com uma ocular graticulada de 110 pontos. Foram contados os pontos que correspondiam à área ocupada por material Masson-positivo (colágeno), analisando-se 25 campos consecutivos sob um aumento de 200x. Os resultados foram apresentados em porcentagem de área ocupada.

III.1.10. Zimografia

III.1.10.a. Extração de proteínas

Os fragmentos de córtex renal congelados (-80°C) foram imersos e em 1,5 ml de solução de lise (NP40 1%, NaCl 0,135M e Tris 0,01M, pH 8,0), (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA.) e homogenizado, em banho de gelo, com dispersador de tecidos (IKA – Labortechnik Ultra Turrax T25 Janke& Kunkel, Alemanha). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 10.000 RPM a 4° C por 10 minutos e o sobrenadante foi recuperado. A concentração protéica das amostras foi determinada como descrito pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As amostras foram armazenadas a -20°C até a utilização.

III.1.10.b. Separação das proteínas em gel de acrilamida

As amostras foram fracionadas em gel de poliacrilamida na concentração de 10% acrilamida (solução estoque de acrilamida/bisacrilamida (30:1) 30% p/v, suficiente para a concentração final de 10%, tris-HCl (pH=8,8), 0,375M, gelatina 0,01%, SDS 0,01% p/v, persulfato de amônia 0,05% p/v e TEMED 0,1% v/v).

A concentração de acrilamida do gel de empilhamento era de 5% (solução estoque de acrilamida/bisacrilamida (30:1) 30% p/v, suficiente para a concentração final de 5%, 0,125 M Tris-HCl pH=6,8, SDS 0,01%, persulfato de amônia 0,05% p/v e TEMED 0,1% v/v).

Os géis foram polimerizados em cuba especial para eletroforese vertical, o “apparatus” Mini-Protean II (Bio-Rad, Hércules, EUA), e

preenchidos com tampão de corrida (0,192 M glicina, 0,125 M tris-base, e 0,2% SDS p/v).

Imediatamente antes de serem aplicadas no gel, as amostras de proteína total (60 µg) foram ressuspensas em tampão de Laemli não desnaturante (tris-HCl, 0,12M, glicerol 20% v/v, azul de bromofenol 0,1% p/v (Sigma Chemical Co, EUA) e aquecidas à 55°C durante 5 minutos e transferidas para banho de gelo por 5 minutos.

As amostras foram aplicadas no gel de empilhamento e submetidas a uma voltagem constante de 80 volts por aproximadamente ½ hora até atravessarem o gel de empilhamento, e em seguida a 140 Volts por cerca de 1 hora e meia para a separação o fracionamento eletroforético no gel de separação, contendo gelatina.

III.1.10.c. Incubação dos géis para digestão da gelatina

Após a eletroforese, o gel foi retirado do conjunto e colocado em recipiente com 50 ml solução de Triton X-100 a 2,5%, com duas trocas de 15 minutos a temperatura ambiente, sob agitação. Foi retirada a maior parte da solução mantendo-se aproximadamente 2 ml, aos quais foi acrescentada 100 ml de solução de incubação, contendo (0,15 g), NaCl (0,87 g) e tris (0,05 M pH 7,3), e o recipiente foi fechado e colocado em estufa a 37° C por 48 horas.

III.1.10.d. Revelação das bandas de metaloproteinases

Após a incubação o gel foi fixado em solução de metanol 45% e ácido acético 10% (v/v) por um período de 2 horas, e em seguida transferido para a solução de coloração (metanol 45%, ácido acético 10% (v/v) e Comassie Blue R-250 0,5% (p/v)), onde permaneceu por um período de 24 horas, sob agitação. O gel foi então submetido à descoloração em solução de fixação até a visualização das áreas onde a gelatina foi digerida (bandas completamente descoradas). A imagem do gel foi capturada e digitalizada, e as bandas analisadas e quantificadas pelo software Image Master (Amersham-Pharmacia), com o resultado expresso em Unidade Arbitrária (U.A.).

III.1.11. Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi utilizada para identificar macrófagos, linfócitos T, miofibroblastos (α -actina de músculo liso) e células em atividade proliferativa (PCNA).

Para a realização da técnica de imuno-histoquímica, as lâminas 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.

Durante o processo de parafinização pode ocorrer o “mascaramento” de antígenos no tecido, dificultando assim sua detecção, e para melhorar a

exposição antigênica foi utilizada a técnica do micro-ondas. Para tanto, as lâminas foram imersas em tampão citrato (ácido cítrico 10 mM, pH 6,0) e levadas para o forno micro-ondas (Sanyo, São Paulo, Brasil) com potência de 2400 watts durante 15 minutos. As lâminas permaneceram no tampão até atingir a temperatura ambiente. As lâminas foram então hidratadas em solução TBS (salina- tris tamponada, contendo NaCl 0,0135 M e Tris 0,050 M, pH 7,6), ou em solução PBS (salina fosfato-tamponada NaH_2PO_4 0,025 M, Na_2HPO_4 0,007 M e NaCl pH 7,4).

Os anticorpos utilizados foram titulados em experimentos anteriores e o controle negativo foi feito omitindo o anticorpo primário.

III.1.11.a. Identificação de macrófagos

Os macrófagos foram identificados no tecido renal através do anticorpo monoclonal anti-monócito/macrófago de rato (anti-ED-1) (Serotec, Raleigh, EUA), produzido em camundongo. O método de imuno-histoquímica utilizado para a marcação deste anticorpo foi o APAAP (*alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase*). Todo o processo foi realizado em câmara úmida.

Após a desparafinização e a técnica do micro-ondas, as lâminas foram incubadas com soro de coelho (1:20 em TBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente, para bloqueio inespecífico. Em seguida, foi retirado o excesso de soro e as lâminas foram incubadas com o anticorpo anti-ED1, diluído 200 vezes em TBS, durante a noite, a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com TBS durante 5 minutos e incubadas com o anticorpo de coelho anti-camundongo (RAM), (Dako, Burlingame, EUA),

diluído 50 vezes em TBS, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o complexo APAAP (Dako, Burlingame, EUA), diluído 70 vezes, durante 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas com TBS e submetidas à revelação.

Para a revelação, as lâminas foram incubadas com uma solução contendo substrato para a enzima fosfatase e o corante fast-red (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA), preparada da seguinte maneira: 1 mg de fosfato de naftol AS-MX (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) foram diluídos em 100 μ l de dimetilformamida (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, a solução foi diluída em 4,9 mL de tampão Tris 0,1 M (pH = 8,2) e 10 μ L de levamisol 1 M (Sigma Chemical CO, St 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 contracoradas com hemalumbre de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 2 minutos e lavadas em água corrente. As lâminas foram então montadas com glicergel (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Os macrófagos foram contados sob aumento microscópico de 200x. Foram contados 25 campos e a média foi expressa em células por mm^2 .

III.1.11.b. Identificação de linfócitos T e de miofibroblastos

A identificação de linfócitos T e de miofibroblastos foi realizada através dos anticorpos monoclonais de camundongo anti-linfócito T de rato (Harlan Sera-lab, Belton, Inglaterra) e anti- α -actina de músculo liso de rato (Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA), respectivamente. Para a marcação destes anticorpos foi utilizado o método estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina.

Após a desparafinização e recuperação antigênica, a biotina endógena do tecido foi bloqueada através da incubação com solução de avidina (Vector, Burlingame, EUA), seguida pela incubação com uma solução de biotina (Vector, Burlingame, EUA). As lâminas foram incubadas durante 15 minutos com cada uma das soluções e lavadas com TBS durante 5 minutos após cada uma. As lâminas foram então incubadas com soro de cavalo (Vector, Burlingame, EUA), diluído 70 vezes em TBS, durante 30 minutos e, após a retirada do excesso do soro, foram incubadas com imunoglobulina anti-linfócito T, 1:100 em TBS, ou imunoglobulina anti- α -actina de músculo liso, 1:800 em TBS, durante a noite, a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em TBS por 5 minutos e incubadas durante 45 minutos com anticorpo de cavalo anti-camundongo biotinilado, adsorvido em rato (Vector, Burlingame, EUA), diluído 200 vezes em TBS. Após lavagem de 5 minutos com TBS, as lâminas foram incubadas com o complexo estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina (Dako, Carpinteria, EUA) por 30 minutos, lavadas novamente com TBS e submetidas à revelação.

A solução de revelação contendo substrato para a fosfatase alcalina e fast red foi a mesma utilizada na identificação de macrófagos.

A revelação foi acompanhada sob microscopia em aumento de 100 X e as células positivas apresentaram coloração avermelhada. O tempo de revelação foi de aproximadamente 10 minutos. As lâminas foram contra-coradas com hemalumbre de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 2 minutos e lavadas em água corrente. As lâminas foram então montadas com glicergel (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Os linfócitos T foram contados sob aumento microscópico de 200x. Foram contados 25 campos e a média foi expressa em células por mm².

A quantidade de miofibroblastos presentes no espaço intersticial foi estimada através da marcação da proteína α -actina de músculo liso presente nas células deste compartimento. Para isto, foi utilizado o método de contagem de pontos. Esta técnica consiste em um sistema de microscópio acoplado a um monitor de vídeo com uma ocular graticulada de 110 pontos. Foram contados os pontos que correspondiam à área ocupada por α -actina.

III.1.11.c. Identificação de PCNA

As células em proliferação foram identificadas através do anticorpo monoclonal anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen) de rato produzido em camundongo (DAKO, Carpinteria, EUA), utilizando a técnica avidina-biotina-peroxidase.

Após a desparafinização e a técnica do micro-ondas, a peroxidase endógena do tecido foi bloqueada com uma solução de peróxido de hidrogênio 3% em metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 30 minutos. Após o bloqueio, as lâminas foram lavadas com água destilada e mantidas em PBS. Em seguida, procedeu-se ao bloqueio da biotina endógena como descrito acima para linfócitos e miofibroblastos. As lâminas foram então incubadas com soro de cavalo (Vector, Burlingame, EUA), diluído 70 vezes em PBS, durante 30 minutos e, após a retirada do excesso do soro, as lâminas foram incubadas com imunoglobulina anti-PCNA, diluída 100 vezes em PBS, durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo de cavalo anti-camundongo biotinilado absorvido em rato (Vector, Burlingame, EUA) na diluição 1:200 durante 45 minutos. Após lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas com o complexo ABC/peroxidase (Dako, Carpinteria, EUA) por 30 minutos, lavadas novamente com PBS e destinadas à revelação.

Para a revelação as lâminas foram incubadas com a seguinte solução: 0,01g de 3-amino-9-etilcarbazol (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram dissolvidos em 2,5 ml de dimetilformamida e, posteriormente, em 47,5 ml de tampão 0,01 M de ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 0,03 M de

acetato de sódio (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA), pH 5,0. Por fim, foi acrescido 0,25 ml de peridrol (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 3%.

A revelação foi realizada sob aumento microscópico de 100 vezes e durou aproximadamente 15 minutos, após o que as lâminas foram contracoradas com o corante verde de metila a 1% (Merck, Darmstadt, Alemanha). As células positivas apresentaram a cor marrom-acastanhada. As células em proliferação foram contadas sob aumento microscópico de 200x. Foram contados 25 campos e a média foi expressa em células por mm².

III.2. ESTUDO “*in vitro*”

III.2.1. Cultura Celular

Para este estudo foram utilizadas células provenientes de explante de rim de rato e também linhagem de fibroblastos renais (células ATCC - NRK-49F).

III.2.1.a. Cultura de fibroblasto renal a partir de explante renal

A cultura de fibroblastos renais foi realizada a partir de rins de ratos Wistar machos normais que receberam dieta normossódica. Ao atingirem 12 semanas de vida, os animais foram sacrificados e os rins retirados para o cultivo de fibroblastos. Foram utilizados cinco ratos Wistar normais para a formação do grupo experimental.

Estes animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (20 mg/kg), sendo feita tricotomia e assepsia com iodo-povidina e álcool 70%.

Usando campo e materiais cirúrgicos estéreis, foi feita a laparotomia, o pedículo renal pinçado e os rins retirados foram colocados numa solução de PBS refrigerado e estéril para a cultura (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 7,1 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM). Os frascos com os rins foram levados a uma bancada com fluxo laminar, esterilizados com luz UV por 30 minutos.

Numa placa de Petri com PBS, o rim foi dividido em córtex e medula sendo a medula desprezada. O córtex foi recortado, picotado até que fragmentos de cerca de 1mm³ fossem obtidos. Em seguida, os fragmentos foram lavados várias vezes com PBS para remover o sangue, restos de cápsula e gordura peri-renal. Cerca de 10 a 20 fragmentos foram transferidos para garrafas de cultura de 25 cm² de superfície com tampa com filtro bacteriológico (Corning Inc, Corning, NY, EUA). Foi adicionado 1 ml de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) aos fragmentos que então foram, uniformemente distribuídos pelas garrafas. As garrafas foram invertidas por 1 hora, em estufa a 37° C e 5% CO₂, para ajudar a fixar os fragmentos no plástico. As garrafas foram, então, colocadas em posição normal e deixadas em repouso na estufa por 24 horas. Nos três dias seguintes foi acrescentado 1 ml de meio de cultura DMEM (Gibco) com soro fetal bovino (SFB) a 20% (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo antimicrobianos (anfotericina-B 2,5 µg/ml, ampicilina 100 µg/ml e estreptomicina 100 µg/ml). A partir de então, três vezes por semana o meio de cultura foi trocado (4 ml/garrafa). Eventuais explantes que se desprenderam foram retirados. Em cerca de 2 semanas as células começaram a migrar dos explantes e a formar um tapete na garrafa. Os

fragmentos foram retirados para proporcionar maior área de crescimento para as células. Com algumas ilhas de células formadas, as mesmas foram tripsinizadas e transferidas para uma nova garrafa de 25 cm² onde foram distribuídas mais uniformemente. Esta etapa foi denominada passagem de uniformização ou “passagem zero”. Quando as células cobriram cerca de 90% da superfície da nova garrafa foram novamente tripsinizadas e transferidas para uma garrafa de 75 cm² de área. Esta passagem foi denominada de “passagem 1”. A partir de então, toda vez que 90% da superfície da garrafa estivesse coberta, nova passagem era feita e as células transferidas para 3 novas garrafas de 75 cm². Os estudos foram realizados entre a 7^a a 11^a passagem.

III.2.1.b. Células derivadas de linhagem (NRK-49F)

As células de linhagem de NRK-49F (ATCC, Manassas, EUA) derivadas de rim de rato (*Rattus norvegicus*) foram recebidas em gelo seco e foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37 °C. Em seguida, foi realizada a contagem celular através do auxílio de uma câmara de Neubauer e distribuído em garrafas de cultura de 75 cm², de superfície com tampa com filtro bacteriológico (Corning, New York, EUA). As células foram cultivadas em meio DMEM com alta concentração de glicose, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Rockville, EUA) e antibióticos (anfotericina-B 2,5 µg/ml, ampicilina 100 µg/ml e estreptomicina 100 µg/ml). As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Quando as células atingiram cerca de 90% da superfície da nova garrafa foram

tripsinizadas, contadas e transferidas novamente para uma garrafa de 75 cm² de área numa razão de 1:4. Esta passagem foi denominada de “passagem 1”. A partir desta etapa, para os cultivos seguintes, quando 90% da superfície da garrafa estivesse coberta, nova passagem foi feita e as células transferidas para 3 novas garrafas de 75 cm². Os experimentos foram realizados entre a 14^a a 20^a passagem.

III.2.1.c. Método de tripsinização

O meio de cultura foi retirado e as células lavadas por 2 vezes com PBS estéril. A seguir, 4 ml de solução de tripsina (Gibco) a 37° C foram adicionados às garrafas, onde agiram durante 2 minutos. As garrafas foram agitadas levemente para que as células se soltassem. A solução de tripsina contendo as células foi transferida para um tubo Falcon (Corning, NY, EUA) de 15 ml contendo 1 ml de meio de cultura para parar a reação da tripsina. Os tubos foram centrifugados a 1.200 rpm por 5 minutos em temperatura de 4°C e o sobrenadante foi desprezado. O botão de células contido no fundo do tubo foi ressuspenso com 1 ml de DMEM + 20% SBF + antimicrobianos. Desta suspensão, 10 µL foram transferidos para um microtubo de 1,0 ml, contendo 90 µL de azul trypan com azida sódica a 1%. O tubo foi homogeneizado e 10 µL da suspensão foram colocados em cada face de uma câmara de Neubauer, para a contagem de células viáveis, em 16 campos. A média foi multiplicada por 10 (fator de diluição com trypan) e por 10⁴ (fator da câmara de Neubauer). Assim se obteve o número de células

tripsinizadas por mililitro. A suspensão de células foi transferida para uma nova garrafa já contendo meio de cultura.

III.2.1.d. Interleucina-1 β e angiotensina II como estímulo dos fibroblastos

No momento adequado para a intervenção, células oriundas de um mesmo explante (mesmo rato) e células de linhagem (NRK-49F) foram semeadas tanto em placas de 24 wells como em garrafas de 75 cm², contendo meio de cultura com 20% soro fetal mais antibiótico. Após 72 horas, as células foram privadas, isto é, o meio de cultura contendo 20% soro fetal mais antibiótico foi substituído por meio de cultura contendo 1% SFB mais antibióticos. As placas foram deixadas quiescentes por 24 horas e então o meio foi trocado por meio de cultura a 1%, contendo os estímulos determinados.

Os estímulos utilizados para induzir a fibrogênese dos fibroblastos foram a IL- 1 β (200pg/ml) e a angiotensina II (10⁻⁷M). Para avaliar o efeito anti-fibrogênico foi utilizado pirfenidona (300 μ g/ml), isoladamente e em associação com os estímulos fibrogênicos (IL1 β e Ang II). A IL-1 β e a angiotensina II foram fornecidas em solução, alíquotadas e estocadas a 20°C. Para a utilização nos experimentos, uma alíquota dessa solução foi diluída em meio de cultura contendo 1% SFB imediatamente antes do uso. Em cada placa, além dos grupos de células que receberam os diferentes estímulos, havia um grupo não estimulado, que recebeu apenas meio de cultura contendo SFB 1% (veículo). O experimento foi realizado nos períodos de 12, 24 e 48 horas.

III.2.2. Determinação da proliferação celular pela incorporação de timidina

Doze horas antes de finalizar o período de estimulação, [^3H] timidina (Amersham Pharmacia Biotech Brasil Ltda, SP, Brasil) foi acrescentada em cada well, para uma concentração final de 2,5 $\mu\text{Ci/ml}$. Ao final do período de estímulo, as células foram lavadas duas vezes com 1 ml de PBS e duas vezes com 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5%, para a precipitação do DNA. O material precipitado em cada well foi ressuspendido em 300 μL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2N/Sarcosil 0,3%. De cada amostra, 60 μL foram transferidos para um frasco contendo 3 ml de líquido de cintilação, homogeneizados e deixados por duas horas em ambiente escuro para estabilização antes da leitura. Para fazer a contagem foi utilizado um “branco” contendo 60 μL de NaOH 0,2 N/Sarcosil 0,3% em 3 ml de líquido de cintilação. A incorporação de ^3H -Timidina foi determinada em um contador de cintilação beta Beckman - modelo LS6200 (Beckman Instruments, Palo Alto, EUA). O tempo de contagem de cada amostra foi de 10 minutos e o resultado expresso em contagem por minuto (cpm).

III.2.3. Imunocitoquímica para caracterização dos fibroblastos

Após o estímulo, a garrafa foi tripsinizada e suas células foram re-suspendidas. As células em suspensão foram colocadas em lâminas estéreis, depositadas em placas de Petri. As placas de Petri permaneceram por 24 horas em estufa a 37 °C e 5% CO_2 . Depois deste período as células

estavam aderidas às lâminas. Então as lâminas foram retiradas da estufa, lavadas com PBS e fixadas em acetona gelada por 10 minutos e secas à temperatura ambiente, sendo guardadas em freezer -80 °C. Foram feitas 10 lâminas por garrafa. Uma alíquota da garrafa foi congelada em nitrogênio líquido para repetir alguns experimentos caso houvesse necessidade. Esta alíquota foi centrifugada e ressuspensa com uma solução (meio de congelamento) contendo 80% de SBF, 10% DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma, St. Louis, EUA) e 10% DMEM. Uma alíquota de 1 ml de célula em meio de congelamento foi colocada em tubo de criogenia e guardada em nitrogênio líquido.

Para fazer a caracterização imunocitoquímica das células foram realizadas diversas marcações, como von Willebrand (célula endotelial), pan-citoqueratina (célula epitelial), desmina (células mesangial), vimentina (fibroblasto) e α -actina (miofibroblasto). O controle negativo do método foi realizado em todos os experimentos, omitindo-se o anticorpo primário específico. A metodologia será descrita a seguir. Na tabela 1 estão descritos os anticorpos utilizados para a realização da imunocitoquímica.

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para imuno-citoquímica de células cultivadas

Antígeno	Fonte	Marca	Diluição	Marca
von Willebrand	Policlonal de coelho	Endotélio	1:200	Dako
Pan-citoqueratina	Monoclonal	Epitélio	1:200	Sigma
Desmina	Monoclonal	Célula Mesangial	1:100	Sigma
Vimentina	Monoclonal	Fibroblastos	1:200	Sigma
α -actina	Monoclonal	Miofibroblastos/ Músculo liso	1:800	Sigma

A reação de imunocitoquímica para caracterização das células foi realizada pela técnica estreptavidina-biotina/fosfatase-alcalina.

Após a retirada das lâminas do freezer -80°C , as lâminas foram colocadas em um tampão TBS. Logo em seguida foi realizado o bloqueio da avidina endógena por 15 minutos seguido do bloqueio da biotina endógena por 15 minutos e do bloqueio inespecífico com soro não-imune de cavalo (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:70, durante 30 minutos. As células foram incubadas com os anticorpos primários específicos, mostrados na tabela 1. A incubação foi realizada durante a noite, a 4°C , em câmara úmida. A seguir, foram incubados com imunoglobulina biotinilada anti-camundongo adsorvida em rato (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:200 ou imunoglobulina biotinilada de cabra anticoelho (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:1000, ambos durante 45 minutos. O anticorpo secundário utilizado dependia do hospedeiro onde foi feito o anticorpo primário. Em seguida, foi acrescentado o complexo estreptavidina-biotina/fosfatase-alcalina (Vector, Burlingame, EUA), durante 30 minutos. A seguir foi utilizado o corante fast-red 5 mg diluído em uma solução denominada “substrato”.

Para preparar o substrato utilizou-se 2 mg de fosfato de naftol AS-MX (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) diluído em 200 μL de N,N dimetilformamida (Merck, Rio de Janeiro, RJ). A seguir, a solução foi diluída em 9,8 ml de tampão Tris 0,1 M e pH = 8,2 e 20 μL de levamisol 1 M (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) foram acrescentados.

A solução “substrato + fast red” depois de ser preparada foi filtrada e utilizada como revelador. O tempo de revelação para os diversos antígenos variou de 5 a 30 minutos e a contra-coloração foi feita com hemalumbre de Mayer. As células positivas neste tipo de reação apresentam cor vermelha.

III.2.4. Técnicas de Biologia Molecular

III.2.4.a. Extração de RNA de células de fibroblastos renais

O método de extração de RNA total dos botões de células de fibroblastos renais congelados em *freezer* – 80°C foi realizado com trizol (Invitrogen, São Paulo, Brasil.) conforme a determinação do fabricante.

Uma vez extraído o RNA sua concentração foi medida por método colorimétrico, onde 1 unidade de densidade óptica, lida com comprimento de onda de 260 nm, equivalem a 40 µg/ml de RNA total. Além da leitura a 260 nm também é feita leitura a 280 nm para verificar a qualidade do RNA extraído, sendo que a proporção 1,8 é a ideal. Além disso, o RNA é corrido em gel de eletroforese para verificar visualmente a integridade das bandas de 28 S e 18 S. Depois de extraída, a solução contendo RNA total foi armazenada em freezer –20 °C até ser utilizada.

III.2.4.b. Reação de transcriptase reversa (RT)

Da solução de RNA total extraída foi retirada de 1 µg de RNA até um volume máximo de 11 µl. Foi acrescentada água DEPC até completar o volume de 11 µl e então foi adicionado 1 µl de *primer* oligo (dT), 500 µg/ml. A solução obtida foi aquecida a -70°C por 10 minutos no termociclador e após este período foi imediatamente transferida para o gelo, onde repousou no mínimo por 5 minutos. Separadamente, foi preparado o resto da solução (solução com enzima) que foi adicionada aos 12 µl de RNA e oligo (dT). A solução com enzima foi preparada com 4 µl de tampão 5

vezes concentrado, 2 µl de DTT 0,1M, 1 µl de dNTP 10 mM.e 1 µl (200 U) de transcriptase reversa. Foi acrescentada 8 µl da solução com enzima à mistura de RNA total e oligo (dT), a solução final foi levada ao termociclador e aquecida a -70°C durante 15 minutos. O produto final extraído é cDNAs correspondente ao RNA isolado.

Para a reação de transcriptase reversa foi utilizada a enzima transcriptase reversa (Invitrogen, São Paulo, Brasil) cujos componentes foram descritos a seguir. O tampão 5 vezes concentrado contém Tris-HCl 250 mM (pH = 8,3), KCl 375 mM e MgCl₂ 15 mM. O dNTP é uma mistura de dATP, dGTP, dCTP e dTTP, todos na concentração de 10 mM e em pH neutro. A enzima transcriptase reversa foi isolada a partir de vírus de leucemia *macaco moloney*.

III.2.4.c. Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Uma alíquota de cDNA foi transferida para tubo livre de RNase e DNase onde foi realizada a solução de PCR. Preparou-se uma solução de reação contendo, para cada tubo, 2,5 µl de tampão PCR 10 vezes concentrado (Tris-HCl 200 mM em pH 8,4; KCl 500 mM e MgCl₂ 1,5 mM); 1 µl de dNTP 10mM; 1,0 µl do primer de amplificação I (10 µM); 1,0 µl do primer de amplificação II (10 µM); 1,0 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl, Promega) e 16,5 µl de água mili-Q. A solução foi homogeneizada em vórtex, adicionada ao tubo contendo amostra de cDNA e levada ao termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc, Watertown, MA, EUA) para dar seguimento à reação. A programação do termociclador para os RNAm estudados está

descrita na tabela 2 e as seqüência dos *primers* utilizados estão descritas na tabela 3. Depois de completada a reação os tubos com cDNA amplificado foram guardados no freezer -20 °C até serem usados.

Tabela 2 – Tempo das etapas dos experimentos de PCR

cDNA	Desnaturação inicial	n° de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
GAPDH	94° 5'	40	94° 1'	55° 1'	72° 2'	72° 7'
Colágeno I	94° 5'	32	94° 1'	60° 1'	72° 2'	72° 7'
Colágeno III	94° 5'	32	94° 1'	60° 1'	72° 2'	72° 7'
TGF- β	94° 5'	28	94° 1'	55° 1'	72° 2'	72° 7'

Tabela 3 – Seqüência dos *primers* utilizados

cDNA	Primer I (5'→3')	Primer II (5'→3')	Produto (pb)
GAPDH	TCCCTCAAGATTGTCAGCAA	AGATCCACAACGGATACATT	309
Colágeno I	CTTCGTGTAAACTCCCTCC	CACTTTTGGTTTTTGGTCAC	221
Colágeno III	GCGGCTTTTCACCATATTA	GCATGTTTCTCCGGTTTC	266
TGF- β	GGACTACTACGCCAAAGAAC	TCAAAAGACAGCCACTCAGG	293

III.2.4.d. Quantificação do produto do PCR

O cDNA amplificado foi quantificado através da intensidade da impregnação em filme fotográfico de bandas que foram submetidas a eletroforese e que correram juntas com um marcador de tamanho (*ladder*). A densidade óptica foi corrigida para a expressão de GAPDH da mesma amostra.

O gel de corrida foi preparado com agarose a 1,5 % contendo TAE (tampão Tris-acetato a 0,04 M e EDTA a 0,001 M) e brometo de etídio a 10

mg/ml (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA). O gel polimerizado foi mergulhado na solução de TAE. Os orifícios para deposição das amostras de cDNA foram deixados próximos ao pólo negativo da cuba de eletroforese. Uma mistura contendo 10 µl da solução com cDNA amplificado e 3 µl de “loading” gel (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) foi colocada no pocinho (orifício) e uma corrente com voltagem constante (80 V) foi aplicada ao gel para separação das bandas. As bandas visualizadas pela luz UV foram capturadas pelo aparelho Gene Flash (Syngene Bio Imaging). A imagem foi gravada sob forma de arquivo TIF usando o programa Corel Photopaint versão 5.0. A análise da intensidade óptica foi realizada por meio do software Imagemaster 1D ELITE (Pharmacia Biotech.), versão 2.0. O valor obtido (número de pixels) foi corrigido para a intensidade do GAPDH da mesma amostra.

III.2.5. Ensaio para TGF- β pela técnica de ELISA

Para a quantificação do TGF- β no sobrenadante dos fibroblastos renais em cultura foi utilizado o kit TGF- β 1 Emax Immunoassay System (Promega, Madison, EUA).

Resumidamente, em primeiro lugar a placa de 96 poços foi preenchida com 100 µl de anticorpo monoclonal anti-TGF- β e mantida a 4°C *overnight*. No dia seguinte, os poços foram preenchidos com solução de bloqueio (270 µl) e a placa colocada em estufa a 37°C por 35 minutos. Em seguida, foi lavada 1 vez com solução de lavagem e foram colocadas as amostras (100 µl) e padrões (100 µl) em agitação orbital por 90 minutos, em

temperatura ambiente. Foi lavada 5 vezes com solução de lavagem, e colocou-se o anticorpo policlonal anti-TGF- β (100 μ l) em agitação orbital por 2 horas, em temperatura ambiente. Foi lavada 5 vezes com solução de lavagem, sendo colocado o anticorpo conjugado (HRP) anti-pAb TGF- β (100 μ l), em agitação orbital por 2 horas, em temperatura ambiente. Foi lavada 5 vezes com solução de lavagem, para ser incubada por 15 minutos com o substrato cromógeno TMB (100 μ l), em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com HCl 1N (100 μ l) e feita a leitura da placa em espectrofotômetro a 450 nm.

III.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ EP. Todos os dados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA). Toda a análise foi feita pela comparação entre os grupos.

A análise histológica foi feita contando o número de glomérulos esclerosados contidos no tecido renal e o resultado foi apresentado em porcentagem de acordo com o número total de glomérulos. Para a expansão intersticial, foi quantificada a área de interstício ocupada por fibrose em relação ao tecido renal e foi apresentada também em porcentagem.

Para os macrófagos, linfócitos e células em proliferação foram contadas as células positivas e o resultado foi expresso em células/ mm². As proteínas analisadas por imuno-histoquímica foram semiquantificadas pela contagem de pontos e o resultado foi apresentado como pontos/ mm².

A análise da atividade enzimática das metaloproteinases foi realizada pelo método de zimografia, com os resultados foram expressos em unidade arbitrária (U.A.).

IV - RESULTADOS

IV.1. Resultados do estudo “*in vivo*”

IV.1.1. Parâmetros de doença renal

Os resultados apresentados na tabela 4 são referentes à pressão caudal (PC), albuminúria (ALB), creatinina (Creat), glomerulosclerose (GS) e isquemia glomerular (IG).

IV.1.1.a. Pressão caudal

Os resultados da pressão caudal estão apresentados na figura 1. Os animais do grupo CONTROLE apresentaram pressão arterial normal ($127 \pm 5,8$ mmHg), enquanto que os animais do grupo NAME apresentaram grave hipertensão ($179 \pm 2,5$ mmHg; $p < 0,0001$ vs CONTROLE). O grupo com losartan na dose de 500mg/Kg/dia (LOS) apresentou uma diminuição significativa da pressão arterial em relação ao grupo NAME ($143 \pm 4,5$ mmHg; $p < 0,0001$ vs NAME). O grupo MMF e a pirfenidona na dose alta (PIRF) como monoterapia não tiveram influência na pressão arterial. Já os grupos combinados de PIRF+LOS+HIDRA e PIRF+LOS+MMF+HIDRA, demonstraram efeito sobre a pressão arterial dos animais, que chegaram a apresentar valores de pressão caudal semelhantes aos dos animais do grupo CONTROLE ($124 \pm 6,0$ mmHg e $129 \pm 5,4$ mmHg, respectivamente; $p < 0,0001$ vs NAME).

Figura 1 – Pressão arterial caudal dos animais nos diferentes grupos

IV.1.1.b. Albuminúria

Os animais do grupo CONTROLE tiveram uma excreção de albumina dentro dos valores normais ($7,0 \pm 2,4 \text{ mg/24h}$), enquanto o grupo NAME apresentou grave albuminúria ($63 \pm 6,2 \text{ mg/24h}$; $p < 0,0001$ vs CONTROLE). O grupo LOS apresentou redução significativa da albuminúria ($1,0 \pm 0,2 \text{ mg/24h}$; $p < 0,0001$ vs NAME). O grupo MMF também apresentou uma diminuição significativa da albuminúria em relação ao grupo NAME ($35,0 \pm 6,9 \text{ mg/24h}$; $p < 0,01$), porém mais elevada do que a do grupo LOS ($p < 0,001$). O grupo PIRF apresentou queda significativa na taxa de albuminúria ($3,0 \pm 2,7 \text{ mg/24h}$; $p < 0,0001$ vs NAME e $p < 0,001$ vs MMF). O grupo PIRF+LOS+HIDRA apresentou redução da albuminúria para níveis inferiores aos do grupo CONTROLE ($p < 0,0001$ vs NAME). O grupo de associação PIRF+LOS+MMF+HIDRA apresentou uma redução significativa nos níveis de albumina urinária ($1,4 \pm 0,5 \text{ mg/24h}$; $p = 0,05$ vs CONTROLE, $p < 0,0001$ vs NAME e $p < 0,001$ vs MMF).

Figura 2 – Albuminúria dos animais nos diferentes grupos

IV.1.1.c. Creatinina sérica

A análise dos níveis de creatinina sérica revelou que o grupo NAME ($0,65 \pm 0,08$ mg/24h) apresentou níveis mais elevados em relação ao CONTROLE ($0,29 \pm 0,07$ mg/24h). O nível de creatinina sérica foi significativamente menor no grupo PIRF ($0,16 \pm 0,05$ mg/24h; $p < 0,05$ vs NAME). O grupo LOS e o grupo MMF apresentaram discreta redução em relação ao grupo NAME ($0,54 \pm 0,07$ mg/dL e $0,59 \pm 0,08$ mg/dL, respectivamente), mais acentuada nos grupos PIRF+LOS+HIDRA ($0,53 \pm 0,03$ mg/dL) e PIRF+LOS+MMF+HIDRA ($0,31 \pm 0,09$ mg/dL).

Figura 3 – Creatinina sérica dos animais nos diferentes grupos

IV.1.1.d. Glomerulosclerose

Como esperado, a indução de nefropatia no grupo NAME caracterizou-se por uma alta porcentagem de glomérulos esclerosados ($5,8 \pm 1,9\%$ vs $0,4 \pm 0,3$ CONTROLE; $p < 0,01$). O grupo LOS apresentou uma redução significativa da glomerulosclerose em relação ao grupo NAME, chegando a apresentar uma porcentagem de glomérulos esclerosados semelhante à do grupo CONTROLE ($0,3 \pm 0,3\%$; $p < 0,001$ vs NAME). O grupo MMF também apresentou redução significativa na porcentagem de glomerulosclerose ($2,9 \pm 1,5$; $p < 0,01$ vs NAME). Tanto o grupo PIRF, como os grupos PIRF+LOS+HIDRA e PIRF+LOS+HIDRA+MMF apresentaram os índices de glomerulosclerose significativamente reduzidos, quando comparados ao grupo NAME ($1,6 \pm 0,5\%$, 0 e $0,5 \pm 0,21\%$ respectivamente; $p < 0,001$ vs NAME).

Figura 4 – Índice de glomerulosclerose nos diferentes grupos

IV.1.1.e. Isquemia glomerular

Na figura 4 estão apresentados os índices de isquemia glomerular. A porcentagem de isquemia glomerular apresentada pelo grupo CONTROLE foi de $0,28 \pm 0,20\%$, enquanto o grupo NAME apresentou uma porcentagem significativamente maior ($7,5 \pm 1,9\%$; $p < 0,001$ vs CONTROLE). O grupo MMF não apresentou redução significativa da isquemia glomerular quando comparado ao grupo NAME ($5,9 \pm 2,6\%$). Nos grupos LOS e PIRF, houve diminuição significativa da isquemia glomerular ($1,9 \pm 1,0\%$; $p < 0,05$ vs NAME e $3,7 \pm 1,3\%$; $p < 0,0001$ vs NAME, respectivamente). Porém a redução mais marcante foi observada nos grupos PIRF+LOS+HIDRA e PIRF+LOS+HIDRA+MMF quando comparados ao grupo NAME ($0,1 \pm 0,1\%$ e 0 ; $p < 0,001$, respectivamente).

Figura 5 – Grau de isquemia glomerular nos diferentes grupos

IV.1.2. Análise da fibrose intersticial e atividade de MMPs

Para a análise da matriz extracelular foi estudada a fibrose intersticial (INT) pelo método do Tricômio de Masson. Além disso, como marcador da degradação da matriz extracelular foi analisada a atividade das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 através de zimografia.

A tabela 5 mostra os resultados da porcentagem de fibrose intersticial (INT) e expressão (U.A.) do *turnover* (MMP-2 e MMP-9), respectivamente.

Tabela 5 – Porcentagem de fibrose intersticial e atividade de MMPs no tecido renal

	CONTROLE	NAME	LOS	MMF	PIRF	PIRF +LOS + HIDRA	PIRF+LOS + MMF+HIDRA
INT (%)	0,33±0,09	2,0±0,55 ^a	0,98±0,31 ^a	1,4±0,79	0,66±0,26 ^b	0,24±0,09 ^{b,c}	0,19±0,04 ^{b,c}
MMP-2 (U.A.)	12±2,8	29±4,9	26±1,8	15±2,4	61±2,6 ^{a,b,c,d}	60±15 ^{a,b,c,d}	12±4,4 ^{e,f}
MMP-9 (U.A.)	14±5,2	25±5,1	10±4,8	11±2,5	64±5,2 ^{a,b,c,d}	35±12,0 ^e	4,5±3,0 ^{e,f}

INT: fibrose intersticial

MMP-2: Metaloproteinase 2 constitutiva

MMP-9: Metaloproteinase 9

NAME: modelo de nefropatia induzida por L-NAME+dieta HS

LOS: losartan dose alta

MMF: micofenolato mofetil

PIRF: pirfenidona dose alta

HIDRA: hidralazina

Resultados apresentados como média ± EP

^a p<0,01 vs CONTROLE

^b p<0,05 vs NAME

^c p<0,05 vs LOS

^d p<0,001 vs MMF

^e p<0,001 vs PIRF

^f p<0,001 vs PIRF+LOS+HIDRA

IV.1.3.a. Quantificação da Fibrose Intersticial

A análise da expansão intersticial realizada através da coloração de tricrômico de Masson revelou que o grupo NAME apresentou uma porcentagem de fibrose intersticial significativamente maior do que o grupo CONTROLE ($2,0 \pm 0,55\%$ vs $0,33 \pm 0,09\%$; $p < 0,001$). O grupo LOS ($0,98 \pm 0,31\%$) apresentou diminuição de área de fibrose intersticial em relação ao grupo NAME, assim como o grupo MMF ($1,4 \pm 0,79\%$), porém sem significância estatística. Por outro lado, o tratamento com PIRF promoveu uma diminuição significativa da fibrose com relação ao grupo NAME ($0,66 \pm 0,26\%$; $p < 0,05$ vs NAME). As maiores reduções na expansão intersticial foram observadas nos grupos PIRF+LOS+HIDRA e PIRF+LOS+HIDRA+MMF ($0,24 \pm 0,09\%$; $0,19 \pm 0,04\%$, respectivamente; $p < 0,01$ vs NAME) nos quais os índices de expansão intersticial foram semelhantes ao do grupo CONTROLE. Além disso, os grupos PIRF+LOS+HIDRA e PIRF+LOS+HIDRA+MMF apresentaram níveis significativamente menores que o grupo LOS ($p < 0,01$).

Figura 6 - Porcentagem de fibrose no interstício renal

IV.1.3.b. Análise da atividade de metaloproteinases MMP-2 e MMP-9

Para um melhor esclarecimento quanto aos mecanismos moleculares envolvidos na fibrose, a atividade enzimática das MMPs foi analisada pelo método de zimografia. As metaloproteinases analisadas foram a MMP-2 e a MMP-9. A MMP-2 na zimografia se apresenta de duas formas, que são visualizadas por duas bandas distintas. A banda superior representando a forma latente da MMP-2 e a banda inferior representando a forma ativa. Trata-se de uma metaloproteinase constitutiva presente até mesmo em condições normais. Já a MMP-9 apresenta-se apenas na forma ativa sendo rara a aparição de sua forma latente.

A figura 7 apresenta exemplos de resultados da técnica de zimografia para quantificar a atividade enzimática das metaloproteinases.

Figura 7 – Resultados da degradação do gel pela atividade enzimática das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9)

O grupo NAME apresentou elevada atividade enzimática de MMP-2 ($29 \pm 4,9$ U.A.) e MMP-9 ($25 \pm 5,1$ U.A.) elevadas em relação ao grupo CONTROLE ($12 \pm 2,8$; $14 \pm 5,2$, respectivamente). No grupo LOS também houve aumento da atividade enzimática da MMP-2 ($26 \pm 1,8$ U.A.), porém o mesmo aumento não foi expresso pela MMP-9 ($10 \pm 4,8$ U.A.). O grupo MMF não apresentou aumento significativo das atividades enzimáticas de MMP-2 ($15 \pm 2,4$ U.A.) e MMP-9 ($11 \pm 2,5$ U.A.) em relação ao grupo NAME ($p < 0,05$), mantendo os valores semelhantes aos encontrados nos animais do grupo CONTROLE.

Os grupos PIRF e PIRF+LOS+HIDRA apresentaram aumento da atividade enzimática da MMP-2 ($61 \pm 2,6$ e $60 \pm 15,0$ U.A., respectivamente), e da MMP-9 ($64 \pm 5,2$ e $35 \pm 12,0$ U.A., respectivamente) em relação ao grupo NAME ($p < 0,05$). Diferentemente, os animais do grupo quádruplo (PIRF+LOS+MMF+HIDRA) apresentaram uma redução significativa das atividades da MMP2 ($12 \pm 4,4$ U.A.) e da MMP9 ($4,5 \pm 3,0$ U.A.) atingindo valores semelhantes ao do grupo CONTROLE.

Figura 8 – Expressão da atividade enzimática da MMP-2 e MMP-9 em tecido renal nos diferentes grupos

Figura 9 - Expressão de componentes celulares e da proliferação celular em tecido renal de ratos. Grupo **NAME**: células positivas para macrófagos (A), linfócitos (B), miofibroblastos (C) e PCNA (D); Grupo **PIRF**: células positivas para macrófagos (E), linfócitos (F), miofibroblastos (G) e PCNA (H).

IV.1.4.a. Macrófagos

Com relação à infiltração por macrófagos, o grupo NAME apresentou um número significativamente maior de macrófagos do que o grupo CONTROLE ($49,1 \pm 11,3$ vs $8,6 \pm 1,6$ cels/mm²; $p < 0,01$). Os grupos LOS e MMF apresentaram redução significativa do número de macrófagos ($8,1 \pm 0,9$ cels/mm² e $8,4 \pm 1,7$ cels/mm², respectivamente; $p < 0,01$ vs NAME), chegando a níveis próximos ao do grupo CONTROLE. O grupo PIRF teve diminuição significativa do número de macrófagos no interstício renal ($12 \pm 2,3$ cels/mm²; $p < 0,05$ vs NAME). As maiores reduções significativas na infiltração de macrófagos foram observadas nos grupos PIRF+LOS+HIDRA e PIRF+LOS+HIDRA+MMF, que atingiram níveis inferiores ao observado no grupo CONTROLE ($4,8 \pm 2,0$ cels/mm² e $6,0 \pm 1,8$ cels/mm², respectivamente; $p < 0,0001$ vs NAME).

Figura 10- Número de macrófagos no interstício renal nos diferentes grupos

IV.1.4.b. Linfócitos T

Com relação à infiltração por linfócitos T, o grupo NAME apresentou um número significativamente maior de linfócitos T do que o grupo CONTROLE ($87 \pm 6,5$ vs $9,6 \pm 1,4$ cels/mm²; $p < 0,0001$). Os grupos LOS e MMF apresentaram queda significativa do número de linfócitos T em relação ao grupo NAME ($47 \pm 2,4$ cels/mm² e $17 \pm 2,0$ cels/mm²; respectivamente, $p < 0,0001$ vs NAME).

Os grupos PIRF e PIRF+LOS+MMF+HIDRA apresentaram redução na infiltração de linfócitos T semelhantes e significativas ($11 \pm 2,6$ cels/mm²; $p < 0,0001$ e $10 \pm 1,3$ cels/mm²; $p < 0,0001$ vs NAME e $p < 0,05$ vs MMF). O grupo PIRF+LOS+HIDRA teve o número de infiltrado linfocitário reduzido a níveis mais baixos do que os dos grupos CONTROLE, NAME e MMF ($5,5 \pm 1,3$ cels/mm²; $p < 0,05$ vs CONTROLE, $p < 0,0001$ vs NAME e $p < 0,001$ vs MMF).

Figura 11 – Número de linfócitos T em interstício renal nos diferentes grupos

IV.1.4.c. Miofibroblastos

A análise da expressão de α -actina teve como objetivo a identificação de miofibroblastos. Para esta análise, foi excluída a marcação em células da musculatura lisa vascular, que expressam esta proteína de forma constitutiva. No grupo NAME houve um aumento significativo do número de miofibroblastos no interstício renal ($3,5 \pm 0,63\%$ vs $0,79 \pm 0,09\%$; $p < 0,01$ vs CONTROLE). O grupo LOS e o grupo MMF apresentaram redução significativa do número de miofibroblastos ($0,77 \pm 0,09\%$ e $0,79 \pm 0,045\%$, respectivamente; $p < 0,01$ vs NAME), chegando a níveis próximos do grupo CONTROLE. O grupo PIRF promoveu uma redução significativa da porcentagem de miofibroblastos ($1,3 \pm 0,20\%$; $p < 0,01$ vs NAME). O grupo PIRF+LOS+HIDRA reduziu significativamente a porcentagem de miofibroblastos ($0,92 \pm 0,14\%$; $p < 0,01$ vs NAME). O grupo PIRF+LOS+MMF+HIDRA também apresentou uma redução significativa da porcentagem de miofibroblastos ($0,82 \pm 0,15\%$; $p < 0,01$ vs NAME).

Figura 12 – Expressão de α -actina em interstício renal nos diferentes grupos

IV.1.4.d. PCNA

A atividade proliferativa celular foi verificada através da expressão de PCNA. O grupo NAME apresentou elevada atividade proliferativa em relação ao grupo CONTROLE ($17,4 \pm 0,67$ vs. $8,5 \pm 2,3$ cel/mm²; $p < 0,05$ vs CONTROLE). O grupo LOS e o grupo MMF apresentaram redução significativa da atividade proliferativa ($4,48 \pm 0,20$ cels/mm²; $3,16 \pm 0,05$ cels/mm² respectivamente; $p < 0,0001$ vs NAME), chegando a níveis mais baixos que os encontrados no grupo CONTROLE.

O grupo PIRF não apresentou redução significativa da atividade proliferativa ($14,43 \pm 1,63$ cels/mm²), enquanto o grupo PIRF+LOS+HIDRA foi eficaz, reduzindo significativamente a atividade proliferativa ($8,54 \pm 1,85$ cels/mm²; $p < 0,01$ vs NAME). O grupo PIRF+LOS+MMF+HIDRA também apresentou uma redução significativa da atividade proliferativa ($11,77 \pm 4,30\%$; $p < 0,05$ vs NAME).

Figura 13 – Quantificação de células em proliferação através do PCNA nos diferentes grupos

IV - RESULTADOS

IV.2. Resultados do estudo “*in vitro*”

IV.2.1. Caracterização das células cultivadas derivadas de explante de rim de rato e derivadas de linhagem celular (NRK-49F)

Fibroblastos corticais renais foram cultivados a partir de explantes de córtex renal de animais normais. A partir da segunda passagem as células apresentaram aspecto uniforme e com morfologia típica da linhagem de fibroblastos. Foi realizada imunocitoquímica para a caracterização das células cultivadas. As células marcaram positivamente para vimentina Fig 14 A e α -actina Fig 14 C e negativamente para desmina Fig 14 E (excluindo células mesangiais), fator de von Willebrand (excluindo células endoteliais) e pan-citoqueratina (excluindo células epiteliais). Este padrão de marcação caracterizou as células como miofibroblastos. A caracterização das células de linhagem NRK-49F foi semelhante Fig 14 B e 14 E exceto por não ser detectada a marcação para α -actina Fig 14 D, confirmando a manutenção da linhagem fibroblástica mesmo após diversas passagens.

Figura 14 - Caracterização de fibroblastos derivados de explante de rim de rato e derivados de linhagem celular (NRK-49F). Células positivas para vimentina (A and B) and α -actina (C), e células negativas para α -actina (D) e desmina (E and F)

IV.2.2. Proliferação celular pela incorporação de timidina-³H em cultura de fibroblasto renal derivado de explante renal e de célula de linhagem (NRK-49F)

A atividade proliferativa celular (síntese de DNA) foi avaliada pela incorporação de timidina tritiada em fibroblasto renal de ratos Wistar normais obtidos a partir de explante renal e também a partir de células de linhagem (NRK-49F). Os períodos avaliados foram de 12 e 24 horas de estímulo. Os resultados das contagens para a proliferação estão descritos na tabela 7 e 8, e na figura 15, respectivamente, e expressos em contagem por minuto (cpm).

Tabela 7 – Proliferação celular de células derivadas de explante renal de rato por incorporação de timidina ³H em contagem por minuto

Período	veículo (cpm)	Pirf (cpm)	IL-1β (cpm)	Ang II (cpm)	IL-1β + Pirf (cpm)	AngII + Pirf (cpm)
12 hs	1653±64	2857±555	3014±495	2316±179 ^a	2167±199	2435±183
24 hs	2547±189	3562±298	3352±326	3400±492	3353±716	3335±321
48 hs	2933±637	2574±433	3450±611	3202±502	2756±162	3127±394

média ± EP; ^ap< 0,05 vs veículo

Tabela 8 – Proliferação celular derivadas de linhagem celular (NRK-49F) por incorporação de timidina ^3H em contagem por minuto

Período	veículo (cpm)	Pirf (cpm)	IL-1β (cpm)	Ang II (cpm)	IL-1β + Pirf (cpm)	AngII + Pirf (cpm)
12 hs	3088 $\pm$ 37	2142 $\pm$ 65 ^a	3511 $\pm$ 419	3569 $\pm$ 155	1739 $\pm$ 430	1504 $\pm$ 81 ^c
24 hs	4044 $\pm$ 3,09	1543 $\pm$ 41,5 ^a	4945 $\pm$ 35,1 ^a	6675 $\pm$ 151,7 ^a	2665 $\pm$ 106,4 ^b	2103 $\pm$ 184,0 ^c
48 hs	4639$\pm$1147	6853$\pm$832	7740$\pm$551	6372$\pm$322	6165$\pm$1308	2262$\pm$203 ^c

média $\pm$ EP; ^ap< 0,05 vs veículo; ^bp<0,05 vs IL-1 β ; ^cp<0,05 vs Ang II

Tanto para as células derivadas de explante como para as células derivadas de linhagem celular, no período de 12 e 24 horas, verificou-se um aumento significativo na proliferação celular dos grupos estimulados com IL-1 β e Ang II em relação ao grupo veículo. Pode-se observar que nas células de linhagem a pirfenidona tanto no período de 12 horas quanto no de 24 horas, diminuiu significativamente a proliferação celular atingindo níveis menores dos os encontrados no grupo veículo (2142 $\pm$ 65 cpm e 1543 $\pm$ 41,5 cpm; respectivamente, p<0,05 vs veículo). Isto demonstra que nas células de linhagem ficou muito mais claro o potencial efeito antifibrótico da pirfenidona.

Figura 15 – Ensaio proliferativo de fibroblastos derivados de cultura primária (explante de rim de rato) e derivados de linhagem celular (NRK-49F) após 12, 24 e 48 horas

IV.2.3. RT-PCR para colágeno tipo I, colágeno tipo III e TGF- β de cultura de fibroblastos renais derivados de linhagem (NRK-49F)

A expressão do RNAm de colágeno do tipo I, colágeno tipo III e TGF- β foi avaliada em fibroblasto renal obtidos a partir de explante renal e a partir da linhagem celular NRK-49F. O período avaliado foi de 24 horas de estímulo.

Para o colágeno I, no período de 24 horas, o grupo tratado com IL-1 β +Pirf ($1,24 \pm 0,09$ pixels) obteve um pequeno aumento em relação ao grupo estimulado com IL-1 β . Com relação ao grupo tratado Ang II+Pirf, observou-se um pequeno queda na expressão de RNAm em relação ao grupo estimulado com Ang II ($1,11 \pm 0,04$ e $1,68 \pm 0,29$ pixels; respectivamente) Para o grupo Pirf ($1,19 \pm 0,04$ pixels) manteve os valores semelhantes ao do grupo veículo ($1,18 \pm 0,05$ pixels).

Para colágeno III, no período de 24 horas o grupo tratado com IL-1 β +Pirf ($0,56 \pm 0,02$ pixels) obteve uma pequena redução em relação ao grupo estimulado com IL-1 β . Com relação ao grupo tratado, Ang II+Pirf ($0,86 \pm 0,01$ pixels) observou-se uma redução na expressão de RNAm em relação ao grupo estimulado com Ang II ($1,05 \pm 0,12$ pixels; respectivamente)

Com relação ao TGF- β , no período de 24 horas, o grupo tratado com IL-1 β +Pirf ($0,83 \pm 0,09$ pixels) mostrou uma redução não significativa da expressão de RNAm em relação ao grupo estimulado com IL-1 β ($1,05 \pm 0,25$ pixels). O grupo estimulado com Ang II apresentou um aumento em relação ao grupo veículo ($1,53 \pm 0,38$ pixels). Com relação ao grupo tratado, no grupo Ang II+Pirf ($0,90 \pm 0,14$ pixels) observou-se uma diminuição, porém não

IV.2.4. Ensaio de ELISA para TGF- β no sobrenadante de cultura de fibroblastos renais derivados de explante e de linhagem celular (NRK-49F)

A dosagem de TGF- β foi avaliada sobrenadante de cultura de fibroblastos renais derivados de explante e de linhagem celular (NRK-49F). O período avaliado foi de 48 horas de estímulo.

Para o período de 48 horas, o grupo tratado com IL-1 β +Pirf (297,4 $\pm$ 56,03 pg/mL) mostrou uma redução na concentração de TGF- β em relação ao grupo estimulado com IL-1 β (567,0 $\pm$ 50,44 pg/mL). Com relação ao grupo tratado com Ang II+Pirf observou-se uma diminuição significativa da concentração de TGF- β o quando comparado com grupo estimulado com Ang II (282,1 $\pm$ 18,86e 679,3 $\pm$ 86,74 pg/mL; respectivamente p<0,05). O grupo Pirf apresentou uma pequena diminuição não significativa em relação ao grupo veículo (456,8 $\pm$ 73,36e 306,8 $\pm$ 24,24 pg/mL; respectivamente).

Os resultados das concentrações de TGF- β no sobrenadante estão descritos e representados na tabela 10 e figura 16, respectivamente.

Tabela 10 – Dosagem de TGF- β em sobrenadante de cultura de células de explante renal de rato e de cultura de células de linhagem (NRK-49F) após 48 horas

	veículo (pg/mL)	Pirf (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	Ang II (pg/mL)	IL-1 β + Pirf (pg/mL)	Ang II+ Pirf (pg/mL)
TGF-β (explante)	597,7 $\pm$ 87,77	469 $\pm$ 102 ^{bc}	457 $\pm$ 107 ^{bc}	741 $\pm$ 41	1064 $\pm$ 56 ^a	469 $\pm$ 131
TGF-β (NRK-49F)	456,8 $\pm$ 73,36	306,8 $\pm$ 24,24	567,0 $\pm$ 50,44	679,3 $\pm$ 86,74	297,4 $\pm$ 56,03	282,1 $\pm$ 18,86

^a p<0,05 vs veículo

^b p<0,05 vs IL1- β

^cp<0,05 vs Ang II

média $\pm$ EP

Figura 16 – Concentração de TGF-β no sobrenadante após 48 horas de cultura de células de fibroblastos renais derivados de cultura de explante renal e de linhagem celular (NRK-49F)

V. DISCUSSÃO

O presente projeto teve como objetivo analisar o efeito da pirfenidona, droga potencialmente anti-fibrótica, em modelo experimental de nefropatia crônica progressiva. Paralelamente, foram realizados estudos visando uma melhor compreensão dos possíveis mecanismos de ação da pirfenidona. Para isto, realizamos estudos em cultura de fibroblastos renais de rato, estimulado com IL-1 β e angiotensina II, mediadores estes que estimulam a síntese de matriz extracelular e a expressão de TGF- β .

Diversos estudos demonstraram que o uso de drogas anti-hipertensivas, como os bloqueadores de angiotensina II além de drogas anti-inflamatórias e imunossupressoras promovem melhora da lesão progressiva renal (FUJIHARA et al.,1994; FUJIHARA et al.,2001; ELLERSHAW& GURNEY 2001). A associação destas drogas promove uma maior renoproteção do que as monoterapias (FUJIHARA et al., 2000). Porém, estes tratamentos não bloqueiam completamente a progressão da fibrose renal. Neste contexto, a utilização de uma droga anti-fibrótica é promissora para o tratamento da nefropatia progressiva. Assim, o presente estudo se propôs a analisar adicionalmente, o efeito da associação da pirfenidona (droga anti-fibrótica) ao losartan (droga bloqueadora de receptor de AT-1), à hidralazina (droga anti-hipertensiva) e ao micofenolato mofetil (droga anti-inflamatória), e desta forma, tentar promover um efeito renoprotetor mais potente para a nefropatia crônica progressiva através do bloqueio de três mecanismos patogénéticos da lesão renal.

O modelo experimental utilizado foi o de nefropatia crônica através da inibição crônica do óxido nítrico (modelo NAME) associado a uma dieta hipersódica, ocasionando lesão renal, já descrita anteriormente (YAMADA,1996; ARCOS, 2000; FUJIHARA, 2000;). O modelo NAME caracteriza-se por grave hipertensão arterial e por comprometimento renal levando a um quadro inflamatório importante e conseqüente progressão com fibrose renal. Histologicamente foi encontrado tanto comprometimento

glomerular (glomeruloesclerose e isquemia glomerular) como intersticial (fibrose intersticial).

Na análise dos resultados do presente estudo podemos observar que quanto à pressão caudal, os animais do grupo NAME, como esperado, apresentaram grave hipertensão arterial (FUJIHARA et al., 1994 e 2001). Os animais do grupo LOS utilizando a dose mais alta de 500 mg/Kg/dia apresentaram diminuição da pressão arterial, demonstrando que o uso de uma dose elevada de losartan foi eficaz neste modelo de hipertensão (FUJIHARA et al., 2005). Em estudo realizado anteriormente em nosso laboratório, o losartan quando administrado em uma dose menor (50mg/Kg/dia) não demonstrou efeito na diminuição da pressão arterial após 30 dias, apesar de ter sido eficaz no controle da pressão nos 15 primeiros dias de tratamento (GRACIANO et al. 2004). Isto sugere que no decorrer dos 30 dias de experimento a doença tornou-se mais grave, e então o uso de losartan na dose utilizada (500mg/Kg/dia), tenha sido suficiente para controlar a pressão arterial dos animais, resultado também descrito por FUJIHARA et al., 2005.

O grupo de animais que recebeu MMF não apresentou queda da pressão arterial, possivelmente decorrente do fato do MMF ser um imunossupressor sem efeito hemodinâmico.

A pirfenidona também não teve efeito na pressão arterial mantendo os animais hipertensos. Estes resultados são diferentes daqueles obtidos por LEH e colaboradores (2004) que utilizaram a pirfenidona no modelo experimental de glomerulonefrite induzido por anticorpos anti-membrana basal glomerular. Os resultados apresentados no estudo de LEH e colaboradores (2004) demonstraram que os animais tratados com pirfenidona mantiveram os índices de pressão arterial similares aos níveis do grupo de animais controle (animais que não estavam doentes). A discrepância dos resultados dos dois estudos pode ser decorrente do modelo utilizado. Como o modelo NAME caracteriza-se por hipertensão arterial grave, apenas drogas com potentes efeitos anti-hipertensivo e/ou em altas doses podem causar diminuição da pressão arterial. Os animais NAME

que receberam tratamento triplice (PIRF+LOS +HIDRA) tiveram uma redução significativa da pressão arterial, chegando aos valores detectados nos animais do grupo CONTROLE. Isto demonstra que o uso concomitante de duas drogas anti-hipertensivas (losartan e hidralazina) que agem por diferentes vias, tem maior efeito sobre a pressão arterial. O mesmo resultado foi observado no grupo de animais que receberam o esquema quádruplo (pirfenidona, losartan, MMF e hidralazina) refletindo a ação das duas drogas anti-hipertensivas. (KEHRER et al., 1997; WU et al., 1997; FUJIHARA et al., 1998; SHIMIZU et al., 1998, ELLERSHAW e GURNEY 2001; LASKY, et al., 2001; MIRIC, et al., 2001; SHIHAB, et al., 2002).

Com relação à albuminúria, os animais do grupo NAME apresentaram altos índices, refletindo a gravidade da lesão renal conforme descrito anteriormente (FUJIHARA et al., 1994 e FUJIHARA et al., 2001). Os animais do grupo LOS mostraram redução significativa nos níveis de albuminúria, provavelmente pela ação hemodinâmica glomerular. (FUJIHARA et al., 1998 e 2005, GRACIANO, 2004). O mesmo foi observado por Fujihara e colaboradores (1998) em modelo experimental de ablação renal, onde os valores de albuminúria também foram significativamente reduzidos quando utilizaram esta mesma dose de losartan (500mg/Kg/dia). Estes achados indicam um efeito renoprotetor importante do losartan. O MMF também promoveu redução albuminúria. Estudos anteriores utilizando-se MMF no mesmo modelo NAME demonstraram que esta droga promoveu uma redução de 50% nos níveis de albuminúria, semelhante ao observado no presente estudo.

O tratamento com pirfenidona diminuiu significativamente a albuminúria dos animais, apontando para um efeito renoprotetor mesmo na vigência de hipertensão arterial. Embora o mecanismo pelo qual a pirfenidona induz a diminuição de albuminúria tenha sido ainda pouco estudado, LEH e colaboradores, no modelo de glomerulonefrite experimental também demonstraram quedas significativas nos valores de proteinúria com o uso da pirfenidona (LEH et al, 2004). De forma semelhante, a utilização de pirfenidona, nos modelos experimentais de dosoxorubicina (AL-BAYATI et

al.,2002), glomerulosclerose em camundongo FGS/Kist (PARK, et al., 2003) também promoveram queda significativa da albuminúria. No presente estudo, a pirfenidona quando associada ao losartan e a hidralazina resultou em uma redução ainda mais significativa da albuminúria, mantendo os valores em níveis de excreção urinária de albumina. O mesmo efeito sobre a albuminúria ocorreu com os animais que receberam o esquema de associação com quatro drogas como terapia. Isto provavelmente é devido à somatória de efeitos renoprotetores que estas drogas possuem.

A análise dos níveis de creatinina sérica revelou que o grupo NAME apresentou níveis maiores do que os níveis encontrados no grupo CONTROLE. Os animais que receberam losartan e MMF apresentaram pequena redução na concentração sérica de creatinina. O mesmo já foi mostrado por Fujihara e colaboradores (2000) quando utilizou a associação de losartan e MMF neste mesmo modelo. O tratamento com pirfenidona, na forma isolada ou em associação, revelou-se eficaz em diminuir significativamente os níveis séricos de creatinina (quando comparado ao grupo NAME). Baseados nestes dados pode-se propor que esta droga, ao bloquear a progressão da doença renal crônica permite ao rim recuperar, ao menos em parte, suas funções fisiológicas.

Os animais do grupo NAME desenvolveram elevada porcentagem de glomerulosclerose. O tratamento com LOS diminuiu significativamente a porcentagem de glomerulos esclerosados, como o relatado por outros autores (YAMADA et al., 1996; MASCHIO, 1996; FUJIHARA et al., 2001). No grupo tratado com MMF os animais quais apresentaram uma diminuição significativa de albuminúria. Estes resultados conferem com resultados anteriormente publicados pelo nosso grupo (FUJIHARA et al, 2001 e GRACIANO et al., 2004).

Em modelos experimentais de nefropatia diabética (MIRIC et al., 2001), nefrotoxicidade pela ciclosporina (SHIHAB et al., 2002) e glomerulonefrite induzida por anti-GBM (LEH et al., 2004) tratados com pirfenidona, foi demonstrado uma diminuição da glomerulosclerose. No presente estudo, o tratamento com pirfenidona diminuiu significativamente a

glomerulosclerose. Estes resultados podem apontar mais uma vez para a importância do papel da pirfenidona na melhora da doença renal. O tratamento triplice (PIRF+LOS+HIDRA) foi mais eficaz em diminuir a glomerulosclerose, demonstrando resultados interessantes, com valores de glomerulosclerose nulos. Resultados semelhantes também foram observados no grupo de animais que receberam a associação das quatro drogas, sugerindo que o tratamento associativo destas drogas, seja mais eficaz em diminuir a glomerulosclerose, do que o uso isolado da pirfenidona. O mesmo foi verificado por LEH e colaboradores, (2004) em modelo experimental de glomerulonefrite, onde a pirfenidona além de utilizada isoladamente foi também associada ao candesartan (antagonista do receptor AT1), esta associação demonstrou resultados mais satisfatórios, do que quando a pirfenidona utilizada sozinha.

Em relação à isquemia glomerular, animais do grupo NAME desenvolveram grande porcentagem de isquemia glomerular, confirmando achados anteriores (FUJIHARA et al., 1994). O grupo LOS teve diminuição significativa da porcentagem de glomérulos isquemiados, sugerindo uma ação do losartan na hemodinâmica glomerular (FUJIHARA et al., 2000). Nos animais do grupo MMF não foi observado diminuição significativa dos valores da porcentagem de glomérulos isquemiados.

Os animais do grupo pirfenidona (PIRF) apresentaram redução significativa na porcentagem de glomérulos isquemiados. Porém, novamente os tratamentos em associação (PIRF+LOS+HIDRA e PIRF+LOS+MMF+HIDRA) foram os mais eficazes, mantendo os valores dentro da normalidade e até nulos.

Com relação à fibrose intersticial, os animais do grupo NAME desenvolveram alto índice de fibrose intersticial. Os animais tratados com losartan e também os tratados com MMF apresentaram diminuição da fibrose intersticial, confirmando um certo efeito renoprotetor (FUJIHARA et al., 1998, Graciano et al. 2004).

No entanto, o tratamento com pirfenidona mostrou ser extremamente eficaz não apenas em diminuir significativamente a fibrose intersticial, mas

em manter os valores próximos da normalidade. O presente estudo confirma o efeito anti-fibrótico da pirfenidona descrito anteriormente em outros estudos (modelo de glomerulosclerose induzida por doxorubicina (AL-BAYATI et al., 2002), glomerulosclerose em camundongo FGS/Kist (PARK et al., 2003) e glomerulonefrite induzida por anti-GBM (LEH et al., 2004,)). Os possíveis mecanismos de ação da pirfenidona ainda não estão claros mas podem ser decorrentes da diminuição da produção de citocinas fibrogênicas, como o fator de crescimento de transformação (TGF- β) e também no mecanismo de regulação da produção de matriz extracelular, ou seja, colágeno tipo I e tipo III, fibronectina, PAI (inibidor da ativação do plasminogênio) e MMPS (enzimas responsáveis por degradar a MEC). Neste contexto, Sun e colaboradores (2006) demonstraram que a excessiva deposição de matriz extracelular é um forte marcador de diabetes nefropática, de maneira que a modulação da atividade das enzimas responsáveis pela degradação da matriz pode ser um dos alvos de ação da pirfenidona.

Com relação aos grupo triplice e quádruplo, houve diminuição significativa dos níveis de fibrose intersticial, estes atingindo níveis menores do que os encontrados nos animais do grupo CONTROLE. O emprego da associação de drogas terapêuticas, que possam influenciar na melhora da fibrose intersticial encontrada neste modelo tem grande relevância, principalmente pela fibrose intersticial ser apontada como o evento decisivo para a destruição do parênquima renal levando à perda da função do órgão (FUJIHARA et al. 1994).

Foi também avaliado o *turnover da matriz extracelular*, medido pela atividade de metaloproteinases (MMPs), que são responsáveis pela degradação da matriz extracelular. A atividade enzimática das MMPs (MMP-2 e a MMP-9) foi medida através da técnica de zimografia. Na zimografia a MMP-2 se apresenta de duas formas, que são visualizadas por duas bandas distintas. A banda superior representando a forma latente da MMP-2 e a banda inferior representando a forma ativa. As MMP-2 clivam principalmente o colágeno I, III, IV e fibronectina, enquanto as MMP-9 não tem ação sobre

as fibras de colágeno I e III e fibronectina, mas degradam o colágeno IV (STERNLICHT et al., 2001).

O processo de ativação das MMPs é complexo e a atuação destas enzimas de forma orquestrada é fundamental na remodelagem da MEC. No presente estudo foi detectado um aumento da atividade das MMPs, bem como da área de matriz intersticial, no grupo de nefropatia crônica (grupo NAME). *A priori*, tais resultados parecem conflitantes, haja a vista que as MMPs são responsáveis pela degradação de proteínas componentes da matriz. Entretanto, considerando-se que a manutenção do equilíbrio da matriz é regulada pelo aumento/diminuição da expressão dos seus próprios componentes, podemos interpretar o aumento da expressão das MMPs como uma resposta à elevação da expressão dos componentes da MEC. Na tentativa de manter o equilíbrio entre síntese e degradação, o aumento da expressão e ativação das MMPs seria esperado. Situações semelhantes foram relatadas em casos de doença renal em pacientes (REF) e em modelos experimentais de amiloidose (REF), rejeição crônica e de isquemia/perfusão (REF). Entretanto, há relatos de diminuição da expressão da MMP-2 em fibroblastos renais mantidos em cultura na presença de pirfenidona (HEWITSON et al., 2005), o que pode ser decorrente da ausência do estímulo agressor presente nos modelos experimentais.

Sob este aspecto, os níveis da expressão das MMPs verificados após os tratamentos com pirfenidona, maiores que aqueles encontrados no grupo NAME, parecem indicar o efeito da pirfenidona em degradar o excesso de matriz depositada pelo processo de fibrose renal. Baseados nestes resultados, é possível supor que uma das atividades antifibróticas da pirfenidona residiria na sua capacidade de elevar a taxa de degradação da MEC. A degradação da matriz pode ser regulada em alguns pontos chave, como o sistema de expressão das MMPs, a regulação da ativação destas proteínas e ainda na expressão, síntese ou degradação dos inibidores das metaloproteinases, os TIMPs.

Os TIMPs são inibidores reversíveis que competem pelo sítio ativo das MMPs com o colágeno, que é o substrato destas enzimas. No meio

intracelular, a fração de MMPs enzimaticamente ativas depende portanto não só da síntese e ativação das pró-MMPs, mas também da concentração dos inibidores. Como a ligação entre TIMPs e MMPs é do tipo reversível, ocorre um equilíbrio entre a população moléculas enzimáticas ligadas ao inibidor e a população de moléculas de enzima e inibidor livres. Este equilíbrio pode ser deslocado para qualquer um dos lados, dependendo do aumento e da diminuição da população de MMPs ou de TIMPs. O aumento da atividade das MMPs observado nos grupos tratados com pirfenidona pode estar relacionado à uma menor disponibilização de TIMPs, o que incrementaria a atividade enzimática das MMPs. Determinar os níveis de expressão das MMPs e dos seus inibidores, bem como suas concentrações relativas na presença da pirfenidona pode ser de grande valia para compreender o mecanismo de ação desta droga.

Devido à grande influência da inflamação na evolução das nefropatias crônicas progressivas, o presente estudo analisou a presença de macrófagos, linfócitos T e miofibroblasto no tecido renal e o papel da pirfenidona processo inflamatório.

Nos animais do grupo NAME foi detectado um grande número de macrófagos e de linfócitos T na região do interstício renal bem como na área dos glomérulos, confirmando a presença do processo inflamatório no modelo experimental utilizando L-NAME, (FUJIHARA et al.1998, GRACIANO et al., 2004).

O tratamento com losartan levou a uma diminuição significativa tanto do número de macrófagos quanto do número de linfócitos T, sendo que os animais que receberam o tratamento com MMF tiveram redução mais expressiva do número de macrófagos e linfócitos T. Este achado pode estar relacionado com o fato do losartan agir mais por via hemodinâmica do que antiinflamatória, como é o caso do MMF (FUJIHARA et al., 1998,GRACIANO et al.,2004).

O tratamento com pirfenidona apresentou diminuição significativa do número de macrófagos e de linfócitos T no parênquima renal e na área dos glomérulos, chegando a níveis próximos do normal, tendo novamente

destaque os grupos de animais que receberam as terapias associativas (tríplice e quádruplo). Desta forma, os resultados obtidos com o tratamento pirfenidona no presente estudo falam a favor da possibilidade da pirfenidona ter efeito na inflamação envolvida na progressão das doenças renais. LEH e colaboradores (2004) também demonstraram tais resultados em modelo experimental de glomerulonefrite, onde a pirfenidona além de utilizada isoladamente foi também associada ao candesartan (antagonista do receptor AT_1). De fato, a terapia tríplice e a quádrupla do presente estudo também apresentou diminuição significativa do número de macrófagos e do número de linfócitos T, mostrando que a pirfenidona mesmo quando em associação com uma ou mais drogas tem um papel na inflamação local.

No estudo por imunohistoquímica, um achado importante foi a diminuição significativa da expressão de α -actina nos grupos de animais que receberam os tratamentos com LOS, MMF e com pirfenidona refletindo uma diminuição do número de miofibroblastos. Miofibroblastos são as principais células efectoras do processo de fibrogênese, uma vez que sintetizam diversos componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, fibronectina e proteoglicanos (ARCOS et al., 2000). Em doenças renais progressivas o número de miofibroblastos tem efeito prognóstico, correlacionando-se com o desenvolvimento de fibrose (SAWASHIMA et al., 2000; GRACIANO et al., 2004). Desta forma, nos animais do grupo CONTROLE a expressão de α -actina foi vista apenas em células da musculatura lisa vascular. Nos animais do grupo NAME, a expressão da α -actina foi marcante no interstício renal e glomérulos, além da região da musculatura lisa vascular (TANG et al., 1997). Os animais do grupo LOS apresentaram redução significativa da expressão de α -actina, similarmemente o grupo de animais que recebeu tratamento com MMF, que apresentou diminuição significativa na expressão de α -actina no interstício renal e glomérulos, ambos chegando aos níveis normais (FUJIHARA et al., 1998 e 2000; GRACIANO et al., 2004).

Assim, a diminuição significativa do número de miofibroblastos (expressão de α -actina) observada nos animais tratados com pirfenidona

pode ter relevância no processo de proteção da progressão da doença renal, visto que os dados estatísticos demonstraram que esta redução chegou muito próxima dos níveis normais. O tratamento em associação ao LOS e HIDRA (terapia tríplice) e o tratamento em associação ao LOS, MMF e HIDRA (terapia quádrupla) demonstrou diminuição significativa da expressão de α -actina, também chegando muito próximo aos da normalidade.

Em relação à análise da atividade proliferativa de células renais (PCNA), os animais do grupo NAME apresentaram intensa atividade proliferativa de células renais, refletindo um ativo processo de inflamação renal. Já os animais tratados com as monoterapias, losartan e MMF, apresentaram diminuição significativa de células em proliferação atingindo valores menores do que os encontrados no grupo CONTROLE, tendo um destaque maior para os animais do grupo MMF. O mesmo já foi demonstrado anteriormente (FUJIHARA, et al., 1987; 1988 e 1998), onde os animais nefrectomizados que receberam como tratamento o MMF apresentaram redução significativa da atividade proliferativa de células renais. Os animais que receberam pirfenidona como monoterapia ou em associação não apresentaram redução significativa de células em proliferação.

O estudo in vitro com células em cultura teve o intuito de melhor compreender o mecanismo de ação da pirfenidona através da análise do seu efeito em fibroblastos derivados de explante renal (na realidade, miofibroblastos) e células de linhagem celular NRK-49F (fibroblastos renais). Um dos objetivos era observar se a droga agia diretamente sobre a capacidade de proliferação dos fibroblastos. Nossos resultados mostraram que houve diminuição significativa da proliferação das células sob a ação da pirfenidona, após o estímulo de citocinas como IL-1 β e angiotensina II. Nos fibroblastos derivados de explante renal este efeito foi observado menos intenso enquanto nos fibroblasto derivados de linhagem o efeito anti-proliferativo foi observado de forma mais marcante, possivelmente pela pureza celular. Estes dados estão em concordância com Hewitson e colaboradores (2001) que demonstraram o efeito anti-proliferativo da

pirfenidona em fibroblastos renais. Além disso, a análise da atuação da pirfenidona quanto à síntese de RNAm de componentes da matriz como colágeno I e colágeno III sobre fibroblastos derivados de linhagem celular mostrou uma tendência em diminuir a transcrição desses componentes. Resultados semelhantes foram observados por SHIMIZU et al. (1997) em modelo experimental de obstrução unilateral.

Ainda não está claro o efeito da pirfenidona quanto à expressão de RNAm para TGF- β em fibroblastos renais em cultura. Apesar de não ter sido observado nenhum efeito significativo desta droga nos níveis de RNAm para TGF- β em fibroblastos, foi detectado uma diminuição da expressão deste fator de crescimento em fibroblastos estimulados (tanto com IL-1 β e angiotensina II), indicando que a pirfenidona pode inibir a síntese de RNAm para TGF- β sob ação de estímulos inflamatórios.

Os resultados mais interessantes do efeito da pirfenidona em fibroblastos em cultura foram observados ao analisar a produção da forma ativa de TGF- β secretada no sobrenadante. A adição de pirfenidona na cultura de fibroblastos renais promoveu uma diminuição da secreção da forma biologicamente ativa de TGF- β , principalmente em fibroblastos derivados de explante renal e estimulados com IL-1 β . Este efeito também foi observado tanto nas células derivadas de explante renal quanto nas células derivadas de linhagem quando estimuladas com angiotensina II. Há relatos na literatura da diminuição da concentração de TGF- β secretado no sobrenadante de cultura em fibroblastos de quelóide e em células de carcinomas hepáticos humanos (CHAU et al., 1998; SHIN et al., 2003; YU et al., 2003). O TGF- β é um fator de crescimento fibrogênico, pois induz a síntese dos componentes da matriz extracelular e inibe a degradação destes componentes, além de estimular a ativação, a proliferação e a transdiferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Assim, o efeito da pirfenidona em promover diminuição da forma ativa do TGF- β tem relevância no possível mecanismo de ação anti-fibrótica desta droga.

Em resumo, os resultados do presente estudo indicam que em modelo experimental de nefropatia crônica a monoterapia com pirfenidona

apresenta um importante efeito renoprotetor, sendo inclusive, superior a monoterapias com losartan e MMF. A associação da pirfenidona, que tem efeito anti-fibrótico, com losartan, hidralazina e MMF (terapia tríplice e quádrupla) revelou-se mais efetiva quanto à renoproteção, demonstrando que a atuação paralela em diferentes mecanismos patogénéticos, pode representar uma importante alternativa de tratamento para a doença renal crônica progressiva. Além disso, os estudos *in vitro* demonstraram efeito anti-proliferativo em fibroblastos renais e possível efeito na produção de componentes de MEC. Estes efeitos devem ser consequência da diminuição da produção de TGF- β induzido pela pirfenidona.

VI. RESUMO E CONCLUSÕES

ESTUDO *in vivo*

1. Em modelo experimental de nefropatia crônica, a pirfenidona, como monoterapia, apresenta importante efeito na albuminúria, glomeruloesclerose e isquemia glomerular.
2. Os tratamentos que incluíram a pirfenidona foram os que tiveram melhor ação diminuindo a fibrose intersticial. O aumento da atividade das MMPs observado nos animais do grupo pirfenidona sugere que esta droga pode ter efeito anti-fibrótico também agindo através do aumento da degradação de MEC.
3. Com relação aos efeitos sobre o processo inflamatório, a pirfenidona, como monoterapia, teve ação eficaz sobre a infiltração de macrófagos e linfócitos. A associação de pirfenidona, losartan e hidralazina apresentou um efeito ainda mais marcante com relação ao processo inflamatório.
4. A associação de pirfenidona com losartan e hidralazina mostrou melhores resultados em termos de renoproteção

ESTUDO *in vitro*

1. Em cultura de fibroblastos renais, derivados tanto de explante renal como de linhagem NRK-49F, foi observado efeito anti-proliferativo da pirfenidona.
2. Com relação à síntese de RNAm para colágeno tipo I, colágeno tipo III e TGF- β , a adição de pirfenidona, teve efeito diminuindo expressão destes elementos que participam do processo de fibrose.
3. A adição de pirfenidona na cultura de fibroblastos renais promoveu uma diminuição da secreção da forma biologicamente ativa de TGF- β , principalmente em fibroblastos estimulados com angiotensina II.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- 1) No modelo experimental de nefropatia crônica progressiva, o tratamento com pirfenidona apresentou marcante efeito renoprotetor, diminuindo a fibrose renal, apesar da manutenção da hipertensão arterial.
- 2) A associação de pirfenidona com losartan e hidralazina produziu efeito ainda mais significativo, demonstrando que a associação de drogas que agem em diferentes mecanismos patogénéticos, podem representar uma importante alternativa de tratamento para a doença renal crônica progressiva.
- 3) Os resultados permitem concluir que a pirfenidona apresenta efeito anti-fibrótico, possivelmente por atuar inibindo a proliferação de fibroblastos e diminuindo a produção de componentes da matriz extracelular, como consequência da inibição do TGF- β .

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Bayati MA, Xie Y, Mohr FC, Margolin SB, Giri SN. Effect of pirfenidone against vanadate-induced kidney fibrosis in rats. *Biochem. Pharmacol.* 2002; 64: 517-525.
2. Arcos MI, Fujihara CK, Sesso A, de Almeida Prado EB, de Almeida Prado MJ, de Nucci G, Zatz R. Mechanisms of albuminuria in the chronic nitric oxide inhibition model. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2000; 279: 1060-1066.
3. Barnes JL, Mitchell RJ, Torres ES. Expression of plasminogen activator-inhibitor-1 (PAI-1) during cellular remodeling in proliferative glomerulonephritis in the rat. *J. Histochem. Cytochem.* 1995; 43: 895-905.
4. Baroni EA, Costa RS, Volpini R, Coimbra TM. Sodium bicarbonate treatment reduces renal injury, renal production of transforming growth factor-beta, and urinary transforming growth factor-beta excretion in rats with doxorubicin-induced nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* 1999; 34: 328-337.
5. Baylis C, Qiu C. Importance of nitric oxide in the control of renal hemodynamics. *Kidney Int.* 1996; 49: 1727-1731.
6. Bivalacqua TJ, Champion HC, De Witt BJ, Saavedra JE, Hrabie JA, Keefer LK, Kadowitz PJ. Analysis of vasodilator responses to novel nitric oxide donors in the hindquarters vascular bed of the cat. [*J Cardiovasc. Pharmacol.*](#) 2001; 38: 120-129.
7. Blank U, Essig M, Scanduzzi L, Benhamou M, Kanamaru Y. Mast cells and inflammatory kidney disease. *Immunol Rev.* 2007; 217: 79-95.
8. Bloudickova S, Rajnoch J, Lodererova A, Honsova E, Viklicky O. Mycophenolate mofetil ameliorates accelerated progressive nephropathy in rat. *Kidney Blood Press Res.* 2006; 29: 60-6.
9. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature.* 1992; 360: 361-364.
10. Border WA, Noble NA. TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int.* 1997; 51: 1388-1396.
11. Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E. Transforming growth factor β regulates production of proteoglycans by mesangial cells. *Kidney Int.* 1990; 37: 689-695.

12. Boutard V, Havouis R, Fouqueray B, Philippe C, Moulinoux JP, Baud L. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J. Immunol.* 1995; 134: 2077-2084.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein -dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72: 248-254.
14. Broekman MJ, Eiroa AM, Marcus AJ. Inhibition of human platelet reactivity by endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vein endothelial cells in suspension: blockade of aggregation and secretion by an aspirin-insensitive mechanism. *Blood.* 1991; 78: 1033-1040.
15. Brook NR, Waller JR, Bicknell GR, Nicholson ML. The experimental agent pirfenidone reduces pro-fibrotic gene expression in a model of tacrolimus-induced nephrotoxicity. *J. Surg. Res.* 2005; 125: 137-143.
16. Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role of matrix metalloproteinase in renal pathophysiologies. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007, 292: 905-11. Review.
17. Chau D, Mancoll JS, Lee S, Zhao J, Phillips LG, Gittes GK, Longaker MT. Tamoxifen downregulates TGF-beta production in keloid fibroblasts. *Ann Plast Surg.* 1998, 40:490-3.
18. Cheng S, Pollock AS, Mahimkar R, Olson JL, Lovett DH. Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury. *FASEB J.* 2006, 20:1898-900.
19. Cohen EP. Fibrosis causes progressive kidney failure. *Med. Hypotheses.* 1995; 45: 459-462.
20. Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol.* 2007, 257: 143-79.
21. Davies M, Martin J, Thomas GJ, Lovett DH. Proteinases and glomerular matrix turnover. *Kidney Int.* 1992; 41: 671-678.
22. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 1993; 122:103-111.
23. Dirks JH, Brenner BM. Mechanisms of injury in progressive renal disease: insights from experimental data summary and concluding remarks. *Kidney Int.* 1994; 45: 22-23.

24. Douthwaite JA, Johnson TS, Haylor PW, Nahas-El M. Effects of transforming growth factor- β 1 on renal extracellular matrix components and their regulating proteins. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999; 10: 2109-2119.
25. Duong Van Huyen JP, Viltard M, Nehiri T, Freund N, Belair MF, Martinerie C, Lelongt B, Bruneval P, Lelievre-Pegorier M. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 is altered during nephrogenesis in fetuses from diabetic rats. *Lab. Invest.* 2007; 14. [Epub ahead of print].
26. Duymelinck C, Dauwe SE, Noiwen EJ, De Broe ME, Verpooten GA. Cholesterol feeding accentuates the cyclosporine-induced elevation of renal plasminogen activator inhibitor type 1. *Kidney Int.* 1997; 20: 1818-1830.
27. Eddy AA, Fogo AB. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 2999-3012.
28. Eddy AA. Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2005; 12: 353-65.
29. Ellershaw DC, Gurney AM. Mechanisms of hydralazine induced vasodilation in rabbit aorta and pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.* 2001; 134: 621-631.
30. Forman JP, Brenner BM. 'Hypertension' and 'microalbuminuria': the bell tolls for thee. *Kidney Int.* 2006; 69: 22-28.
31. Fujihara CK, Antunes GR, Mattar AL, Andreoli N, Malheiros DM, Noronha IL, Zatz R. Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition limits abnormal COX-2 expression and progressive injury in the remnant kidney. *Kidney Int.* 2003; 64: 2172-81.
32. Fujihara CK, Avancini Costa Malheiros DM, de Lourdes Noronha I, De Nucci G, Zatz R. Mycophenolate mofetil reduces renal injury in the chronic nitric oxide synthase Inhibition Model. *Hypertension.* 2001; 37: 170-175.
33. Fujihara CK, De Lourdes Noronha I, Malheiros, Antunes GR, de Oliveira IB, Zatz R. Combined mycophenolate mofetil and losartan therapy arrests established injury in the remnant kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000; 11: 283-290.
34. Fujihara CK, Malheiros DM, Donato JL, Poli A, De Nucci G, Zatz R. Nitroflurbiprofen, a new nonsteroidal anti-inflammatory, ameliorates structural injury in the remnant kidney. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: 573-579.
35. Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R, Noronha IL. Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int.* 1998; 54: 1510-1518.

36. Fujihara CK, Michellazzo SM, de Nucci G, Zatz R. Sodium excess aggravates hypertension and renal parenchymal injury in rats with chronic NO inhibition. *Am. J. Physiol.* 1994; 266: 697-705.
37. Furchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 373-376.
38. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.* 2003; 192: 500-503.
39. Gagliardini E, Benigni A. Therapeutic potential of TGF-beta inhibition in chronic renal failure. *Expert Opin Biol Ther.* 2007, 7: 293-304.
40. Garg UC, Hassid A. Inhibition of rat mesangial cell mitogenesis by nitric oxide-generating vasodilators. *Am. J. Physiol.* 1989; 257: 60-66.
41. Giri SN, Al-Bayati MA, Du X, Schelegle E, Mohr FC, Margolin SB. Amelioration of doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity by pirfenidone in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004; 53: 141-150.
42. Gonçalves AR, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Notonha IL, de Nucci G, Zatz R. Renal expression of COX 2, ANG II, and AT1 receptor in remnant kidney: strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroidal anti-inflammatory. *Am J Physiol Renl Physiol.* 2004, 286: 945-54.
43. Graciano ML, Cavaglieri Rde C, Delle H, Dominguez WV, Casarini DE, Malheiros DM, Noronha IL. Intrarenal renin-angiotensin system is upregulated in experimental model of progressive renal disease induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004; 15: 1805-1815.
44. Grotendorst GR; Duncan MR. Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J:* 2005, 19:729-38.
45. Herrera-Acosta J. The role of systemic and glomerular hypertension in progressive glomerular injury. *Kidney Int.* 1994; 45: 6-10.
46. Hewitson TD, Kelynack KJ, Tait MG, Martic M, Jones CL, Margolin SB, Becker GJ. Pirfenidone reduces in vitro rat renal fibroblast activation and mitogenesis. *J Nephrol.* 2001; 14: 453-460.
47. Ikeguchi H, Maruyama S, Morita Y, Fujita Y, Kato T, Natori Y, Akatsu H, Campbell W, Okada N, Okada H, Yuzawa Y, Matsuo S. Effects of human soluble thrombomodulin on experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2002, 61: 490-501.

48. Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 597-601.
49. Iwano M; Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2004;13: 279-84.
50. Iyer SN, Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Effects of pirfenidone on procollagen gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 289: 211-218.
51. Iyer SN, Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 291: 367-373.
52. Jinde K; Nikolic-Paterson DJ; Huang XR; Sakai H; Kurokawa K; Atkins RC; Lan HY. Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis.* 2001, 38: 761-9.
53. Jones SE; Kelly DJ; Cox AJ; Zhang Y; Gow RM; Gilbert RE;. Mast cell infiltration and chemokine expression in progressive renal disease. *Kidney Int.* 2003; 64: 906-13.
54. Keeton M, Ahn C, Eguchi Y, Burlingame R, Loskutoff DJ. Expression of type 1 plasminogen activator inhibitor in renal tissue in murine lupus nephritis. *Kidney Int.* 1995; 47: 148-157.
55. Kehrner JP, Margolin SB. Pirfenidone diminishes cyclophosphamide-induced lung fibrosis in mice. *Toxicol. Lett.* 1997; 90: 125-132.
56. Kelley VR, Singer GG. The antigen presentation function of renal tubular epithelial cells. *Exp. Nephrol.* 1993; 1: 102-111.
57. Kincaid-Smith P. Prevention of renal failure. *Heart Lung. Circ.* 2004; 13: S38-42.
58. Krag S, Danielsen CC, Carmeliet P, Nyengaard J, Wogensen L. Plasminogen activator inhibitor-1 gene deficiency attenuates TGF-beta1-induced kidney disease. *Kidney Int.* 2005; 68: 2651-2666.
59. Krag S, Osterby R, Chai Q, Nielsen CB, Hermans C, Wogensen L. TGF-beta1 induced glomerular disorder is associated with impaired concentrating ability mimicking primary glomerular disease with renal failure in man. *Lab Invest.* 2000, 80: 1855-68.
60. Kruithof EK. Plasminogen activator inhibitors-a review. *Enzyme.* 1988; 40: 113-21.

61. Krum H, Gilbert RE. Novel therapies blocking the renin-angiotensin-aldosterone system in the management of hypertension and related disorders. *J. Hypertens.* 2007; 25: 25-35.
62. Lan HY. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2003; 12: 25-9.
63. Lasky JA, Ortiz LA. Antifibrotic therapy for the treatment of pulmonary fibrosis. *Am. J. Med. Sci.* 2001; 322: 213-221.
64. Leh S, Vaagnes O, Margolin SB, Iversen BM, Forslund T. Pirfenidone and candesartan ameliorate morphological damage in mild chronic anti-GBM nephritis in rats. *Nephrol. Dial. Transp.* 2004; 23: 1-12.
65. Liu H, Drew P, Gaugler AC, Cheng Y, Visner GA. Pirfenidone inhibits lung allograft fibrosis through L-arginine-arginase pathway. *Am. J. Transplant.* 2005; 5: 1256-1263.
66. Marti HP. Role of matrix metalloproteinases in the progression of renal lesions. *Presse. Med.* 2000; 20: 811-817.
67. Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, Ponticelli C, Ritz E, Zucchelli P. Effect of the angiotensin-converting enzyme benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal insufficiency study Group. *N. Eng. J. Med.* 1996; 334: 939-945.
68. Miric G, Dallemagne C, Endre Z, Margolin S, Taylor SM, Brown L. Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 2001; 133: 687-694.
69. Mitch WE. Proteolytic mechanisms not malnutrition, cause loss of muscle mass in kidney failure. *J Ren Nutr.* 2006; 16: 208-11.
70. Morris CR, Morris SM Jr, Hagar W, Van Warmerdam J, Claster S, Kepka-Lenhart D, Machado L, Kuypers FA, Vichinsky EP. Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 168: 63-69.
71. Nahas AM, Muchaneta-Kubara EC, Essawy M, Soylemezoglu O. Renal fibrosis: insights into pathogenesis and treatment. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1997; 29: 55-62.
72. Noronha IL, Fujihara CK, Zatz R. The inflammatory component in progressive renal disease – are interventions possible? *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17: 363-368.

73. Okon K. Tubulo-interstitial changes in glomerulopathy II. Prognostic significance. *Pol J Pathol*. 2003; 54: 163-9.
74. Oliveira MB, Romao JE Jr, Zatz R. End-stage renal disease in Brazil: epidemiology, prevention, and treatment. *Kidney Int. Suppl.* 2005; 97: S82-86.
75. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524-526.
76. Park HS, Bao L, Kim YJ, Cho IH, Lee CH, Hyun BH, Margolin SB, Park YH. Pirfenidone suppressed the development of glomerulosclerosis in the FGS/Kist mouse. *J. Korean. Med. Sci.* 2003; 18: 527-533.
77. Quiroz Y, Pons H, Gordon KL, Rincón J, Chávez M, Parra G, Herrera-Acosta J, Gómez-Garre, Largo R, Egido J, Johnson RJ, Rodríguez-Iturbe. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am. J. Physiol.* 2001; 281: 38-47.
78. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 1448-1456.
79. Ribeiro MO, Antune E, de Nucci G, et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis - a new model of arterial hypertension. *Hypertension*. 1992; 20: 298-303.
80. Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int.* 1997; 52: 1497-510.
81. 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.* 1996; 61: 2521-2528.
82. Schnaper HW, Kopp JB, Poncelet AC, Hubchak SC, Stetler-Stevenson WG, Klotman PE, Kleinman HK. Increased expression of extracellular matrix proteins and decreased expression of matrix proteases after serial passage of glomerular mesangial cells. *J. Cell. Sci.* 1996; 109: 2521-2528.
83. Schor N, Srougi M. Nefrologia urologia clínica. In: Zatz R, Fujihara CK. *Insuficiência renal crônica – Progressão da doença renal*. São Paulo: Ed. Savier; 1998. 34-36.
84. Sharma AK, Mauer SM, Kim Y, Michael AF. Interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 1993; 44: 774-788.

85. Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Andoh TF. Pirfenidone treatment decreases transforming growth factor-beta1 and matrix proteins and ameliorates fibrosis in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am. J. Transplant.* 2002; 2: 111-119.
86. Shimizu T, Fukagawa M, Kuroda T, Hata S, Iwasaki Y, Nemoto M, Shirai K, Yamauchi S, Margolin SB, Shimizu F, Kurokawa K. Pirfenidone prevents collagen accumulation in the remnant kidney in rats with partial nephrectomy. *Kidney Int.* 1997; 63: 239-243.
87. Shimizu T, Kuroda T, Hata S, Fukagawa M, Margolin SB, Kurokawa K. Pirfenidone improves renal function and fibrosis in the post-obstructed kidney. *Kidney Int.* 1998; 54: 99-109.
88. Shin JW, Chung YH, Park MI, Kim JA, Choi MH, Lee YJ, Ryu SH, Park NH, Lee HC, Lee YS, Suh DJ, Yu ES. The effects of tamoxifen on human hepatocellular carcinoma cell proliferation and transforming growth factor-beta1 expression. *Taehan Kan Hakhoe Chi.* 2003, 9:10-6.
89. Srinivasan J, Jayadev S, Kumaran D, Ahamed KF, Suresh B, Ramanathan M. Effect of losartan and enalapril on cognitive deficit causes by Goldblatt induced hypertension. *Indian J Exp Biol.* 2005, 43: 241-6.
90. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2001; 17: 463-516.
91. Strutz F, Muller GA, Neilson EG. Transdifferentiation: a new angle on renal fibrosis. *Exp. Nephrol.* 1996; 4: 267-270.
92. Sun SZ, Wang Y, Li Q, Tian YJ, Liu MH, Yu YH. Effects of benazepril on renal function and kidney expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in diabetic rats. *Chin Med J.* 2006; 119: 814-21.
93. Tang WW, Van GY, Qi M. Myofibroblast and $\alpha 1$ (III) collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int.* 1997; 51: 926-931.
94. Torres VE, Velosa JA, Holley KE, Kelalis PP, Stickler GB, Kurtz SB. The progression of vesicoureteral reflux. *Ann. Intern. Med.* 1980; 92: 776-784.
95. Utimura R, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha IL, Zatz R. Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes. *Kidney Int.* 2003, 63: 209-16. Erratum in: *Kidney Int.* 2003, 63: 1602.
96. Wang W, Vijay K, Lan HY. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology.* 2005, 10: 48-56.

97. Wu LL, Cox A, Roe CJ, Dziadek M, Cooper ME, Gilbert RE. Transforming growth factor β 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int.* 1997; 51: 1553-1567.
98. Yamada SS, Sasaki AL, Fujihara CK, Malheiros DM, De Nucci G, Zatz R. Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. *Hypertension.* 1996, 27: 1165-1172.
99. Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH. et al. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in himam glomerular diseases. *Kidney Int.* 1996, 49: 461-469.
100. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Gold LI, Hishida A, nagase M, Cohen Ah, Border WA. Increased levels of transforming growth factor-beta in HIV-associated nephropathy. *Kidney Int.* 1999, 55: 579-592.
101. Yang N, Isbel NM, Nikolic-Paterson DJ, Li Y, Ye R, Atkins RC, Lan HY. Local macrophage and myofibroblasts proliferation in progressive renal injury in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 1998, 13: 1967-1974.
102. Yu L, Border WA, Huang Y, Noble NA. TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int.* 2003, 64: 844-56.
103. Zatz R, Fujihara CK. Mechanisms of progressive renal disease: role of angiotensin II, cyclooxygenase products and nitric oxide. *J Hypertens Suppl.* 2002, 20: S37-44. Review.
104. Zatz R. A low-cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rat. *Lab. Anim. Sci.* 1990, 42: 198-201.
105. Zeisberg M, Strutz F, Muller GA. Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J. Nephrol.* 2000, 13: 111-20.
106. Zhang G, Moorhead PJ, Nahas AM. Myofibroblasts and the progression of experimental glomerulonephritis. *Exp. Nephrol.* 1995, 3: 308-318.