

**FERNANDA CRISTINA MAZALI**

**NEFROPATIA CRÔNICA POR CICLOSPORINA:  
Papel do ácido úrico e do sistema renina angiotensina  
aldosterona como mediadores de disfunção endotelial,  
inflamação e vasculopatia**

**CAMPINAS, 2011**





---

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Ciências Médicas**

**NEFROPATIA CRÔNICA POR CICLOSPORINA:  
Papel do ácido úrico e do sistema renina angiotensina  
aldosterona como mediadores de disfunção endotelial,  
inflamação e vasculopatia**

**FERNANDA CRISTINA MAZALI**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilda Mazzali e co-orientação Prof. Dr. José Butori Lopes de Faria

**CAMPINAS, 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

M456n Mazali, Fernanda Cristina, 1978  
Nefropatia crônica por ciclosporina: papel do ácido úrico e do sistema renina angiotensina aldosterona como mediadores de disfunção endotelial, inflamação e vasculopatia. / Fernanda Cristina Mazali. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Marilda Mazzali  
Coorientador: José Butori Lopes de Faria  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ciclosporina. 2. Ácido úrico. 3. Angiotensina. 4. Fibrose. I. Mazzali, Marilda. II. Faria, José Butori Lopes de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Cyclosporine nephropathy: effect of uric acid and the renin angiotensin aldosterone system as mediators of endothelial dysfunction, inflammation and vasculopathy

**Palavra-chave em inglês:**

Cyclosporine

Uric acid

Angiotensine

Fibrosis

**Área de concentração:** Ciências Básicas

**Titulação:** Doutor em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Marilda Mazzali [Orientador]

José Butori Lopes de Faria [Coorientador]

Márcio Dantas

Hélady Sanders Pinheiro

*Wilson Nadruz Júnior*

André Fattori

**Data da defesa:** 03-08-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Faculdade de Ciências Médicas

---

## Banca examinadora da tese de Doutorado

Fernanda Cristina Mazzali

---

---

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilda Mazzali

---

---

### Membros:

---

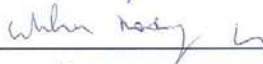
1. Prof. Dr. Márcio Dantas



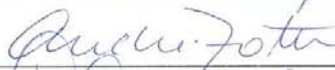
2. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hélydy Sanders Pinheiro



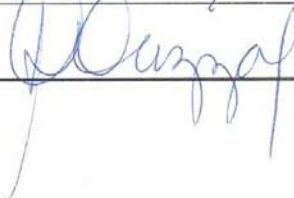
3. Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior



4. Prof. Dr. André Fattori



5. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilda Mazzali



Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 03/08/2011

---



Aos meus pais,  
Italo (*in memoriam*) e Maria Lúcia





## AGRADECIMENTOS

---

Aos meus pais, Italo Mazali (*in memoriam*) e Maria Lucia, pelo amor incondicional, valores e princípios, constante incentivo e, por me fazerem acreditar que tudo pode melhorar, basta querer!

A toda minha família, especialmente aos meus irmãos Ana Lúcia, Ítalo, Carlos Eduardo e a minha mãe, pessoas queridas que somaram uma dimensão e sentido especial a minha vida. Obrigada por estarem sempre presentes e compartilharem as angústias e alegrias.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Marilda Mazzali, por acreditar no meu trabalho e compartilhar comigo seu tema de pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Butori Lopes de Faria, pela amizade e por toda ajuda durante a realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Gentil Alves Filho, pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Nefrologia: Patrícia, Fabiana, Sohemys e Silvano, pelo ótimo ambiente de trabalho; por toda ajuda e por tornarem meu trabalho mais leve, interessante e alegre.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica Experimental, pela grande atenção e ajuda no processamento do material histológico.

Ao laboratório de Líquidos Biológicos-HC/UNICAMP, pelas dosagens dos níveis de ciclosporina.

À disciplina de Nefrologia- Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp, pelas oportunidades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado (processo nº 07/055084-3).



*“Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver  
apesar de todos os desafios,  
incompreensões e períodos de crise.*

*Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas  
e se tornar um autor da própria história.*

*É atravessar desertos fora de si,  
mas ser capaz de encontrar um oásis  
no recôndito da sua alma.*

*É agradecer a Deus a cada manhã  
pelo milagre da vida.*

*Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.*

*É saber falar de si mesmo.*

*É ter coragem para ouvir um “não”.*

*É ter segurança para ouvir uma crítica,  
mesmo que injusta.*

*Pedras no caminho?*

*Guardo todas, um dia vou...*

*Construir um castelo”.*

**Fernando Pessoa**





# RESUMO



A nefrotoxicidade por ciclosporina caracteriza-se, do ponto de vista histológico, por fibrose intersticial em faixa, atrofia tubular e hialinose de arteríolas aferentes glomerulares, ou seja, um quadro compatível com doença renal isquêmica. Esta isquemia provocada pela ciclosporina leva a redução da taxa de filtração glomerular, com conseqüente elevação dos níveis séricos de ácido úrico. Além disto, a ciclosporina altera o transporte tubular de urato, favorecendo o desenvolvimento de hiperuricemia.

No modelo experimental de nefropatia pela ciclosporina, a elevação dos níveis de ácido úrico apresenta associação com lesão túbulo intersticial mais severa, além de maior frequência de hialinose de arteríola aferente. Em estudos anteriores demonstramos que a hiperuricemia agrava a nefrotoxicidade pela ciclosporina e também que, a administração concomitante de agentes hipouricemiantes previne a lesão renal pela CsA. Assim, consideramos a hipótese de que, em um modelo experimental de nefropatia crônica pela ciclosporina, instalada, a normalização dos níveis de ácido úrico com alopurinol ou benzbromarona poderia reverter a lesão renal estabelecida.

Nefropatia pela ciclosporina foi induzida em ratos Sprague Dawley com injeções subcutâneas diárias de ciclosporina, em associação com dieta hipossódica, por 5 semanas. Ao final deste período, grupos experimentais foram divididos com interrupção da ciclosporina, tratamento com CsA isolada ou em associação com alopurinol ou benzbromarona por um período adicional de 4 semanas. Ao final de 9 semanas de estudo, foram realizadas avaliações funcionais e histológicas.

Neste modelo, a co-administração de alopurinol ou benzbromarona cursou com redução dos níveis de ácido úrico e minimizou o quadro de nefrotoxicidade estabelecida por ciclosporina, através da redução de hialinose arteriolar, glomeruloesclerose e fibrose intersticial, além da melhora da função renal, do estresse oxidativo e da apoptose, porém sem efeito anti inflamatório, avaliado pelo infiltrado de macrófagos e pela expressão de osteopontina. Os resultados mais significativos no grupo tratado com alopurinol sugerem que, além do efeito hipouricemiante, o alopurinol pode também apresentar um mecanismo antioxidante, conforme demonstrado pela redução da peroxidação

lipídica e da geração de radicais livres, resultando em menor intensidade de apoptose de células tubulares renais. Assim, a redução dos níveis de ácido úrico neste modelo atuou como protetor na progressão da lesão de microvasculatura e na redução da área de fibrose intersticial, mas não da lesão inflamatória.

No modelo de nefropatia pela ciclosporina, assim como no de hiperuricemia, ocorre elevação da atividade de renina, sugerindo a participação do sistema renina angiotensina aldosterona na fibrose renal. Para determinar este efeito, um segundo estudo utilizou a associação de um inibidor de enzima conversora da angiotensina (enalapril), um bloqueador de receptor AT1 de angiotensina (losartan) ou um inibidor competitivo da aldosterona (espironolactona) ao tratamento com ciclosporina, após a instalação da lesão. Os animais experimentais receberam ciclosporina por 5 semanas, e após a instalação da nefropatia, foram divididos em um dos grupos experimentais e acompanhados por um período adicional de 4 semanas.

A utilização de moduladores do SRAA também cursou com melhora funcional e histológica da nefropatia pela ciclosporina, sem alteração dos marcadores de inflamação intersticial. A melhora da vasculopatia pode ser atribuída à redução do remodelamento vascular com estas drogas, porém com efeito limitado sobre a geração de radicais livres de oxigênio e apoptose de células tubulares.

Em resumo, os resultados do presente estudo indicam que em modelo experimental de nefrotoxicidade por CsA, o uso de hipouricemiantes ou de modeladores do sistema-renina-angiotensina-aldosterona apresentaram um importante efeito renoprotetor, comparável, do ponto de vista funcional, à interrupção do tratamento com ciclosporina.

As duas abordagens terapêuticas foram eficientes na limitação da progressão da nefropatia, com reversão parcial da fibrose intersticial, provavelmente mediada por melhora de oxigenação tecidual secundária à redução da vasculopatia e do remodelamento vascular. A manutenção do estímulo tóxico da ciclosporina, com manutenção da inflamação, da geração de radicais livres de  $O_2$  e da apoptose de células tubulares, entretanto, não foi completamente neutralizado pela intervenção farmacológica.





# **ABSTRACT**



Chronic allograft nephropathy is characterized by stripped tubular atrophy and interstitial fibrosis, in presence of arteriolar hyalinosis, resembling an ischemic pattern of chronic kidney disease. Chronic ischemia is associated with reduced glomerular filtration rate, and increase in serum uric acid levels. Cyclosporine *per se* also has a direct effect on tubular urate handling that facilitates the development of hyperuricemia.

Hyperuricemia exacerbates chronic cyclosporine nephropathy, with a more severe tubulointerstitial fibrosis and atrophy, as well as worsening of arteriolar hyalinosis. In a previous study we have shown that concomitant treatment with uric acid lowering agents limits the development of experimental CsA nephropathy. The hypothesis of the present study was that treatment with uric acid lowering agents, after the development of CsA nephropathy could reverse or reduce the severity of tubulointerstitial disease.

Male Sprague Dawley rats received daily SC injections of cyclosporine in presence of low salt diet, during 5 weeks. At the end of this period, experimental groups were assigned for CsA withdrawal, maintenance of daily CsA alone or associated with allopurinol or benzbromarone in drinking water for an additional period of 4 weeks. At the end of 9 weeks of study, rats were sacrificed for functional and morphological analysis of kidneys.

In this model, concomitant treatment with allopurinol or benzbromarone was associated with reduction of serum uric acid levels, improvement in renal function and renal disease, characterized by lower arteriolar hyalinosis index, less glomerulosclerosis and significant reduction in interstitial fibrosis area. Other findings included reduction in oxidative stress markers and apoptotic cells, despite of maintenance of inflammatory status, quantified by macrophage infiltration and osteopontin expression. Allopurinol treatment was associated with more significant changes, with reduction of free radical generation, and lower grade of apoptotic cells in renal cortex, suggesting a participation of antioxidant effects in association with uric acid reduction. Taken together, these data

suggests that reduction of serum uric acid in the established model of CsA nephropathy has a protective effect in microvascular lesions and progression of interstitial disease, despite the maintenance of interstitial inflammation.

In cyclosporine nephropathy, as well as in the experimental hyperuricemia model, renal disease is associated with increased renin activity, suggesting the participation of renin angiotensin aldosterone system (RAS) in the mechanism of disease. In order to analyze the effect of RAS in CsA nephropathy model, a second study tested the treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor (enalapril), a angiotensin II AT1 receptor blocker (losartan) or an aldosterone inhibitor (espironolactone) in association with cyclosporine after the development of chronic nephropathy. Experimental animals were treated with cyclosporine and low salt diet for 5 weeks, and then assigned for one treatment group, including cyclosporine withdrawal, cyclosporine alone, CsA and enalapril, CsA and losartan or CsA and espironolactone for an additional period of 4 weeks.

RAS blockade in the established model of CsA nephropathy was associated with improvement in renal function and interstitial fibrosis, despite the maintenance of interstitial inflammation. The most striking finding was the improvement of arteriolar hyalinosis and glomerulosclerosis, suggesting that the most important effect was protecting against vascular remodeling. The improvement in vasculopathy was associated with reduction in tissue hypoxia, with a partial reduction in oxidative stress and tubular cell apoptosis.

Both therapeutic interventions proved to be efficient in limiting progression of renal disease, with a partial reversion of interstitial fibrosis. The main mechanism is associated with improvement in renal tissue O<sub>2</sub> delivery, as a consequence of recovery of arteriolar hyalinosis and control of vascular remodeling. However, maintenance of CsA therapy was associated with a persistent toxic effect, with maintained interstitial inflammation, free radical generation and tubular cell apoptosis that was not neutralized by intervention.

In summary, this study suggests that in the experimental model of CsA nephropathy, concomitant treatment with uric acid lowering agents or RAS blockade have a renoprotective effect. This protection is comparable to CsA discontinuation, and can be an alternative for management of clinical CsA nephropathy, without the risks of reduction of immunosuppression.



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>ALP</b>	Alopurinol
<b>AngII</b>	Angiotensina II
<b>BENZ</b>	Benzbromarona
<b>BHT</b>	Butil Hidroxi Tolueno
<b>C0</b>	(C zero) nível de vale de Ciclosporina- após 12h de administração
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase - 2
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DRC</b>	Doença renal crônica
<b>ECA</b>	Enzima conversora de angiotensina
<b>ED-1</b>	Anticorpo primário anti-macrófagos
<b>ENL</b>	Enalapril
<b>ESP</b>	Espironolactona
<b>iECA</b>	Inibidor de enzima conversora de angiotensina
<b>IL-2</b>	Interleucina - 2
<b>LOS</b>	Losartan
<b>MCP-1</b>	Proteína atrativa de macrófagos - 1
<b>MDA</b>	Malonaldeído
<b>NFAT</b>	Fator nuclear de ativação de células T





<b>NMCE</b>	Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS-1</b>	Óxido nítrico sintetase - 1
<b>OPN</b>	Osteopontina
<b>PAC</b>	Pressão arterial de cauda
<b>PAS</b>	Ácido periódico de Schiff
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SC</b>	Subcutâneo
<b>SRAA</b>	Sistema renina angiotensina aldosterona
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
<b>TFG</b>	Taxa de filtração glomerular
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TUNEL</b>	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick end-labeling
<b>URAT1</b>	Transportadores de urato
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>VEH</b>	Veículo modelo ciclosporina - óleo de oliva
<b>VSMC</b>	Célula muscular lisa vascular
<b>XO</b>	Xantina oxidase



## LISTA DE TABELAS

---

	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1</b> Medida dos pesos (g) dos animais, nos diferentes grupos experimentais durante as 9 semanas de estudo com administração de agentes hipouricemiantes.....	115
<b>Tabela 2</b> Função renal, avaliada pela creatinina sérica (mg/dl) dos animais, tratados ou não com ciclosporina, sem e com intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.....	117
<b>Tabela 3</b> Medida dos níveis de ácido úrico (mg/dl) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.....	118
<b>Tabela 4</b> Níveis sanguíneos de CsA (C0), em ng/mL, nas semanas 5 e 9 de tratamento.....	120
<b>Tabela 5</b> Variação da pressão arterial de cauda (PAC mmHg) dos animais tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.....	120
<b>Tabela 6</b> Acometimento túbulo intersticial nos diferentes grupos tratados.....	122
<b>Tabela 7</b> Percentual de glomérulos esclerosados nos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.....	124
<b>Tabela 8</b> Fibrose Intersticial (% área cortical renal) nos diferentes grupos de tratamento.....	125



<b>Tabela 9</b>	Fibrose Intersticial (% área) em região cortical renal nos diferentes grupos.....	128
<b>Tabela 10</b>	Infiltrado intersticial de macrófagos (células ED-1+/mm <sup>2</sup> ) nos diferentes grupos experimentais.....	130
<b>Tabela 11</b>	Expressão de Osteopontina (% área) em região cortical renal dos animais dos diferentes grupos de tratamento.....	132
<b>Tabela 12</b>	Porcentagem de hialinose de arteríola aferente glomerular, nos diferentes grupos experimentais.....	135
<b>Tabela 13</b>	Detecção de Dano Oxidativo ao DNA (células 8-OHdG positivas) em córtex renal dos diferentes grupos experimentais.....	137
<b>Tabela 14</b>	Detecção de Malonaldeído [MDA] em homogenato de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.....	140
<b>Tabela 15</b>	Detecção de células caspase-3 positivas em camada cortical dos fragmentos de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.....	141
<b>Tabela 16</b>	Detecção de células positivas para reação de TUNEL em camada cortical dos fragmentos de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.....	144
<b>Tabela 17</b>	Resumo dos resultados da intervenção com hipouricemiantes na nefropatia por ciclosporina.....	146
<b>Tabela 18</b>	Medida dos pesos (g) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com modeladores do SRAA.....	147



<b>Tabela 19</b>	Função renal (creatinina sérica, mg/dl) dos animais experimentais, com e sem co-administração de agentes modeladores do SRAA, no modelo de nefropatia crônica pela ciclosporina.....	149
<b>Tabela 20</b>	Medida dos níveis séricos de ácido úrico dos animais com e sem intervenção terapêutica com agentes modeladores de SRAA no modelo de nefropatia crônica pela ciclosporina.....	151
<b>Tabela 21</b>	Níveis sanguíneos de CsA (C0), em ng/mL, nas semanas 5 e 9 de tratamento, nos diferentes grupos experimentais.....	152
<b>Tabela 22</b>	Variação da pressão arterial de cauda (PAC mmHg) dos animais tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes modeladores do SRAA.....	153
<b>Tabela 23</b>	Acometimento túbulo intersticial nos diferentes grupos tratados.....	154
<b>Tabela 24</b>	Percentual de glomérulos esclerosados nos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes modeladores do SRAA.....	155
<b>Tabela 25</b>	Fibrose intersticial (% área) nos diferentes grupos experimentais.....	157
<b>Tabela 26</b>	Fibrose intersticial (% área Direct Red +) em córtex renal dos animais dos diferentes grupos de tratamento.....	158
<b>Tabela 27</b>	Infiltrado de macrófagos (células ED-1+/mm <sup>2</sup> ) em interstício cortical e glomérulos dos animais dos diferentes grupos de tratamento.....	159





<b>Tabela 28</b>	Expressão de Osteopontina (% área) em região cortical renal dos animais dos diferentes grupos de tratamento.....	161
<b>Tabela 29</b>	Hialinose arteriolar aferente (%) nos diferentes grupos de estudo.....	162
<b>Tabela 30</b>	Detecção de Dano Oxidativo ao DNA (células 8-OHdG+/mm <sup>2</sup> ) em cortex renal dos diferentes grupos de tratamento.....	163
<b>Tabela 31</b>	Detecção de malonaldeído em homogenato de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais tratados com bloqueadores do SRAA.....	165
<b>Tabela 32</b>	Detecção de células caspase-3 positivas em camada cortical dos fragmentos de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.....	166
<b>Tabela 33</b>	Detecção de célula positiva para reação de TUNEL em camada cortical dos fragmentos de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.....	168
<b>Tabela 34</b>	Resumo dos resultados da intervenção com moduladores do SRAA em modelo de nefropatia pela ciclosporina.....	169



	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> Mecanismos fisiopatológicos da nefrotocidade pela ciclosporina. SRAA- sistema renina-angiotensina-aldosterona; TGF- $\beta$ 1-fator de crescimento transformador beta-1; PAI-1-inibidor do ativador do plasmogênio-1; MCP-1-proteína quimiotática de monócitos-1; VEGF-fator de crescimento do endotélio vascular.....	67
<b>Figura 2</b> Metabolismo do ácido úrico e potenciais intervenções para redução do risco cardiovascular.....	72
<b>Figura 3</b> Representação esquemática dos possíveis alvos terapêuticos para regressão da nefropatia por CsA. Alopurinol e benzbromarona normalizam os níveis de ácido úrico; losartan, enalapril e espironolactona modulam o sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	83
<b>Figura 4</b> Representação esquemática do desenho estudo (VEH-veículo; CsA-ciclosporina; ALP-alopurinol; BENZ-benzbromarona; LOS-losartan; ENL-enalapril; ESP-espironolactona; PAC-pressão arterial de cauda).....	100
<b>Figura 5</b> <b>Lesão Cortical:</b> Análise morfológica dos animais tratados com veículo (A) e com ciclosporina (B,C) durante 5 semanas. Em contraste com o grupo controle (A), os animais do grupo CsA apresentaram fibrose intersticial em faixa e atrofia tubular marcadas (B e C), alterações estas quantificadas para todos os grupos experimentais. (Coloração de Tricrômio de Masson, aumento 100X (A, B e C).....	127



<b>Figura 6</b>	<b>Fibrose Intersticial:</b> Em contraste com o grupo veículo (A), os animais do grupo CsA5 apresentaram extensas áreas de fibrose intersticial em faixa (B), alterações estas quantificadas para todos os grupos experimentais. (Coloração de Direct Red, aumento 100x).....	129
<b>Figura 7</b>	<b>Infiltrado de Macrófagos:</b> Em contraste com o grupo veículo (A), os animais do grupo CsA5 apresentaram intenso infiltrado de macrófagos no interstício renal (B), alteração quantificada em todos os grupos experimentais propostos. (Imunohistoquímica para ED-1, aumento 100x).....	131
<b>Figura 8</b>	<b>Osteopontina:</b> Em contraste com o grupo veículo (A), os animais do grupo CsA5 apresentaram expressão significativa de osteopontina (B), alteração quantificada em todos os grupos experimentais propostos. (Imunohistoquímica para OPN, aumento 100x (A,B) e aumento 200X (C,D)).....	134
<b>Figura 9</b>	<b>Hialinose Arteriolar:</b> Os animais do grupo CsA5 apresentaram hialinose arteriolar severa (Coloração PAS, aumento 1000x), alteração quantificada em todos os grupos experimentais propostos.....	136
<b>Figura 10</b>	<b>Estresse Oxidativo:</b> Em contraste com o grupo veículo (A: biópsia contra-corada com PAS/C e E: contra-corada com hematoxilina de Harris), os animais do grupo CsA5 apresentaram expressão significativa de osteopontina (B: biópsia contra-corada com PAS/D e F: contra-corada com hematoxilina de Harris), alteração quantificada em todos os grupos experimentais propostos. (Imunohistoquímica para 8-OHdG, aumento 100x (A,B,C,D) e aumento 1000X (E,F)).....	138



**Figura 11 Apoptose:** Em contraste com o grupo veículo (A), os animais do grupo CsA5 apresentaram expressão significativa de Caspase-3 em núcleo de célula tubular (B), alteração quantificada em todos os grupos experimentais propostos. (Imunohistoquímica para Caspase-3, aumento 100x (A,B))..... 143

**Figura 12 Apoptose:** Em contraste com o grupo veículo (A e C), os animais do grupo CsA5 apresentaram um aumento expressivo de células tubulares positivas para a reação de TUNEL (B e D), alteração quantificada em todos os grupos experimentais propostos. (Reação de TUNEL, aumento, 200x (A e B) e aumento, 1000X (C e D))..... 145





## LISTA DE GRÁFICOS

---

	<b>Pág.</b>
<b>Gráfico 1</b> Variação do peso (g) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.....	116
<b>Gráfico 2</b> Variação da creatinina sérica (mg/dL) dos animais, tratados ou não com CsA, com e sem intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.....	117
<b>Gráfico 3</b> Variação dos níveis séricos de ácido úrico sérico (mg/dL) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.....	119
<b>Gráfico 4</b> Variação da pressão arterial de cauda (PAC mmHg) dos animais tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.....	121
<b>Gráfico 5</b> Variação da lesão tubulo intersticial (atrofia tubular) nos grupos tratados com e sem intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.....	123
<b>Gráfico 6</b> Percentual de glomérulos esclerosados nas biopsias renais dos diferentes grupos experimentais.....	124
<b>Gráfico 7</b> Percentual de lesão cortical (coloração de Tricrômio de Masson) em animais de diferentes grupos de tratamento.....	126
<b>Gráfico 8</b> Fibrose intersticial (% área) em córtex renal, nos diferentes grupos experimentais.....	129
<b>Gráfico 9</b> Infiltrado Intersticial de macrófagos nos diferentes grupos.....	131



<b>Gráfico 10</b>	Expressão de osteopontina (% área) em região cortical renal dos animais dos diferentes grupos.....	133
<b>Gráfico 11</b>	Porcentagem de hialinose de arteríola aferente glomerular nos diferentes grupos experimentais.....	135
<b>Gráfico 12</b>	Detecção de dano oxidativo ao DNA (células 8-OHdG positivas) em córtex renal dos diferentes grupos experimentais.....	137
<b>Gráfico 13</b>	Detecção de malonaldeído [MDA] em homogenato de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.....	140
<b>Gráfico 14</b>	Detecção de apoptose (células caspase-3 positivas/mm <sup>2</sup> ) em camada cortical dos fragmentos de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.....	142
<b>Gráfico 15</b>	Detecção de células positivas para a reação de TUNEL em camada cortical dos fragmentos de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.....	144
<b>Gráfico 16</b>	Variação do peso (g) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com modeladores do SRAA.....	148
<b>Gráfico 17</b>	Variação da creatinina (mg/dL) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com modeladores do SRAA.....	150
<b>Gráfico 18</b>	Variação dos níveis de ácido úrico (mg/dL) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com modeladores do SRAA.....	151
<b>Gráfico 19</b>	Acometimento túbulo intersticial (atrofia tubular) nos diferentes grupos tratados.....	154



<b>Gráfico 20</b>	Esclerose glomerular (%) nos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes modeladores do SRAA.....	156
<b>Gráfico 21</b>	Expressão de acometimento cortical % (LC) em animais dos diferentes grupos de tratamento.....	157
<b>Gráfico 22</b>	Fibrose intersticial (% área cortical) dos animais dos diferentes grupos de tratamento.....	158
<b>Gráfico 23</b>	Infiltrado intersticial de macrófagos (células ED-1 positivas/mm <sup>2</sup> ) em córtex renal, dos animais dos diferentes grupos de tratamento.....	160
<b>Gráfico 24</b>	Expressão de Osteopontina (% área) em região cortical renal dos animais dos diferentes grupos de tratamento.....	161
<b>Gráfico 25</b>	Hialinose de arteríola aferente glomerular (%), nos diferentes grupos de estudo, com utilização de moduladores do SRAA.....	162
<b>Gráfico 26</b>	Dano Oxidativo ao DNA (8OHdG+/mm <sup>2</sup> ) nos grupos de estudo.....	164
<b>Gráfico 27</b>	Deteção de malonaldeído em homogenato de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais tratados com bloqueadores do SRAA.....	165
<b>Gráfico 28</b>	Deteção de células caspase-3 positivas em camada cortical dos fragmentos de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.....	167
<b>Gráfico 29</b>	Apoptose (células TUNEL+) em células tubulares de cortex renal nos diferentes grupos.....	168



	<b>Pág.</b>
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	61
<b>1.1- Nefrotoxicidade por ciclosporina</b> .....	63
<b>1.2- Modelo experimental de nefrotoxicidade por ciclosporina</b> .....	68
<b>1.3- Ciclosporina e ácido úrico</b> .....	68
<b>1.4- Sistema-renina-angiotensina-aldosterona e ciclosporina</b> .....	72
<b>1.5- Estratégias para reduzir a nefrotoxicidade por ciclosporina</b> .....	77
1.5.1- Retirada da ciclosporina.....	79
1.5.2- Intervenção farmacológica.....	80
<b>2- HIPÓTESE</b> .....	85
<b>3- OBJETIVOS</b> .....	89
<b>4- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	93
<b>4.1- Desenho do estudo</b> .....	95
4.1.1- Grupos experimentais.....	96
4.1.1.1- Emprego de dieta hipossódica.....	96





4.1.1.2-	Modelo experimental de nefrotoxicidade pela ciclosporina.....	96
4.1.1.3-	Modelo experimental de nefrotoxicidade por ciclosporina com intervenção terapêutica para diminuição dos níveis de ácido úrico.....	97
4.1.1.4-	Modelo experimental de nefrotoxicidade por ciclosporina com intervenção terapêutica para modulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	98
<b>4.2-</b>	<b>Drogas experimentais.....</b>	<b>101</b>
<b>4.3-</b>	<b>Anestesia.....</b>	<b>101</b>
<b>4.4-</b>	<b>Coleta e processamento das amostras.....</b>	<b>101</b>
4.4.1-	Amostras de sangue.....	101
4.4.2-	Amostras de tecido renal.....	102
<b>4.5-</b>	<b>Parâmetros estudados.....</b>	<b>102</b>
4.5.1-	Peso.....	102
4.5.2-	Ingestão hídrica.....	103
4.5.3-	Dosagens bioquímicas.....	103
4.5.3.1-	Avaliação de função renal- dosagem de creatinina....	103
4.5.3.2-	Avaliação de hiperuricemia- dosagem de ácido úrico.....	103



4.5.3.3- Avaliação de dieta hipossódica.....	104
4.5.3.4- Dosagem de ciclosporina por imunoenensaio.....	104
<b>4.6- Avaliação da pressão arterial caudal-método oscilométrico.....</b>	<b>104</b>
<b>4.7- Análise histológica.....</b>	<b>105</b>
4.7.1- Avaliação morfológica.....	106
4.7.1.2- PAS (ácido periódico/reagente de Schiff).....	106
4.7.1.3- Avaliação de fibrose intersticial.....	106
4.7.1.3.1- Tricômio de Masson.....	106
4.7.1.3.2- Picrossírius (direct red).....	107
4.7.1.4- Avaliação de inflamação.....	107
4.7.1.4.1- Imunohistoquímica para macrófagos.....	107
4.7.1.4.2- Imunohistoquímica para osteopontina.....	108
4.7.1.5- Avaliação de lesão vascular.....	108
4.7.1.5.1- Hialinose arteriolar.....	109
4.7.1.6- Avaliação de estresse oxidativo.....	109
4.7.1.6.1- Imunohistoquímica para 8-OHdG.....	109
4.7.1.6.2- Avaliação da peroxidação lipídica em biópsia de córtex renal através da concentração de malonaldeído (Método de TBARS).....	110



4.7.1.7- Avaliação de apoptose.....	111
4.7.1.7.1- Imunohistoquímica para Caspase-3.....	111
4.7.1.7.2- Reação de TUNEL para apoptose.....	111
<b>4.8- Análise estatística.....</b>	<b>112</b>
<b>5- RESULTADOS.....</b>	<b>113</b>
<b>5.1- Modelo experimental de nefrotoxicidade por ciclosporina com intervenção terapêutica para diminuição dos níveis de ácido úrico.....</b>	<b>115</b>
5.1.1- Variação de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	115
5.1.2- Avaliação da função renal.....	116
5.1.3- Níveis de ácido úrico nos grupos avaliados.....	118
5.1.4- Avaliação dos níveis de ciclosporina.....	119
5.1.5- Avaliação da pressão arterial.....	120
5.1.6- Análise histológica.....	121
5.1.6.1- Avaliação morfométrica.....	121
5.1.6.1.1- Lesão túbulo intersticial.....	121
5.1.6.1.2- Lesão glomerular - glomeruloesclerose isquêmica.....	123
5.1.7- Avaliação de fibrose intersticial.....	125



5.1.7.1- Tricrômio de Masson.....	125
5.1.7.2- Picrossírius (Direct Red).....	128
5.1.8- Avaliação de inflamação intersticial.....	130
5.1.8.1- Infiltração intersticial de macrófagos.....	130
5.1.8.2- Expressão de osteopontina em região cortical.....	132
5.1.9- Lesão microvascular-hialinose de arteríola aferente glomerular.....	134
5.1.10- Avaliação de estresse oxidativo.....	136
5.1.10.1- Detecção de dano oxidativo ao DNA por 8-OHdG.....	136
5.1.10.2- Quantificação de peroxidação lipídica através da concentração de malonaldeído (método TBARS).....	139
5.1.11- Avaliação de apoptose.....	141
5.1.11.1- Detecção de Caspase-3 em córtex renal.....	141
5.1.11.2- Detecção de células tubulares positivas para Reação de TUNEL.....	143
<b>5.2- Modelo experimental de nefrotoxicidade por ciclosporina com intervenção terapêutica para modulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona.....</b>	<b>147</b>
5.2.1- Variação de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	147





5.2.2- Avaliação da função renal.....	148
5.2.3- Níveis de ácido úrico nos grupos avaliados.....	150
5.2.4- Avaliação dos níveis de ciclosporina.....	152
5.2.5- Avaliação da pressão arterial.....	152
5.2.6- Análise histológica.....	153
5.2.6.1- Lesão túbulo intersticial.....	153
5.2.6.2- Lesão glomerular-glomeruloesclerose isquêmica.....	155
5.2.7- Avaliação de fibrose intersticial.....	156
5.2.7.1- Tricômio de Masson.....	156
5.2.7.2- Picrossírius (Direct Red).....	157
5.2.8- Avaliação de inflamação.....	159
5.2.8.1- Infiltrado de macrófagos.....	159
5.2.8.2- Expressão de osteopontina em região cortical.....	160
5.2.9- Avaliação de lesão microvascular- hialinose de arteríola afereente glomerular.....	161
5.2.10- Avaliação de estresse oxidativo.....	163
5.2.10.1- Detecção de dano oxidativo ao DNA por 8-OHdG.....	163
5.2.10.2- Quantificação de peroxidação lipídica através da concentração de malonaldeído (método TBARS).....	164



5.2.11- Avaliação de apoptose.....	166
5.2.11.1- Detecção de Caspase-3 em córtex renal.....	166
5.2.11.2- Detecção de células tubulares positivas para a Reação de TUNEL.....	167
<b>6- DISCUSSÃO.....</b>	<b>171</b>
<b>7- CONCLUSÕES.....</b>	<b>189</b>
<b>7.1- Gerais.....</b>	<b>191</b>
<b>7.2- Específicas.....</b>	<b>191</b>
7.2.1- Uso de hipouricemiantes.....	191
7.2.2- Uso de modeladores do sistema-renina-angiotensina- aldosterona.....	192
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>193</b>





# 1- INTRODUÇÃO



## 1.1- Nefrotoxicidade por ciclosporina

A ciclosporina A (CsA) é um peptídeo fúngico, hidrofóbico, solúvel em lipídeos e em outros solventes orgânicos, característica responsável por seu grande volume de distribuição e concentrações teciduais elevadas. Essa droga tem potente atividade imunossupressora, considerada singular por seus efeitos seletivos sobre linfócitos. Seu uso clínico revolucionou o transplante de órgãos sólidos, reduzindo significativamente a morbidade e a incidência de rejeição aguda [De Mattos et al, 1996]. Por seu efeito imunossupressor, tem sido utilizada também em outras doenças com componente imunológico, como glomerulonefrites, artrite, uveítes e lesões dermatológicas [De Mattos et al, 1996].

A ciclosporina é classificada como um inibidor da calcineurina, e sua ação é mediada através da formação de um complexo com as ciclofilinas (proteínas citoplasmáticas), inibindo a atividade da proteína fosfatase 2B, a calcineurina. Este complexo CsA-Ciclofilinas inibe a desfosforilação e a transferência, para o núcleo celular, do fator nuclear de ativação de células T (NFAT-1), uma proteína regulatória importante, que promove a transcrição e a produção de interleucina-2 (IL-2) e de outras citocinas envolvidas no crescimento e proliferação de linfócitos T e B [Bobadilla et al, 2007; Li et al, 2004].

A CsA é metabolizada no fígado através do complexo enzimático do citocromo P450 (CYP). Como muitas outras drogas também são metabolizadas por esse sistema, a interação de outros fármacos com a CsA pode aumentar o risco de rejeição (baixa imunossupressão), infecção (alta imunossupressão) e toxicidade. A maioria dos metabólitos é eliminada por via biliar, sendo a eliminação renal secundária [Li et al, 2004].

Esta droga apresenta inúmeros efeitos colaterais, entre os quais se destacam a toxicidade (renal, hepática e neurológica), a hipertensão arterial sistêmica, a dislipidemia e a hiperuricemia, além de fenômenos estéticos, como hipertricose e hiperplasia gengival [Bennet et al, 1996 a, b; Wissmann et al, 1996].

A nefrotoxicidade da ciclosporina caracteriza-se, do ponto de vista histológico, por fibrose intersticial em faixa, atrofia tubular e hialinose de arteríolas aferentes glomerulares, ou seja, um quadro histológico compatível com doença isquêmica renal, por comprometimento de microvasculatura [Myers et al, 1991]. Sua etiopatogenia parece estar relacionada tanto à isquemia mantida por vasoconstrição pré-glomerular, como pela ativação direta de fatores pró-fibrogênicos no tecido renal [Shehata et al, 1995; Shihab et al, 1999; Shihab et al, 2000]. A isquemia crônica causada pelo uso de CsA também está associada ao surgimento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de peroxidação lipídica. Esta hipótese está baseada no fato de agentes antioxidantes atenuarem significativamente a nefropatia crônica pela ciclosporina [Li et al, 2004, Yoon et al, 2009].

A lesão vascular associada com a CsA manifesta-se principalmente em arteríola aferente glomerular. Na fase aguda, a lesão é dependente de vasoconstrição arteriolar, especialmente pré glomerular, levando a redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular. Esta lesão seria secundária a disfunção da célula endotelial, com aumento na liberação de vasoconstrictores como a endotelina-1 e o tromboxano e, produção reduzida de vasodilatadores como as prostaglandinas e óxido nítrico [Bennett WM, 1996a; Burdmann et al, 2003].

Além da lesão vascular direta, outros mediadores, como o aumento do tônus simpático renal, a endotelina-1, a angiotensina II e, a redução na produção de óxido nítrico e alterações na cascata de prostaglandinas-tromboxanoA<sub>2</sub> [Burdmann et al, 1994a; Bennett et al, 1996a; Elzinga et al, 2000; Darlametsos et al, 2001; Vítko e Viklický, 2004] estão alterados neste modelo.

Com a exposição prolongada a ciclosporina, cria-se um ambiente com disfunção endotelial crônica, com ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e estímulo a proliferação celular, desencadeando uma reação inflamatória com aumento na expressão de mediadores pró-inflamatórios,



incluindo o fator de crescimento transformador beta-1 (TFG- $\beta$ 1), a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e, a osteopontina (OPN). Estes fatores pró inflamatório facilitam a infiltração de monócitos e macrófagos no tecido renal e um desequilíbrio entre a síntese e a degradação dos elementos da matriz extracelular, com consequente modificação na arquitetura tecidual renal [Remuzzi et al, 1995; Mihatsch et al, 1988; Amuchastegui et al, 1998; Young et al, 1995; Pichler et al, 1995].

As alterações vasculares provocadas pela CsA e a consequente rarefação dos capilares peritubulares leva a uma redução do aporte de oxigênio e nutrientes aos túbulos e células intersticiais, com consequente glomeruloesclerose e fibrose intersticial [Burdmann et al, 1994b; Burdmann et al, 1995; Gardiner et al, 2004].

A lesão túbulo-intersticial é o marcador predominante da nefrotoxicidade por CsA, e resulta, em parte, do processo de morte celular por apoptose desencadeado pela droga. A CsA induz apoptose de linfócitos T e de células renais, levando a alteração estrutural do tecido renal. Thomas et al, (1998) foi o primeiro a descrever a associação entre apoptose e fibrose intersticial no modelo de nefropatia crônica por CsA. A apoptose induzida pela CsA está associada às proteínas Bcl-2, Fas e Fas-ligante, p53 e caspases, além do envolvimento da Ang II, NO, TGF- $\beta$ 1 e fator de crescimento epidermal (EGF) [Yang et al, 2001; Yoon et al, 2009].

A apoptose é bem evidente em células tubulares e intersticiais de biópsias de transplantados com nefrotoxicidade por CsA, também sendo observada em modelos animais e em cultura de células tubulares. A hipóxia tecidual ou isquemia renal, resultado da vasoconstrição causada pela CsA produz espécies reativas de oxigênio que promovem lesão celular e morte por apoptose, resultando em atrofia tubular, inflamação e infiltrado de macrófagos [Park et al, 2010]. A apoptose induzida por CsA é primariamente desencadeada através da via mitocondrial, por geração de radicais livres, redução da expressão de Bcl-2,

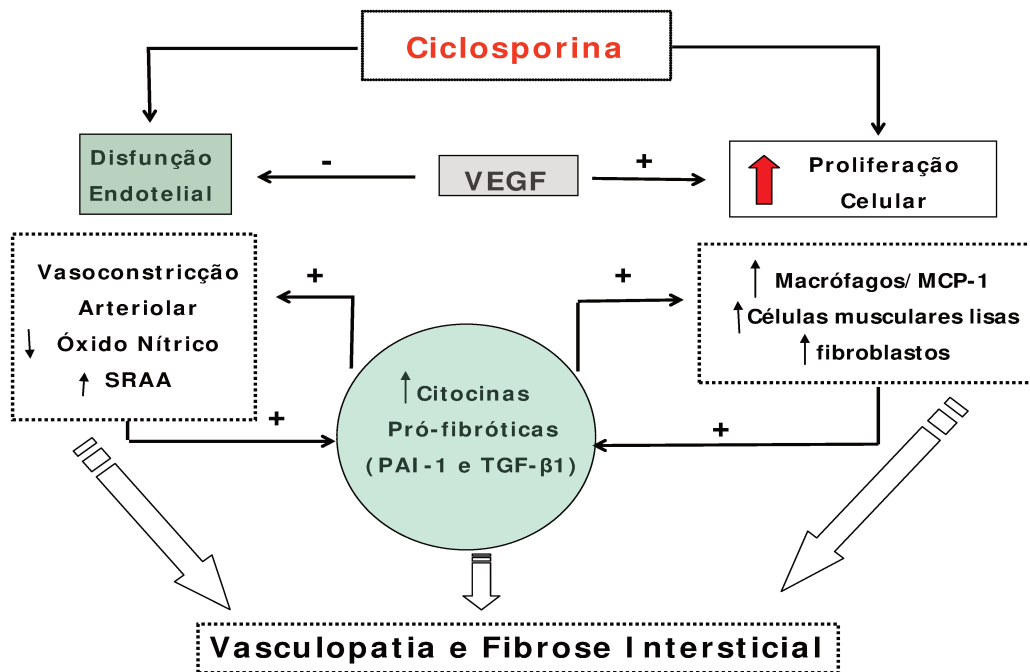
aumento da expressão de Bax-2 e translocação deste para o interior da mitocôndria, contribuindo para a indução da apoptose [Servais et al, 2008; Moe et al, 2006; Leist et al, 2001; Wilson, 1998; Will, 1986].

Os radicais livres apresentam papel importante em diversos mecanismos biológicos, incluindo apoptose, sinalização celular, controle da pressão arterial, divisão celular e transcrição de genes de proteínas. Assim, o desequilíbrio deste sistema promove a oxidação de macromoléculas, inativação enzimática, mutação genética e disfunção mitocondrial, resultando no desenvolvimento de doenças crônicas, inflamação, degeneração e envelhecimento [Rezzani, 2006; Araujo et al, 2006].

Os mecanismos moleculares da nefrotoxicidade por CsA não estão completamente elucidados, mas alguns autores sugerem que, a participação dos radicais livres é fundamental para a instalação do quadro de nefropatia crônica. Em vários modelos experimentais, foi observado um aumento significativo dos níveis de radicais livres em presença de ciclosporina (modelo murino) e também indução de peroxidação lipídica em cultura de células [Galletti et al, 2005]. Os possíveis mecanismos envolvidos incluem o aumento da atividade do citocromo P-450 nos rins, o desequilíbrio entre vasoconstrição e vasodilatação, resultando em hipóxia e reoxigenação tubular; o aumento da formação renal de tromboxano A<sub>2</sub> e a indução da produção de óxido nítrico. O uso prolongado de ciclosporina também modifica a expressão e a atividade de várias enzimas nos rins, como a ciclooxigenase, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase [Caspasso et al, 2008; Galletti et al, 2005; Cid et al, 2003].

Assim, vários mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento da lesão estrutural na nefrotoxicidade por CsA, incluindo **(a)** a ativação do sistema-renina-angiotensina-aldosterona, através dos receptores AT1 (vasoconstrição), com promoção de processo fibrótico e liberação de aldosterona; **(b)** a hipóxia renal, resultado da vasoconstrição induzida pela CsA, com produção de espécies reativas de oxigênio causando lesão e morte celular por apoptose, **(c)** o aumento

de TGF- $\beta$ 1 e de promotores de fibrose renal associada à diminuição de fatores que degradam a matriz extracelular [Figura 1].



**Figura 1-** Mecanismos fisiopatológicos da nefrotoxicidade pela ciclosporina. SRAA-sistema renina-angiotensina-aldosterona; TGF- $\beta$ 1-fator de crescimento transformador beta-1; PAI-1-inibidor do ativador do plasmogênio-1; MCP-1-proteína quimiotática de monócitos-1; VEGF-fator de crescimento do endotélio vascular.

## **1.2-Modelo experimental de nefrotoxicidade crônica pela ciclosporina**

O modelo experimental de nefrotoxicidade crônica pela ciclosporina é induzido, em ratos, através da administração diária de doses elevadas de ciclosporina, por via subcutânea, em presença de dieta restrita em sódio [Elzinga et al, 1993]. A dieta hipossódica realça a nefrotoxicidade crônica causada pela CsA, uma vez que, doses similares da droga, em presença de dieta normal em sódio, não produzem o mesmo grau de lesão funcional e anatômica. [Bennett et al, 1996a].

Quando se associa à dieta restrita em sódio a administração crônica de CsA, em roedores, ocorre uma exacerbação da vasoconstrição da arteríola aferente [Rossi et al, 1989], com conseqüente redução da taxa de filtração glomerular, e elevação dos níveis de ácido úrico [Watanabe et al, 2002], cuja ação como mediador de disfunção endotelial e inflamação favorece o agravamento da lesão vascular renal. A restrição de sal na dieta também ativa o SRAA, favorecendo o remodelamento vascular, com agravamento da arteriopatía [Mason et al, 1991]. Além desta ação, a ativação do SRAA também facilita o processo inflamatório e a diminuição da expressão da óxido nítrico sintetase, com desequilíbrio entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores renais [Kanellis et al, 2005].

Assim, consideramos como vias passíveis de modulação para o controle da nefropatia crônica pela ciclosporina a via do ácido úrico, com utilização de agentes hipouricemiantes e o sistema renina angiotensina aldosterona, com a utilização de diferentes agentes moduladores.

## **1.3- Ciclosporina e ácido úrico**

O ácido úrico (2, 6, 8-triidroxipurina) é um metabólito da degradação das purinas. Na maioria dos mamíferos, o metabolismo do ácido úrico continua até a alantoína, por meio da atividade enzimática da urato oxidase (uricase).

Nos humanos e nos grandes macacos, devido a uma mutação no gene da uricase, o ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas. Alguns autores consideram esta mutação uma vantagem evolutiva, pois o ácido úrico, pela sua propriedade de radical livre, exerce efeito protetor celular. Entretanto, o acúmulo de ácido úrico pode provocar a gota e suas complicações [Johnson et al, 2005].

As purinas são degradadas via xantina oxidase, numa reação irreversível, formando ácido úrico e ânions superóxidos. Nos rins, o ácido úrico é filtrado, podendo ser reabsorvido ou eliminado pelo túbulo proximal, através da ação de transportadores de urato (URAT1). As concentrações sanguíneas de ácido úrico são controladas pelo balanço entre produção e excreção. Sua produção pode estar relacionada com defeitos enzimáticos, estresse oxidativo e, em humanos, na ingestão de purinas e de bebidas alcoólicas. No entanto, na maioria dos casos, a hiperuricemia se manifesta como resultado de excreção renal deficiente, relacionada com os URAT1. [Alderman et al, 2004; Dawson et al, 2006].

A hiperuricemia é um efeito adverso conhecido da terapêutica com CsA, e pode ocorrer por dois mecanismos: como consequência da redução da taxa de filtração glomerular induzida pela lesão isquêmica da droga [Zurcher et al, 1996], mas também por ação direta da ciclosporina sobre o transporte tubular de ácido úrico, com diminuição da fração de excreção de urato [Marcén et al, 1996].

Em modelos experimentais em roedores, com bloqueio da uricase hepática com ácido oxônico, a hiperuricemia aumenta a expressão de renina no aparelho justaglomerular, e reduz a expressão da óxido nítrico sintetase-1 (NOS-1) na mácula densa. Este desequilíbrio entre o sistema-renina-angiotensina-aldosterona e o NOS-1 resulta no aumento da resistência vascular renal e aumento da reabsorção tubular proximal de sódio, facilitando o desenvolvimento de hipertensão arterial e de isquemia túbulo-intersticial [Mazzali et al, 2002a], e de arteriopatía pré glomerular, independente dos níveis de pressão arterial [Mazzali et al, 2002a], além de desenvolvimento, em longo prazo, de glomeruloesclerose [Nakagawa et al, 2003].

A manutenção de níveis elevados de ácido úrico está envolvida no desenvolvimento de remodelamento vascular, com proliferação de células musculares lisas vasculares (VSMC), mediada pelo SRAA [Corry et al, 2008; Mazzali et al, 2001a; Mazzali et al, 2002b], e também como consequência da disfunção endotelial, induzida pelo ácido úrico via bloqueio de produção de NO e mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS podem ser geradas por uma vários mecanismos, incluindo a reação da xantina oxidase com a xantina, que leva à geração de ânion superóxido e ácido úrico [Culleton et al, 2001; Khosla et al, 2005] [Figura 2].

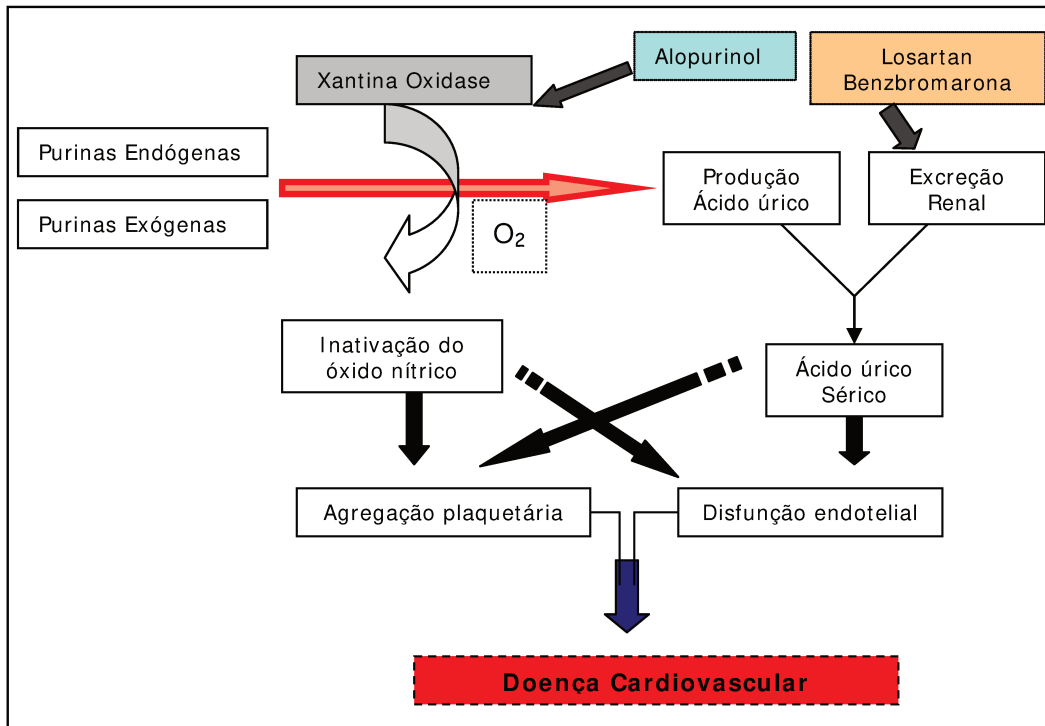
Além do efeito sobre o remodelamento vascular, o ácido úrico ativa uma série de fatores pró-inflamatórios, como proteína C reativa, MCP-1 [Sánchez-Lozada et al, 2005], fatores proliferativos de células musculares lisas vasculares (VSMC), PDGF [Watanabe et al, 2002; Kim et al, 2000], cascata de MAPkinase, e também aumenta da expressão de COX-2 (ciclooxigenase-2), relacionada com o processo proliferativo endotelial e com a regulação da expressão de renina no modelo de nefropatia crônica [Kang et al, 2002; Sánchez-Lozada et al, 2006; Feig et al, 2009].

A hiperuricemia pode ser controlada com dois grupos de drogas: o bloqueador da síntese de ácido úrico via xantina oxidase, como o alopurinol, ou os uricosúricos, como a benzbromarona e o losartan, que modulam os transportadores URAT1 nos rins, impedindo a reabsorção de ácido úrico [Csiky et al, 2008; Hamada et al, 2008; Li et al, 2008; Dawson et al, 2006; Lee et al, 2006; Iwanaga et al, 2007; Daskalopoulou et al, 2005; Reyes, 2003; Sica et al, 2002; Kamper et al, 2001; Yamamoto et al, 2000].

Estudos *in vitro* demonstraram que o losartan reduz a proliferação de VSMC e o quadro inflamatório, em cultura de células, ao inibir a captação de ácido úrico via transportador de urato (URAT1) [Hatch et al, 1996; Hamada et al, 2008]. Nos modelos experimentais, tanto de hiperuricemia pura [Mazzali et al, 2001b] como na nefropatia crônica, com ablação renal a 5/6 [Kang et al, 2002],

o tratamento com agentes hipouricemiantes, alopurinol ou benzbromarona protegeu a progressão da lesão renal. No modelo de nefropatia crônica pela ciclosporina, o bloqueio da uricase endógena, com agravamento da hiperuricemia, foi associado com fibrose intersticial e atrofia tubular mais severas, além de maior intensidade de hialinose de arteríola aferente glomerular [Mazzali et al, 2001b]. Neste modelo, a intervenção farmacológica com alopurinol promoveu proteção funcional, comparável à obtida com a utilização de precursores de NO, como a L-arginina [Assis et al, 1997].

Em estudo anterior, Mazali et al demonstraram que a co-administração dos agentes hipouricemiantes alopurinol ou benzbromarona, à ciclosporina, desde o início do período experimental limitou o desenvolvimento de nefropatia pela ciclosporina, com redução da inflamação intersticial, da arteriopatía e da proliferação celular, com melhor função renal final, medida pela creatinina sérica [Mazali et al, *in press*].



**Figura 2-** Metabolismo do ácido úrico e potenciais intervenções para redução do risco cardiovascular.

#### 1.4- Sistema renina-angiotensina-aldosterona e ciclosporina

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é conhecido pelas ações sistêmicas da angiotensina II (AngII), um octapeptídeo com potente propriedade vasoconstritora. A clivagem sequencial se processa a partir do angiotensinogênio, uma glicoproteína secretada principalmente pelo fígado, que sofre ação da renina, uma enzima pertencente à família das aspartilproteases, produzida pelas células justaglomerulares renais. O decapeptídeo liberado, a angiotensina I, é catalisada pela enzima conversora da angiotensina (ECA), uma metaloprotease produzida pelas células endoteliais principalmente do pulmão, liberando a AngII. A angiotensina-II, ao ligar-se a receptores do tipo AT1, desencadeia uma série de eventos, incluindo vasoconstrição, liberação de aldosterona, reabsorção de sódio no túbulo renal proximal, aumento na atividade



do sistema nervoso simpático e estímulo a mitogênese. No rim, a AngII provoca constrição da arteríola eferente glomerular, com aumento da pressão hidráulica do capilar glomerular e da fração de filtração, além de redução do coeficiente de ultrafiltração (Kf) por meio da contração da célula mesangial. As ações tubulares diretas e indiretas levam à reabsorção e retenção de sódio, além de secreção de potássio e hidrogênio. A AngII desempenha ainda outras funções como indução de hiperplasia e/ou hipertrofia via receptores AT<sub>1</sub>, que podem estar presentes em diversas células de diferentes órgãos. A Ang II também pode ser gerada localmente no rim, a partir de células mesangiais, atuando no controle da hemodinâmica intrarenal, no processo de filtração glomerular, e na proliferação e hipertrofia de células glomerulares, mediando fenômenos que evoluem para a esclerose glomerular [Mason et al, 1991; Hillebrand et al, 2002; Patzak et al, 2007].

A identificação de outros componentes do SRAA no tecido renal, como angiotensina-I, Ang II, Ang- (1-7) e Ang-(1-9), em níveis mais elevados que os circulantes sugerem um possível participação local de outras angiotensinas, sobretudo a Ang-(1-7), nas ações renais do SRAA [Dzu et al, 1998b]. Até recentemente, a maior parte das ações renais da Ang-II era atribuída exclusivamente à ativação de receptores AT<sub>1</sub> acoplados a diferentes vias de transdução de sinais, incluindo a ativação de fosfolipases C e A<sub>2</sub>, a inibição da adenilato ciclase, a abertura de canais de cálcio e a ativação de tirosina quinases. Estudos de imunohistoquímica demonstraram a presença de receptores AT<sub>1</sub> na superfície luminal das células tubulares proximais e distais, no músculo liso das arteríolas aferente e eferente e nas células mesangiais do glomérulo [Navar et al, 1999]. Apesar da evidente relevância fisiológica dos receptores AT<sub>1</sub>, recentemente foram detectados efeitos renais da Ang-II mediados por receptores AT<sub>2</sub>, incluindo vasodilatação e natriurese, além de inibição de proliferação e diferenciação celular. Estes efeitos do receptor AT<sub>2</sub> ocorrem por vias autócrinas, envolvendo a liberação de bradicinina, óxido nítrico e GMP cíclico, exercendo dessa forma um papel contra-regulador sobre os efeitos pressores e antinatriuréticos mediados via AT<sub>1</sub> [Carey et al, 2000].

A angiotensina-II exerce papel significativo na iniciação e progressão de lesões inflamatórias, como a arteriosclerose. No modelo experimental clássico de nefrotoxicidade pela ciclosporina, a dieta restrita em sódio exacerba a vasoconstrição da arteríola aferente glomerular, que é um dos mecanismos de toxicidade dos inibidores de calcineurina [Rossi et al, 1989]. A angiotensina II ativa células mesangiais tubulares e fibroblastos intersticiais, aumentando a expressão e a síntese de proteínas da matriz extracelular, permitindo a conversão de TGF- $\beta$  latente para ativo, promovendo apoptose celular, tanto por mecanismos isquêmicos como por não isquêmicos [Thomas et al, 1998; Shihab et al, 2000]. Com o uso crônico de CsA os níveis celulares de pró-renina estão aumentados, sugerindo que a sua secreção ou, possivelmente, a sua conversão em renina possa ser alterados pelo inibidor de calcineurina [Mason et al, 1991], aumentando, desta maneira, a produção de angiotensina-II. A alteração funcional da microvasculatura periférica e das arteríolas renais sugerem que o SRAA tem participação central na patogênese da lesão funcional e estrutural induzida pela CsA, devido à vasoconstrição da vasculatura renal, participação no processo fibrótico, na geração de espécies reativas de oxigênio e, ao aumentar o estresse oxidativo [Thomas et al, 1998; Mason et al, 1991; Nangaku et al, 2008].

O SRAA pode produzir efeitos diretos nos rins, como hipóxia tubulointersticial e glomeruloesclerose, através de lesão direta aos podócitos [Nangaku M et al, 2008]. Conseqüentemente, a supressão da influência da angiotensina-II reduziu a arteriosclerose, bem como o surgimento de elementos pró-inflamatórios em tecido renal. A angiotensina II recruta fatores de crescimento e regula a atividade das células epiteliais renais. Sabe-se que a Ang II promove um aumento da produção de VEGF nos rins por dois mecanismos independentes: ao sustentar a estimulação da transcrição do gene *vegf* e, ao induzir a tradução de seu mRNA [Feliers et al, 2006].

A angiotensina-II é a molécula chave da patogênese da nefropatia hipertensiva, levando a doença renal crônica e progredindo até o seu estágio final. Dentre os fatores deletérios da Ang-II, destacam-se: recrutamento de células

inflamatórias em tecido renal, indução da síntese de colágeno tipo IV na membrana basal glomerular, aumento da resposta inflamatória em túbulo proximal, além da fibrose túbulo-intersticial. A osteopontina (OPN) está entre os mediadores envolvidos na lesão renal pela Ang-II. A relação entre Ang-II e OPN é evidente em muitos estudos, onde o bloqueio de um ou mais componentes do SRAA diminui a expressão de OPN [Wolak et al, 2009]. Estudos anteriores mostraram que o efeito da angiotensina-II em estruturas cardiovasculares é reduzido quando a expressão de OPN é bloqueada ou eliminada, atenuando a fibrose cardíaca e a formação de aneurismas na aorta. A OPN tem papel importante no desenvolvimento da lesão renal mediada por angiotensina-II, tendo participação ativa resposta inflamatória, na transição epitélio-mesenquimal, fibrose, além de alterar a produção de espécies reativas de oxigênio [Wolak et al, 2009].

A administração prolongada de CsA produz a formação de radicais livres direta e ou indiretamente, via metabolização desta droga pelo citocromo P450. O aumento da excreção renal de peróxidos é observada em transplantados renais tratados com CsA. O uso crônico deste inibidor de calcineurina produz um aumento da expressão de receptores  $AT_1$  em vasos e em tecido renal. Foi demonstrado que a angiotensina-II estimula a NADH-NAD(P)H oxidase, uma enzima presente em células musculares lisas e em células endoteliais, levando a um aumento da geração de ânions superóxidos [Padi et al, 2002; Nishiyama et al, 2003].

O estresse oxidativo é um fator preditor de morbidade cardiovascular e de mortalidade por doença renal crônica, em decorrência do desequilíbrio entre a produção de oxidantes e dos sistemas antioxidantes de reparo [Parildar et al, 2003]. Este desequilíbrio, que está relacionado com o desenvolvimento da arteriosclerose, pode ser intensificado, através da estimulação do sistema imunológico, da ativação de células endoteliais e mesangiais por citocinas, e pela infiltração de macrófagos em rins transplantados. Estes eventos podem resultar numa adaptação metabólica dos néfrons, diminuição da massa renal,

hipertensão arterial, contração vascular renal por hipóxia e síntese de proteína de matriz extracelular, culminando em lesão vascular, glomerular e intersticial. A identificação da base 8-hidróxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) modificada no núcleo de células corticais renais revela uma modificação no DNA induzida por espécies reativas de oxigênio. Esta mutação na base nitrogenada é comumente usada como marcador da evolução do dano oxidativo ao DNA. O 8-OHdG é excretado pela urina e, a quantidade excretada depende da taxa de reparo do DNA, e da eficiência deste processo [Ghorbanihaghjo a et al, 2008; Ghee J et al, 2008; Biswas et al, 2006]. Estudos demonstraram que a modulação do SRAA com inibidor da enzima conversora de angiotensina (enalapril) ou com antagonista do receptor de angiotensina II (losartan), recuperou o dano endotelial e reduziu a lesão por estresse oxidativo [Argani et al, 2008].

A infusão de angiotensina II em roedores promove alterações histológicas similares às aquelas observadas no modelo de nefrotoxicidade pela ciclosporina [Franco et al, 2001], com aumento do infiltrado intersticial de macrófagos, maior expressão de TGF- $\beta$ , osteopontina, VEGF, facilitando o desenvolvimento de fibrose intersticial.

Estudos experimentais mostraram diminuição significativa da expressão de OPN, e TGF- $\beta$ , e da fibrose intersticial após a administração de antagonista de receptor de angiotensina II (losartan) [Burdmann et al, 1995], hidralazina e furosemida, em administração concomitante a ciclosporina durante todo o período de tratamento. Entretanto, somente o losartan foi capaz de prevenir a arteriopatía induzida pela CsA. O emprego de losartan na nefropatia crônica por CsA reduz citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de macrófagos e arteriopatía, acompanhado de decréscimo da expressão de osteopontina, AngII e TGF- $\beta$  [Yang et al, 2003; Kumar et al, 2007].

Estudos clínicos mostram que o bloqueio do SRAA com inibidores da enzima conversora de angiotensina II ou com antagonistas de receptor AT1 apresenta efeito nefroprotetor, prevenindo a hipertensão induzida pelo uso crônico

de CsA em humanos [Azzadin et al, 2002]. Adicionalmente, o losartan diminui os níveis séricos de ácido úrico em pacientes transplantados renais [Schmidt et al, 2001; Kang et al, 2008].

Além da angiotensina II, a aldosterona também participa na progressão das nefropatias, promovendo atrofia tubular remodelamento vascular e fibrose. [Feria et al, 2003]. A superprodução de aldosterona via ativação do SRAA leva a um aumento da reatividade vascular e da contração da musculatura vascular lisa, além de aumentar a expressão de catecolaminas e de receptores de angiotensina II, e de induzir o aumento do fator endotelial glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), resultando em piora do estresse oxidativo e diminuição da bioavailable de óxido nítrico [Bodadilla et al, 2007]. O tratamento com bloqueador de receptor de aldosterona tem se mostrado eficaz na redução de arteriopatias e da fibrose, sugerindo que a aldosterona é um importante mediador funcional e estrutural envolvido na nefropatia crônica [Feria et al, 2003; Rojas-Pérez et al, 2005; Macunluoglu et al, 2008]. Este efeito renoprotetor ocorre através da modulação da expressão de TGF- $\beta$  e de proteínas de matriz extracelular. O emprego de espironolactona associada com a CsA restabelece o equilíbrio entre agentes vasoconstritores (CsA mediados) e vasodilatadores (anti aldosterona), protegendo contra a vasoconstrição arteriolar. Rojas - Pérez e colaboradores (2005) observaram que o aumento da expressão de mRNA de pró-renina e a diminuição de receptor de endotelina induzido pela CsA, pode ser prevenido com a administração de inibidor competitivo de aldosterona [Heering et al, 2004a; Heering et al, 2004b; Deppe et al, 2002; Anarat et al, 1998; Dzu et al, 1998].

### **1.5- Estratégias para reduzir a nefrotoxicidade por ciclosporina**

A nefrotoxicidade crônica por CsA é reversível? Esta é uma questão controversa. Tradicionalmente, considera-se que a nefrotoxicidade aguda é reversível com a redução da dose ou com a suspensão da CsA, uma vez que a lesão isquêmica é predominantemente funcional. Entretanto, na presença de

fibrose intersticial, atrofia tubular e hialinose arteriolar, ou seja, de nefropatia estabelecida, a lesão é considerada irreversível e progressiva. [Bennett et al, 1996].

Entretanto, nos últimos anos, com o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no mecanismo de fibrose em diferentes modelos, incluindo a nefrotoxicidade crônica pela CsA, a utilização de drogas capazes de bloquear ou modular estes mecanismos inflamatórios vem sendo utilizados, tanto em estudos experimentais como em ensaios clínicos.

O modelo clássico de nefropatia pela ciclosporina é um modelo isquêmico, com ativação de SRAA e inibição da via do óxido nítrico. Além disto, a lesão é mediada por aumento do estresse oxidativo, com participação ativa de espécies reativas de oxigênio. Assim, a maioria dos estudos com intervenção farmacológica utiliza agentes vasodilatadores.

Nos primeiros estudos de intervenção, através do bloqueio do SRAA com enalapril, inibidor da enzima conversora de angiotensina-II (IECA), ou losartan, um antagonista do receptor AT1 da angiotensina-II, foi observado efeito renoprotetor, com redução da expressão de mediadores pró-fibróticos [Burdmann et al, 2003; Shihab et al, 1997]. O tratamento concomitante com CsA e losartan reduziu a expressão de osteopontina, o infiltrado de macrófagos, a expressão de TGF-beta 1, a fibrose intersticial em faixa, a taxa de morte celular por apoptose, além de reduzir a ocorrência de hialinose de arteríola aferente glomerular [Pichler et al, 1995; Thomas et al, 1998]. Estudos posteriores, utilizando um antagonista competitivo da aldosterona, a espironolactona administrado de forma simultânea com a CsA mostrou redução significativa da arteriopatía e da fibrose intersticial, associadas com a inibição da expressão de TGF-beta 1 e de proteínas de matiz extracelular, além da melhora da função renal dos animais tratados [Feria et al, 2003].

Em outros estudos de intervenção, a utilização de alopurinol apresentou efeito protetor sobre a função renal, comparável ao tratamento com precursores de NO, como a L-arginina. [Assis et al, 1997]. A administração de benzbromarona,

um agente uricosúrico sem atividade antioxidante mostrou resultado semelhante, sugerindo que a normalização dos níveis de ácido úrico limita o desenvolvimento da nefropatia induzida pela ciclosporina. [Mazali et al, in press].

Da mesma forma, a utilização de fatores de crescimento vascular (VEGF), HGF, e vasodilatadores como o polisulfato de pentosana preveniram parcialmente a lesão estrutural induzida pela CsA, porém sem melhorar a função renal. Em contrapartida, o bloqueio de receptor de endotelina A/B foi efetivo na manutenção da função renal, porém ineficaz na prevenção da ocorrência de arteriopatias e fibrose intersticial. Efeito intermediário, com redução parcial da lesão histológica e funcional da CsA foi obtido em estudos utilizando pravastina. [Pérez - Rojas et al, 2005; Bobadilla et al, 2007; Ji et al, 2002].

Como a maioria dos estudos considera a utilização destas estratégias terapêuticas durante o desenvolvimento da doença, ou seja, com administração concomitante com a ciclosporina, desde o início do tratamento, os resultados limitam-se à prevenção de desenvolvimento ou redução da intensidade da lesão. Entretanto, estas drogas não foram avaliadas como terapêutica para a nefropatia já estabelecida, o que aumentaria a sua aplicabilidade clínica.

#### 1.5.1- Retirada da ciclosporina

Vários protocolos experimentais e ensaios clínicos têm avaliado o efeito da redução da dose ou da retirada completa da CsA, com resultados ainda conflitantes, especialmente em relação às alterações morfológicas e às evidências moleculares [Li et al, 2003].

Em um estudo experimental, utilizando animais Sprague-Dawley, foi administrado CsA por cinco semanas, seguido por um período de acompanhamento de 2 ou 8 semanas sem a administração da droga. Ao final do estudo, a função renal e a arteriopatias eram comparáveis as dos animais tratados com placebo [Francheschini et al, 1998]. Li et al (2003) observaram

recuperação da função renal da lesão histológica, com redução de arteriopatias, infiltrado inflamatório e fibrose intersticial após a suspensão de CsA em ratos. O achado mais evidente neste estudo foi a diminuição da expressão de osteopontina, sugerindo que a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias induzida pela droga esteja associada com a recuperação da nefropatia [Li et al, 2003]. Entretanto, em estudo semelhante utilizando ratos obesos, Elzinga et al (2000) observaram, após 4 semanas da retirada da CsA, recuperação progressiva da taxa de filtração glomerular, porém sem melhora histológica. [Elzinga et al, 2000].

Estudo clínico avaliando os efeitos da redução ou da retirada do inibidor de calcineurina em um grupo de transplantados renais, mostrou que todos os pacientes apresentaram melhora significativa da função renal, além de menor taxa de perda de enxerto [Weir et al, 2004]. Entretanto, neste estudo clínico, a avaliação histológica pré e pós conversão não foi descrita, assim como a taxa de rejeição aguda com a suspensão da CsA.

Considerando estes estudos em conjunto, podemos concluir que a reversibilidade da nefropatia crônica está associada à redução da expressão de osteopontina, TGF- $\beta$ , EGF e, de apoptose de células renais com a interrupção da ciclosporina, e a resposta parece ser dependente do tempo e da dose de CsA administrada, bem como do tempo de avaliação após a interrupção da droga [Yoon et al; 2009].

#### 1.5.2- Intervenção farmacológica

Evitar a progressão das nefropatias para estágios avançados de doença renal crônica (DRC), com necessidade de diálise e transplante, ainda representa um grande desafio na prática clínica. Nas últimas décadas, grandes avanços têm ocorrido na compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão das nefropatias crônicas. O rim possui uma enorme capacidade de



regeneração em resposta à lesão aguda [Bonventre JV, 1998], que poderia ser utilizada para promover o reparo da doença renal crônica. Entretanto, a progressão da maioria das nefropatias crônicas ocorre de forma relativamente independente do estímulo que inicial [Remuzzi et al, 1998; Zeisberg et al, 2001]. Assim, o bloqueio dos mecanismos inflamatórios comuns tem sido uma estratégia utilizada para tentar retardar a progressão da doença renal crônica.

A nefrotoxicidade crônica por ciclosporina é caracterizada pela tríade histológica de glomeruloesclerose, fibrose intersticial e atrofia tubular em faixa e hialinose arteriolar, sendo o comprometimento túbulo-intersticial o melhor preditor da evolução da nefropatia [Remuzzi et al, 1998; Zeisberg et al, 2001]. Os principais mecanismos associados à fibrose túbulo-intersticial são a ativação de fibroblastos com deposição de matriz extracelular e a transição epitélio mesenquimal. Desta forma, intervenções interessantes seriam aquelas que conseguissem inibir a ativação de fibroblastos, reduzirem o acúmulo ou aumentar a degradação de matriz extracelular, e também de e prevenir ou reverter a transdiferenciação epitélio mesenquimal.

Entre os diferentes mediadores de lesão, TGF- $\beta$ 1 desempenha função primordial na nefrotoxicidade crônica pela CsA, e a sua inibição, com anticorpos específicos promoveu melhora histológica em estudo experimental de nefropatia por CsA em camundongos [Ling et al, 2003]. Os efeitos antiinflamatórios da suplementação de vitamina D também foram avaliados neste modelo. A administração de Paricalcitol<sup>®</sup> cursou com redução da expressão de TGF- $\beta$ 1, redução de fibrose intersticial e de apoptose de células tubulares renais, promovendo renoproteção. [Park et al, 2010; Reis F., 2010].

Outras estratégias incluem terapias com vitamina E e eritropoetina recombinante humana. A vitamina E preserva a função renal, reduz a produção de radicais livres e a fibrose tubulointersticial, provavelmente por supressão da produção de ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio, malonaldeído, heme-oxigenase-I e outros mediadores, como TGF- $\beta$  e OPN. O efeito preventivo

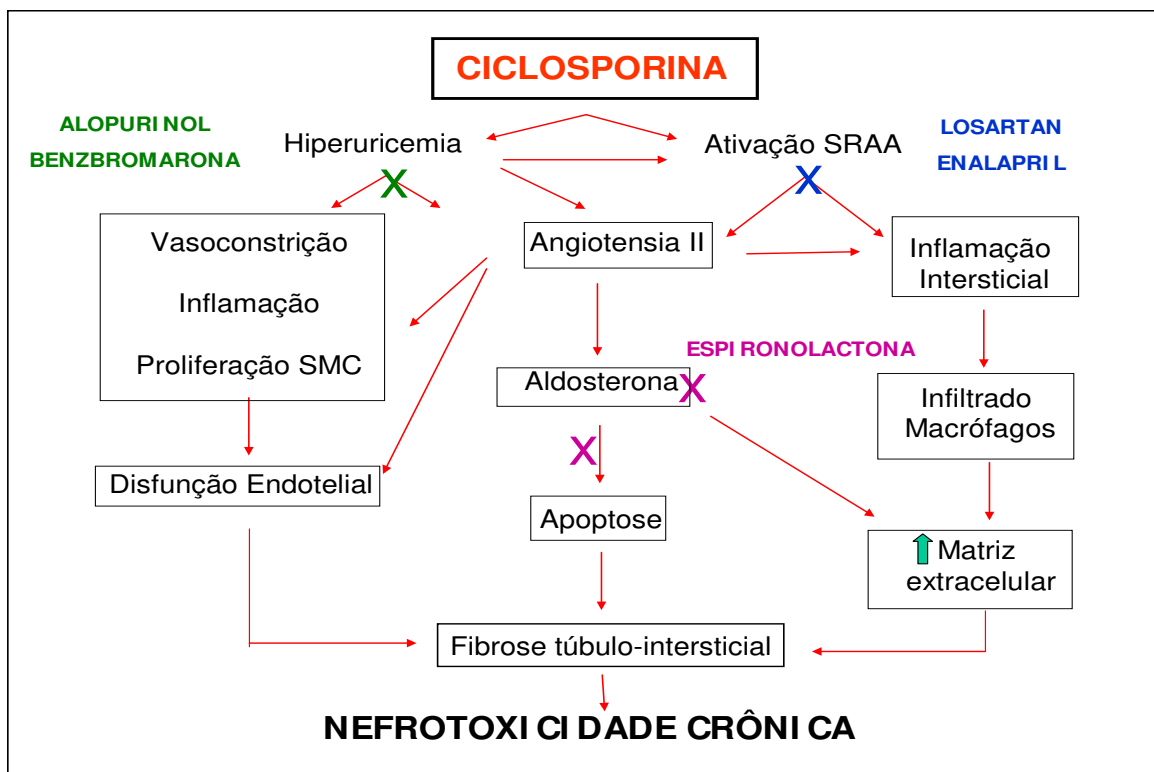
da eritropoetina está relacionado às suas propriedades anti-apoptótica e antiinflamatória [Yoon et al, 2009].

A estratégia mais utilizada para retardar a progressão da nefropatia crônica tem sido o bloqueio do SRAA, uma vez que o uso de inibidores de ECA e/ou bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II, modificando a hemodinâmica renal, reduzem a proteinúria e o ritmo de progressão da nefropatia crônica [Brenner BM, 2002]. Evidências experimentais recentes já demonstraram regressão da glomerulosclerose pela inibição do SRAA, embora as lesões do compartimento túbulo-intersticial tenham permanecido [Remuzzi et al, 1999; Admczak et al, 2003; Ma et al, 2000; Ling et al, 2003]. Estudos experimentais prévios utilizando diferentes bloqueadores do SRAA em tratamento concomitante com a utilização de ciclosporina mostraram que estas drogas limitam o desenvolvimento da nefropatia crônica, com menor intensidade de lesão vascular (hialinose arteriolar), menor acometimento glomerular e proteção parcial para a progressão de lesão intersticial, com fibrose em faixa e atrofia tubular. Entretanto, o efeito destas drogas parece apenas contrabalançar, parcialmente, o efeito da CsA, na ativação do SRAA, na inibição do NO e no estímulo para produção de pró renina.

Da mesma forma, estudos reduzindo os níveis sanguíneos de ácido úrico, com alopurinol ou benzbromarona, em tratamento concomitante com a ciclosporina, mostram o efeito na limitação do desenvolvimento da lesão funcional renal e histológica [Assis et al, 1997; Mazali et al, *in press*]. O mecanismo do ácido úrico na progressão da lesão depende tanto se seu efeito pró inflamatório, com ativação de proteína C reativa e MCP-1 [Sánchez-Lozada et al, 2005], como com a lesão endotelial mediada pelo desequilíbrio entre SRAA e NO e pela geração de radicais livres [Kang et al, 2002].

Entretanto, a maioria dos estudos experimentais visa prevenir o desenvolvimento da lesão, o que, do ponto de vista fisiopatológico é extremamente importante, porém a possibilidade de utilização na prática clínica é

limitada, uma vez que, na maioria dos casos, já existe lesão renal estabelecida no momento da indicação da intervenção. Assim, no presente estudo optamos por testar estas possibilidades terapêuticas no modelo de nefropatia pela ciclosporina, já instalada [Figura 3].



**Figura 3-** Representação esquemática dos possíveis alvos terapêuticos para regressão da nefropatia por CsA. Alopurinol e Benzbromarona normalizam os níveis de ácido úrico; losartan, enalapril e espironolactona modulam o sistema renina-angiotensina-aldosterona.





## **2- HIPÓTESE**



No modelo de nefrotoxicidade pela ciclosporina, a hiperuricemia, que ocorre tanto como consequência da redução da taxa de filtração glomerular bem como da alteração do transporte tubular de urato, é um fator agravante da lesão histológica e funcional, atuando através de ativação do SRAA e de inibição do NO. Estudos anteriores demonstraram que tanto o bloqueio do SRAA como a normalização dos níveis sanguíneos de ácido úrico limitam o desenvolvimento da nefropatia pela ciclosporina, porém pouco é conhecido sobre o efeito destas drogas sobre a lesão já estabelecida.

Assim, a hipótese do presente estudo é que o tratamento farmacológico com agentes hipouricemiantes (alopurinol e benzbromarona) ou com moduladores do SRAA (enalapril, losartan ou aldactone), em animais com nefropatia estabelecida, promoveria recuperação da lesão histológica, mesmo com a manutenção do estímulo lesivo da ciclosporina.

Também levantamos a hipótese de que, algumas destas drogas, atuando por mais de uma via, como o alopurinol (hipouricemiante e antioxidante) e o losartan (bloqueio de receptor de angiotensina II e uricosúrico), pudessem apresentar uma maior eficácia nesta resposta.







## **3- OBJETIVOS**



- Avaliar o efeito da normalização dos níveis séricos de ácido úrico sobre o quadro estabelecido de nefrotoxicidade pela ciclosporina, com especial atenção às alterações microvasculares e intersticiais.
- Avaliar o papel do bloqueio do sistema renina-angiotensina-aldosterona na nefropatia crônica pela ciclosporina, já estabelecida.
- Avaliar o efeito antioxidante dos hipouricemiantes e bloqueadores do SRRR, no modelo de nefropatia por Ciclosporina já estabelecida.





## **4- MATERIAL E MÉTODOS**



#### **4.1- Desenho do estudo**

Ratos adultos e machos, Sprague Dawley (Taconic, USA), fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB-UNICAMP), pesando de 200 a 250g, foram utilizados nos ensaios. Os animais foram mantidos em gaiolas, com um máximo de três animais/gaiola, com água e dieta à vontade. Variações na administração de medicamentos em água foram adequadas de acordo com os grupos experimentais.

No período de estudo os animais ficaram alojados nas dependências do Laboratório de Nefrologia II, no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE)-FCM/UNICAMP, com temperatura mantida em torno de 20°C e com ciclos de 12 horas claro/escuro.

O modelo experimental consiste na administração diária de CsA, a qual pode ser realizada por diversas vias - oral, subcutânea, intraperitoneal e intramuscular. A via subcutânea foi à via de escolha, por apresentar vantagens, em relação às demais, pela facilidade de aplicação e por haver maior estabilidade nos níveis plasmáticos da droga. Além disso, as doses utilizadas variam bastante entre os estudos, sendo mais recentemente utilizadas doses entre 10 e 15mg/Kg/dia de ciclosporina.

O protocolo experimental (nº1147-1) está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 29 de novembro de 2006.

A fase experimental baseou-se na intervenção terapêutica no modelo pré-estabelecido de nefrotoxicidade por CsA.

#### 4.1.1- Grupos experimentais

##### 4.1.1.1- Emprego de dieta hipossódica

Em modelos clássicos de nefropatia crônica pela CsA, a utilização de dieta restrita em sal apresenta efeito sinérgico com a droga, favorecendo o desenvolvimento de lesão funcional e histológica. A concentração de sódio mais utilizada é de 0,01% NaCl. Como dieta restrita em sal, foi utilizada a proteína texturizada de soja comercial (Jasmine®), sob forma de pequenos grânulos arredondados. A opção por esta dieta considerou sua composição, além da forma de apresentação, facilitando a administração aos animais de experimentação.

##### 4.1.1.2- Modelo experimental de nefrotoxicidade pela ciclosporina

Os grupos experimentais foram divididos em grupo cronicamente tratado com ciclosporina (CsA) ou grupo controle (VEH), tratado com veículo de ciclosporina (óleo de oliva), por períodos de cinco e nove semanas. Após um período de pré-condicionamento com dieta hipossódica, durante uma semana, os animais foram divididos em cinco grupos, pareados de acordo com o peso, pressão arterial, níveis de ácido úrico e creatinina sérica obtidos no período basal [Figura 4].

- 1- Grupo-controle (VEH5)**- animais tratados com dieta hipossódica, com injeções subcutâneas de óleo de oliva (veículo, modelo Ciclosporina), durante 5 semanas (n=6);
- 2- Grupo-controle (VEH9)**- animais tratados com dieta hipossódica, com injeções subcutâneas de óleo de oliva (veículo, modelo Ciclosporina), por 9 semanas (n=5);
- 3- Grupo-ciclosporina (CsA5)**- dieta hipossódica+injeções SC diárias, de ciclosporina 15mg/kg/dia, diluídas em óleo de oliva, por 5 semanas (n=6);



**4- Grupo-ciclosporina (CsA9)-** dieta hipossódica+injeções SC diárias, de ciclosporina 15mg/kg/dia, diluídos em óleo de oliva, durante 9 semanas (n=5);

**5- Grupo-ciclosporina retirada (CsAWT)-** dieta hipossódica+injeções SC diárias, de ciclosporina 15mg/kg/dia, diluídos em óleo de oliva, durante 5 semanas, seguida de suspensão de ciclosporina e manutenção de injeções diárias de veículo, SC por 4 semanas (n=4).

Exames laboratoriais foram coletados no pré-tratamento (período basal), através de punção da veia da cauda, sob anestesia. Ao final do período de estudo (cinco/nove semanas), por ocasião da eutanásia foram realizadas novas coletas de sangue e retirada dos rins para análise histológica.

#### 4.1.1.3- Modelo experimental de nefrotoxicidade por ciclosporina com intervenção terapêutica para diminuição dos níveis de ácido úrico

Foram utilizados dois grupos de tratamento para normalização dos níveis de ácido úrico em associação com a ciclosporina: um agente hipouricemiante (alopurinol) e um uricosúrico (benzbromarona).

Após o pré-tratamento por 5 semanas com ciclosporina, os animais foram pareados de acordo com o peso, pressão arterial, creatinina e nível de ácido úrico, em dois grupos, nos quais foram co-administrados os diferentes agentes hipouricemiantes [Figura 4].

**1- Grupo-ciclosporina+alopurinol (CsA+ALP)-** dieta hipossódica + ciclosporina 15mg/kg/dia SC por 5 semanas, seguido de um período de co-tratamento com alopurinol 15mg/Kg/dia VO durante 4 semanas (n=6);

**2- Grupo-ciclosporina+benzbromarona (CsA+BENZ)-** de um período de co-tratamento com benzbromarona 15mg/Kg/dia VO durante 4 semanas (n=6).

Exames laboratoriais foram coletados no pré-tratamento com alopurinol e benzbromarona (semana 5), através de punção da veia da cauda, sob anestesia. Por ocasião da eutanásia foram realizadas novas coletas de sangue e retirada dos rins para análise histológica.

#### 4.1.1.4- Modelo experimental de nefrotoxicidade por ciclosporina com intervenção terapêutica para modulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona

Foram utilizados três grupos de tratamento para modulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona em associação com a ciclosporina: um antagonista de receptor de angiotensina II (losartan), um inibidor da enzima conversora de angiotensina II (enalapril) e um inibidor competitivo da aldosterona (espironolactona).

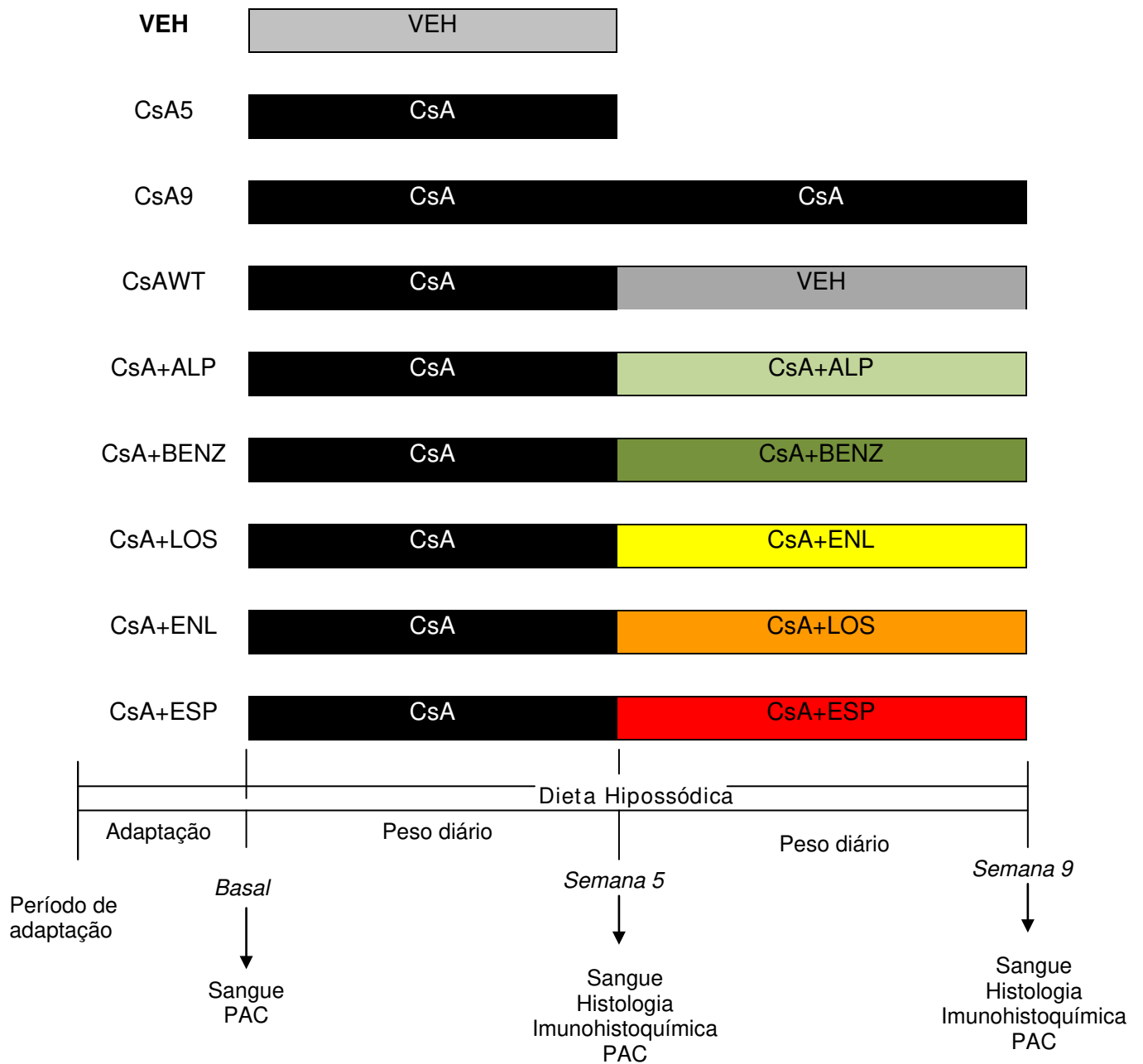
Após o pré-tratamento por cinco semanas com ciclosporina, os animais foram pareados de acordo com o peso, pressão arterial, creatinina e nível de ácido úrico, em três grupos, nos quais foram co-administrados diferentes agentes moduladores do sistema renina-angiotensina-aldosterona [Figura 4].

**1- Grupo-ciclosporina+enalapril (CsA+ENL)-** dieta hipossódica+ciclosporina 15mg/kg/dia SC por 5 semanas, seguidos de um período de co-tratamento com enalapril 10mg/Kg/dia VO durante 4 semanas (n=5);

**2- Grupo-ciclosporina+losartan (CsA+LOS)-** dieta hipossódica+ciclosporina 15mg/kg/dia SC por 5 semanas, seguidos de um período de co-tratamento com losartan 12,5mg/Kg/dia VO durante 4 semanas (n=5);

- 3- Grupo-ciclosporina+espirolactona (CsA+ESP)-** dieta hipossódica+ ciclosporina 15 mg/kg/dia SC por 5 semanas, seguido de um período de co-tratamento com espirolactona 20mg/Kg/dia VO durante 4 semanas (n=5).

Exames laboratoriais foram coletados no pré-tratamento com alopurinol e benzbromarona (semana 5), através de punção da veia da cauda, sob anestesia. Por ocasião da eutanásia foram realizadas novas coletas de sangue e retirada dos rins para análise histológica [Figura 4].



**Figura 4-** Representação esquemática do desenho estudo (VEH-veículo; CsA-ciclosporina; ALP-alopurinol; BENZ-benzbromarona; LOS-losartan; ENL-enalapril; ESP-espironolactona; PAC-pressão arterial de cauda).

## 4.2- Drogas experimentais

A medida da ingestão hídrica e o controle do peso dos animais foram realizados diariamente e a concentração da droga ajustada de acordo com o volume ingerido, corrigido pelo ganho ponderal. Abaixo estão às drogas empregadas, as doses e vias de administração.

<b>Droga</b>	<b>Dose</b>	<b>Via de Administração</b>
Ciclosporina (Neoral <sup>®</sup> 50mg)	15mg/Kg/dia	Subcutânea
Alopurinol (Zyloric <sup>®</sup> 100mg)	15mg/Kg/dia	Oral
Benzbromarona Narcaricina <sup>®</sup> 100mg)	15mg/Kg/dia	Oral
Losartan (Losartan 12,5mg)	12,5mg/Kg/dia	Oral
Enalapril (Enalapril 10mg)	10mg/Kg/dia	Oral
Espironolactona (Aldactone <sup>®</sup> 20mg)	20mg/Kg/dia	Oral

## 4.3- Anestesia

Os animais foram anestesiados com uma solução contendo Xilazina e Ketamina (Agribands, São Paulo, Brasil), nas concentrações de 10 e 90mg/Kg, respectivamente, por via intraperitoneal nas semanas 5 e 9 para coleta do material a ser estudado, sendo nesta última semana sacrificados por choque hemorrágico.

## 4.4- Coleta e processamento das amostras

### 4.4.1- Amostras de sangue

Amostras de sangue foram coletadas após há primeira semana com dieta hipossódica (período de estabilização) e na semana 5, através de punção de veia de cauda, sob anestesia. Ao final do período de estudo, os animais foram submetidos à anestesia intraperitoneal com uma combinação de xilazina e ketamina e, após a incisão xifo-púbica, o sangue foi coletado através de punção cardíaca.

Após a formação de coágulo, as amostras de sangue foram centrifugadas a 8.000rpm, durante 25 minutos, e o soro separado, dividido em alíquotas e armazenado em freezer -20°C até a análise.

Dosagens de níveis sanguíneos de ciclosporina foram realizadas nas semanas 5 e 9. As amostras de sangue total e soro foram armazenados em freezer -20°C até a análise.

#### 4.4.2- Amostras de tecido renal

Ao final dos períodos de estudo (cinco ou nove semanas), os animais foram submetidos à anestesia intraperitoneal com xilazina e Ketamina. Após a coleta de sangue foi realizada a nefrectomia bilateral.

Os dois rins foram retirados isoladamente, e colocados em solução salina (NaCl 0,9% Aster<sup>®</sup>) a 4°C. A cápsula renal foi retirada e os rins foram seccionados longitudinalmente e fixados em solução de MethylCarnoy (rimD) ou formalina tamponada 10% (1/2 rim E). Após um período de fixação de 12 horas, as amostras foram transferidas para solução de metanol 70% (tecido fixado em MethylCarnoy) ou etanol 70% (tecido fixado em formalina) e encaminhados para inclusão em bloco de parafina, para posterior análise histológica. A outra metade do rim esquerdo foi seccionada em pequenos fragmentos, fixados em nitrogênio líquido e estocados em frascos criossensíveis a -70°C, para posterior extração de proteína e/ou RNA do material.

### 4.5- Parâmetros estudados

#### 4.5.1- Peso

O peso, em gramas, foi verificado semanalmente, em balança manual Filizola<sup>®</sup>, para controle de crescimento dos animais. Esta medida também serviu para o ajuste da dose de ciclosporina, óleo de oliva (veículo) e da medicação oral nos grupos tratados.

#### 4.5.2- Ingestão hídrica

A medida da ingestão hídrica dos animais, em mL/dia, foi feita nos grupos em que houve co-administração de hipouricemiantes ou modeladores do SRAA, a fim de ajustar a dose das medicações administradas na água do bebedouro aos roedores.

#### 4.5.3- Dosagens bioquímicas

Todas as dosagens foram realizadas em duplicata. Para todos os experimentos foi realizada dosagem de creatinina, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e ácido úrico em soro.

##### 4.5.3.1- Avaliação de função renal-dosagem de creatinina

A creatinina sérica foi determinada por método colorimétrico, utilizando kit comercial (CELM<sup>®</sup>) de acordo com instruções do fabricante. As amostras e os pontos para determinação da curva padrão de creatinina (curva linear até 16mg/dL) foram lidos em leitor de placa (ELx800 Universal Microplate Reader/Bio-Tek Instruments, Inc.) com  $\lambda_{\text{máx}}$  de 490nm à temperatura constante e abaixo de 30°C (reação estável).

##### 4.5.3.2- Avaliação de hiperuricemia- dosagem de ácido úrico

O ácido úrico sérico foi determinado por método enzimático/colorimétrico (Uricase/POD), com Kit comercial da (CELM<sup>®</sup>), de acordo com instruções do fabricante. A absorbância das amostras e dos pontos da curva-padrão de ácido úrico (linearidade até 15mg/dL) foram lidos em leitor de placa (ELx800 Universal Microplate Reader/Bio-Tek Instruments, Inc.) com  $\lambda_{\text{máx}}$  de 490nm.

#### 4.5.3.3- Avaliação de dieta hipossódica

Para avaliação da eficácia da proteína texturizada comercial Jasmine<sup>®</sup>, foram dosados sódio e potássio no soro (diluído 1:50 em água deionizada) dos animais no período basal (após estabilização da dieta hipossódica), através de fotômetro de chama (Fotômetro de chama-padrão Celm/HC-Unicamp), sendo utilizados como padrões normais  $[Na^+]$  140 mEq/L e  $[K^+]$  5 mEq/L.

#### 4.5.3.4- Dosagem de ciclosporina por imunoenensaio

Foi coletado sangue para dosagem de nível de ciclosporina (C0-coleta 12 horas após a administração da última dose de CsA) ao final das 5 e 9 semanas de tratamento dos animais. O sangue foi coletado, através de punção da cauda, sob anestesia, em tubo com EDTA (MiniCollect<sup>®</sup> 1mL K3EDTA Greiner Bio-one<sup>®</sup>) e armazenado em freezer à -20°C até a análise. O nível de ciclosporina foi dosado em sangue total pelo método de FPIA (Imunoenensaio por Fluorescência Polarizada) em AxSYM (analisador de imunoenensaio), no Laboratório de Líquidos Biológicos-Hospital das Clínicas/UNICAMP.

### **4.6- Avaliação da pressão arterial caudal-método oscilométrico**

A pressão arterial foi medida pelo método oscilométrico e os valores obtidos correspondem à pressão arterial sistólica. Para tal medida, os animais foram acondicionados em gaiolas aquecidas com lâmpada incandescente por 10 minutos antes do início das medições. A pressão caudal foi medida por meio de equipamento acoplado a um transdutor de pressão (HARVARD Apparatus Rat Tail B.P. Monitor/HARVARD Student Oscillograph). Para maximizar o desempenho e a precisão do equipamento utilizou-se manguito de tamanho apropriado, aplicação correta à cauda do animal e imobilização do rato em aparato apropriado.



A pressão foi medida no período basal e nas semanas cinco e nove de experimentação. As medidas foram realizadas com os roedores acordados e foram consideradas aquelas obtidas em condições de ausência de movimentação animal, sendo considerada para análise o valor médio de 3 aferições.

#### **4.7- Análise histológica**

O tecido renal foi fixado em MethylCarnoy ou formalina 10% (rim esquerdo) e processado em blocos de parafina, cortes histológicos de 4 $\mu$ m de espessura (Micrótomo Leica® modelo RM2155) foram fixados em lâminas silanizadas (3-aminopropyltriethoxy-silane, Sigma Aldrich, USA) e submetidos a diferentes técnicas de coloração (PAS, Tricrômio de Masson, Direct Red), para análise morfológica e detecção de marcadores específicos (imunohistoquímica).

O material para análise imunohistoquímica foi previamente desparafinado em xilol, reidratado numa série decrescente de álcoois e a peroxidase endógena foi inativada com peróxido de hidrogênio 3% em metanol (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%). As especificações das diferentes técnicas utilizadas estão descritas detalhadamente para cada coloração utilizada, juntamente com a forma de quantificação morfométrica utilizada.

Para todas as técnicas de imunohistoquímica analisadas, foram realizados controles negativos, com omissão do anticorpo primário, e controles positivos, utilizando material de biopsia de experimentos anteriores, com resultado conhecido.

#### 4.7.1- Avaliação morfológica

##### 4.7.1.2- PAS (ácido periódico/reagente de Schiff)

Fragmentos de tecido renal fixados em solução de MethylCarnoy foram tratados com ácido periódico 0,5% (Merck®), seguido de reagente de Schiff (Sigma/Diagnostics®) e contra corados com hematoxilina de Harris. Toda a extensão cortical do fragmento renal foi avaliada à microscopia óptica, sob aumento de 400X, de forma semiquantitativa, utilizando a seguinte pontuação:

**0:** túbulos normais;

**1:** acometimento tubular < 25%;

**2:** 25 - 50% de lesão tubular;

**3:** 50 - 75% de lesão tubular;

**4:** >75% de lesão tubular.

Para esta análise foram quantificados separadamente o infiltrado intersticial, a atrofia tubular e a dilatação tubular. Para análise estatística foi considerada a somatória dos escores de lesão túbulo-intersticial de cada fragmento de tecido renal avaliado. A ocorrência de glomerulosclerose foi quantificada em % de glomérulos com áreas de esclerose, do total de glomérulos do corte histológico.

##### 4.7.1.3- Avaliação de fibrose intersticial

###### 4.7.1.3.1- Tricômio de Masson

Na coloração de Tricômio de Masson (Kit Erviegas®), realizada em fragmentos de tecido renal fixados em MethylCarnoy, foi quantificada a porcentagem em área de deposição de matriz extracelular em tecido renal,

utilizando a técnica computadorizada de subtração de imagem sob “background” pré-definido, utilizando o programa KS300, versão 3.0 (Zeiss). Foram avaliados todos os campos corticais, sob microscopia óptica, em aumento de 400x. Os valores obtidos foram expressos em % de área positiva/total de área analisada.

#### 4.7.1.3.2- Picrossírius (direct red)

Fragmentos de tecido renal fixados em Methycarnoy foram incubados com solução Direct Red 0,1% (Direct Red F 3BA - C.I. 35782), e contra-coradas com Hematoxilina de Harris. As fibras colágenas são sobrepostas pelo corante, com coloração vermelha característica à microscopia de luz comum ou coloração dourada quando avaliada sob luz polarizada.

A quantificação da fibrose foi realizada através da técnica de subtração de imagem sob “background” pré-definido, utilizando o programa computadorizado KS300, versão 3.0 (Zeiss). Foram avaliados todos os campos corticais, sob microscopia óptica, em aumento de 400x. Os valores obtidos foram expressos em % de área positiva/total de área analisada.

#### 4.7.1.4- Avaliação de inflamação

Para a avaliação de inflamação foi utilizada a técnica de imunohistoquímica para macrófagos e osteopontina.

##### 4.7.1.4.1- Imunohistoquímica para macrófagos

Fragmentos de tecido renal fixados em Methycarnoy foram incubados com anticorpo primário anti-macrófagos/monócitos (ED-1 mouse anti-rat CD68-MCA341A/Serotec Immunological Excellence®, 1:100), *overnight* a 4°C,

seguido de anticorpo secundário biotilado (Universal Super ABC KIT/Erviagas®, 1:200), por 30 minutos, a 25°C. Como sistema de revelação foi utilizado diaminobenzidina (Liquid DAB Substrat, Chromogen Statem Code K3466- DAKO CYTOMATION®) e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris.

Para a quantificação de macrófagos foi realizada a contagem do número real de células positiva por campo microscópico, em aumento de 400x, utilizando grid 10x10, em toda a extensão cortical. Os resultados foram expressos em número de células positivas/mm<sup>2</sup>.

#### 4.7.1.4.2- Imunohistoquímica para osteopontina

Em fragmentos renais fixados em MethylCarnoy foi utilizado o anticorpo primário mouse monoclonal anti-osteopontina (OPN-AKM2A1 Santa Cruz® 1:400), incubado *overnight* a 4°C, seguido de anticorpo secundário biotilado anti-mouse (Vector®, Burlingame, CA, 1:100), por 1 hora, à temperatura ambiente, seguido de incubação com o complexo reagente avidina-biotina (ABC) por 30 minutos. Como sistema de revelação foi utilizado diaminobenzidina (Liquid DAB Substrat, Chromogen Statem Code K3466-DAKO CYTOMATION®) e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris.

A quantificação da osteopontina foi realizada através da técnica de subtração de imagem sob “*background*” pré-definido, utilizando o programa computadorizado KS300, versão 3.0 (Zeiss). Foram avaliados todos os campos corticais, sob microscopia óptica, em aumento de 400x. Os valores obtidos foram expressos em % de área positiva/total de área analisada.

#### 4.7.1.5- Avaliação de lesão vascular

A avaliação da lesão de vasculatura foi quantificada em porcentagem de hialinose arteriolar.

#### 4.7.1.5.1- Hialinose arteriolar

Em cortes histológicos previamente fixados em Methycarnoy e corados através de PAS, foram analisadas as arteríolas aferentes glomerulares em toda a extensão do campo cortical, em microscopia óptica sob aumento de 400x. Arteríolas com hialinose evidente, caracterizada por espessamento de parede e coloração eosinofílica foram consideradas como positivas. Os resultados foram expressos em % de arteríolas com hialinose/total de arteríolas do fragmento analisado.

#### 4.7.1.6- Avaliação de estresse oxidativo

A avaliação de estresse oxidativo foi feita através da identificação da base modificada 8-OHdG em núcleos de células túbulo-intersticiais e através da quantificação de malonaldeído em homogenato de córtex renal (TBARS).

##### 4.7.1.6.1- Imunohistoquímica para 8-OHdG

Fragmentos de tecido renal fixados em Methycarnoy foram incubados com anticorpo primário mouse monoclonal anti-8-OHdG (JAICA<sup>®</sup>, 1:100), *overnight* a 4°C, seguido de anticorpo secundário biotilado (Vector<sup>®</sup>, Burlingame, CA, 1:200), por 30 minutos, a temperatura ambiente e, incubação com o complexo reagente avidina-biotina (ABC) por 30 minutos. Como sistema de revelação foi utilizado diaminobenzidina (Liquid DAB Substrat, Chromogen Statem Code K3466-DAKO CYTOMATION<sup>®</sup>) e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris ou com coloração de PAS (sem hematoxilina de Harris).

Para a quantificação da base modificada 8-OHdG foi realizada a contagem do número real de células com núcleo positiva por campo microscópico, em aumento de 400x, utilizando grid 10x10, em toda a extensão cortical. Os resultados foram expressos em número de células positivas/mm<sup>2</sup>.

#### 4.7.1.6.2- Avaliação da peroxidação lipídica em biópsia de córtex renal através da concentração de malonaldeído (Método de TBARS)

O malonaldeído (MDA), um aldeído de cadeia curta, produto indireto da peroxidação lipídica, é um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). A formação de malonaldeído ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos. A concentração de malonaldeído é expressa em pmol/ $\mu$ L de proteína.

Fragmentos de tecido renal foram homogeneizados em PBS pH 7.4 e BHT 3% (diluído em etanol) para remoção de interferente do ensaio, como a hemoglobina (BHT antioxidante que previne a peroxidação lipídica durante o experimento). Posteriormente foi adicionado ao homogenato TBA 1% (ácido tiobarbitúrico 1%) em PBS pH 7.4 e incubado por 2 horas em banho-maria a 60°C. Após este período foi centrifugado por 10 minutos a 2000rpm, a 20°C. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 532nm. Foi feita uma curva de calibração com concentrações conhecidas de malonaldeído para obtenção da equação da reta e, posterior determinação da [MDA] pmol/ $\mu$ L nas amostras.

Uma alíquota do sobrenadante foi reservada para a dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford. Foram feitas amostras de concentrações conhecidas de proteína (padrão de proteína- BIO RAD n°500-0007 Protein STDII, Albumin, 1BTL: 1,34 $\mu$ g/ $\mu$ L) e, estas lidas em espectrofotômetro a 595nm para obtenção da curva padrão.

A concentração de malonaldeído foi determinada em pmol/ $\mu$ L de proteína.

#### 4.7.1.7- Avaliação de apoptose

Para a avaliação de apoptose foi utilizada a técnica de imunohistoquímica para caspase-3 e reação de TUNEL.

##### 4.7.1.7.1- Imunohistoquímica para caspase-3

A caspase pertence à família da cisteína protease e, estão divididas em caspases inflamatórias e pró-apoptóticas. Na apoptose, particularmente, a caspase-3 está ativada em núcleo de células tubulares e intersticiais renais.

Fragmentos de tecido renal fixados em Methylcarnoy foram incubados com anticorpo primário anti-caspase-3 (rabbit anti rat 9661S Cell Signaling<sup>®</sup>, 1:200), *overnight* a 4°C, seguido de anticorpo secundário biotilado (goat anti rabbit SC 2040<sup>®</sup>, Santa Cruz, 1:200), por 30 minutos, a 25°C. Posteriormente as lâminas foram incubadas com o complexo reagente avidina-biotina (ABC) por 30 minutos. Como sistema de revelação foi utilizado diaminobenzidina (Liquid DAB Substrat, Chromogen Statem Code K3466-DAKO CYTOMATION<sup>®</sup>) e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris.

Para a quantificação da caspase-3 foi realizada a contagem do número real de células positiva por campo microscópico, em aumento de 400x, utilizando grid 10x10, em toda a extensão cortical. Os resultados foram expressos em número de células positivas/mm<sup>2</sup>.

##### 4.7.1.7.2- Reação de TUNEL para apoptose

Fragmentos de tecido renal fixados em Methylcarnoy foram incubados a 37°C "*overnight*", posteriormente desparafinizados em xilol e hidratados em uma série crescente de alcoóis. As lâminas forma tratadas com peróxido de hidrogênio 3% em água destilada e, submetidas à reativação antigênica em tampão citrato pH

6.0 em microondas na potência 70% por 3 séries de 3 minutos. As mesmas foram incubadas com proteinase K, por 15 minutos e, com TdT + Bio-dATP por 1 hora em temperatura ambiente. Esta reação foi interrompida ao lavar as lâminas em PBS pH 7,4. Posteriormente as lâminas foram incubadas com o complexo reagente avidina-biotina (ABC) por 30 minutos. Como sistema de revelação foi utilizado diaminobenzidina (Liquid DAB Substrat, Chromogen Statem Code K3466-DAKO CYTOMATION®) e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris.

Para a quantificação da reação de TUNEL foi realizada a contagem do número real de células com núcleo positiva por campo microscópico, em aumento de 400x, utilizando grid 10x10, em toda a extensão cortical. Os resultados foram expressos em número de células positivas/mm<sup>2</sup>.

#### **4.8- Análise estatística**

Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  erro padrão. A média dos valores dos grupos foi comparada através de análise de variância (ANOVA). Significância estatística foi considerada se  $p < 0,05$ .

Como não houve diferenças nos parâmetros dos grupos VEH5 e VEH9, para análise, os grupos serão referidos apenas como VEH.





## **5- RESULTADOS**



## 5.1- Modelo experimental de nefrotoxicidade por ciclosporina com intervenção terapêutica para diminuição dos níveis de ácido úrico

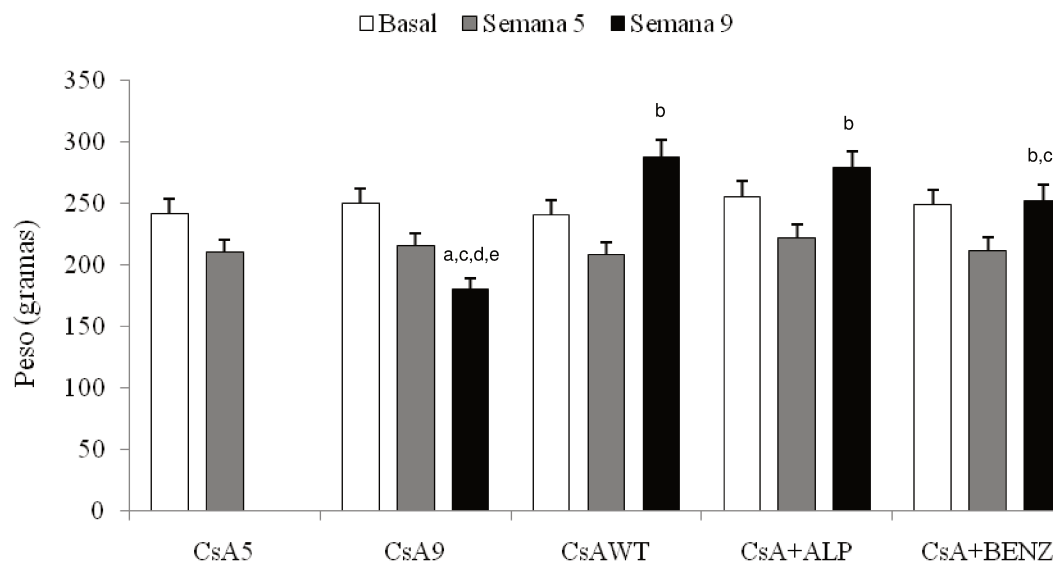
### 5.1.1- Variação de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais

A variação de peso dos animais ao longo do período experimental está apresentada na tabela 1. Não houve diferença entre os pesos dos animais no período basal (pré-tratamento com as drogas em investigação). Os animais tratados com CsA apresentaram uma significativa perda de peso comparada com o grupo controle, ao final de 5 semanas ( $271,0 \pm 24,4$  vs  $210,7 \pm 25,7$ , VEH vs CsA5,  $p < 0,05$ ). A manutenção do tratamento com CsA foi associada à perda ponderal progressiva ao final de 9 semanas. Entretanto, a suspensão da CsA recuperou o peso dos animais do grupo CsAWT, atingindo crescimento semelhante aos controles ( $270,0 \pm 19,8$  vs  $287,9 \pm 20,5$ , VEH vs CsAWT,  $p = ns$ ). Fenômeno semelhante foi observado nos animais tratados com alopurinol ou benzbromarona, havendo recuperação de peso mesmo em presença de ciclosporina. O efeito mais acentuado foi observado no grupo tratado com alopurinol [Tabela 1, Gráfico 1].

**Tabela 1-** Medida dos pesos (g) dos animais, nos diferentes grupos experimentais, durante as 9 semanas de estudo com co-administração de medicamentos hipouricemiantes.

Peso (g)				
Grupo	N	Basal	Semana 5	Semana 9
CsA5	06	$241,7 \pm 19,0$	$210,7 \pm 25,7$	-----
CsA9	05	$249,5 \pm 18,3$	$215,3 \pm 18,2$	$180,2 \pm 10,5^{a,c,d,e}$
CsAWT	04	$240,5 \pm 18,4$	$208,2 \pm 17,4$	$287,9 \pm 20,4^b$
CsA+ALP	06	$255,7 \pm 7,4$	$222,3 \pm 22,8$	$278,9 \pm 20,5^b$
CsA+BENZ	06	$249,01 \pm 16,35$	$211,83 \pm 15,94$	$252,60 \pm 10,10^{b,c}$

**a**  $p < 0,05$  vs CsA5, **b**  $p < 0,05$  vs CsA9, **c**  $p < 0,05$  vs CsAWT, **d**  $p < 0,05$  vs CsA+ALP, **e**  $p < 0,05$  vs CsA+BENZ



a  $p < 0,05$  vs CsA5, b  $p < 0,05$  vs CsA9, c  $p < 0,05$  vs CsAWT, d  $p < 0,05$  vs CsA+ALP, e  $p < 0,05$  vs CsA+BENZ

**Gráfico 1-** Variação do peso (g) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.

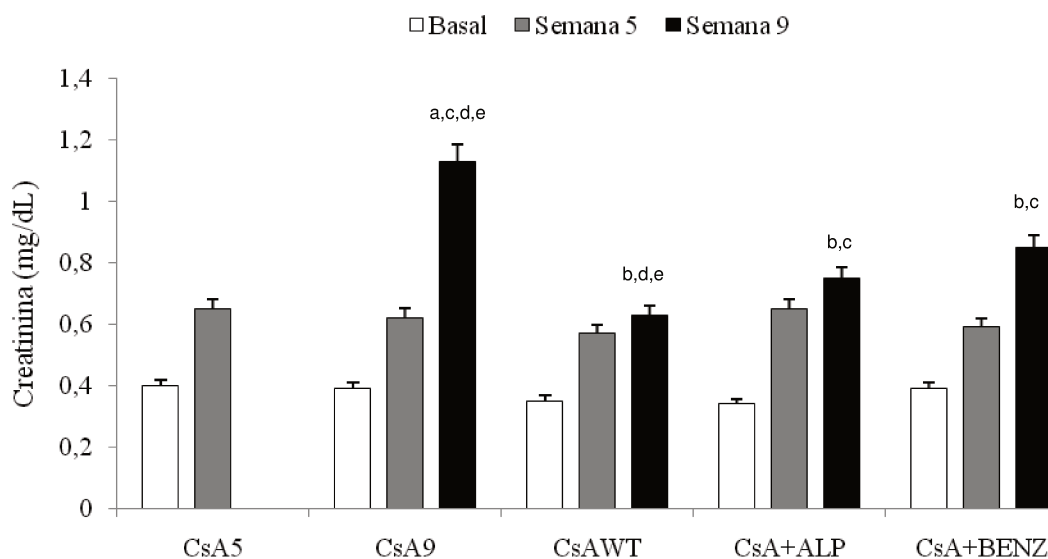
### 5.1.2- Avaliação da função renal

O tratamento com ciclosporina por 5 semanas cursou com elevação significativa dos níveis séricos de creatinina. A administração de CsA por 9 semanas foi associado com piora da função renal ( $1,13 \pm 0,17$  vs  $0,65 \pm 0,07$  mg/dL, CsA9 vs CsA5,  $p < 0,05$ ), indicando progressão da lesão. No grupo onde a CsA foi interrompida na 5ª semana, e os animais mantidos com veículo por mais quatro semanas, observamos estabilização da função renal ( $0,63 \pm 0,08$  vs  $0,65 \pm 0,07$  mg/dL, CsAWT vs CsA5,  $p = ns$ ). Nos grupos tratados com benzbromarona ou alopurinol, em presença da CsA, houve proteção parcial da função renal, com creatinina sérica atingindo valores intermediários aos observados nos grupos CsA9, CsA5 e CsAWT ( $p < 0,05$ ), sugerindo que o tratamento impediu parcialmente a progressão da doença renal [Tabela 2, Gráfico 2].

**Tabela 2-** Função renal, avaliada pela creatinina sérica (mg/dL) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.

Creatinina (mg/dL)				
Grupo	N	Basal	Semana 5	Semana 9
<b>CsA5</b>	06	0,40±0,12	0,65±0,07	-----
<b>CsA9</b>	05	0,39±0,17	0,62±0,08	1,13±0,17 <sup>a,c,d,e</sup>
<b>CsAWT</b>	04	0,35±0,20	0,57±0,11	0,63±0,08 <sup>b,d,e</sup>
<b>CsA+ALP</b>	06	0,34±0,15	0,65±0,05	0,75±0,17 <sup>b,c</sup>
<b>CsA+BENZ</b>	06	0,39±0,10	0,59±0,08	0,85±0,14 <sup>b,c</sup>

a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ALP, e p<0,05 vs CsA+BENZ



a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ALP, e p<0,05 vs CsA+BENZ

**Gráfico 2-** Variação da creatinina sérica (mg/dL) dos animais, tratados ou não com CsA, com e sem intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.

### 5.1.3- Níveis de ácido úrico nos grupos avaliados

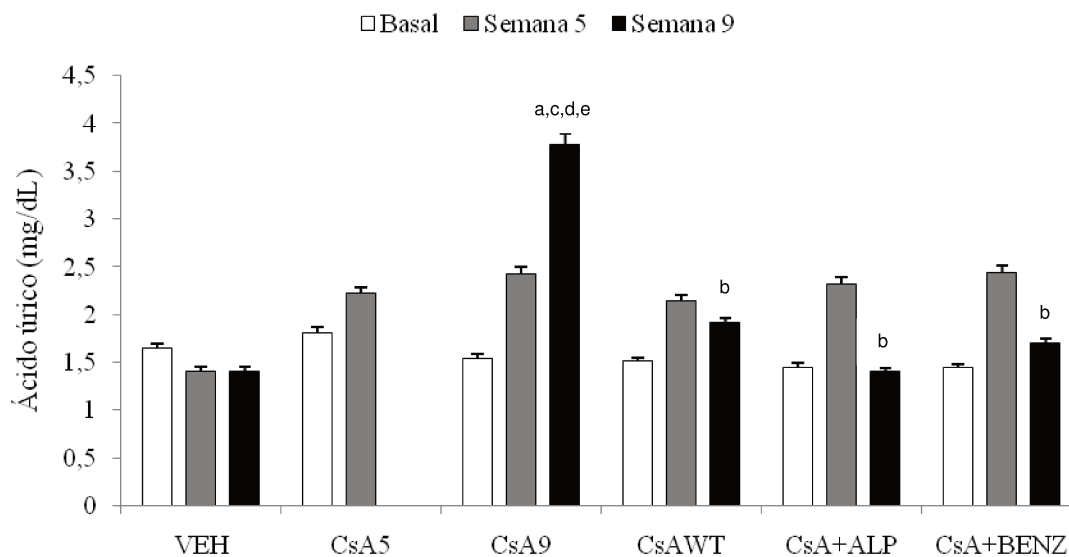
Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de ácido úrico entre os grupos analisados, no período basal. Os animais tratados com ciclosporina cursaram com aumento dos níveis de ácido úrico ( $2,2\pm 0,24$  vs  $1,4\pm 0,2$ mg/dL, CsA9 vs VEH,  $p<0,05$ ). O tratamento prolongado com CsA levou a um aumento significativo do ácido úrico ( $3,8\pm 1,45$  vs  $2,2\pm 0,24$ mg/dL, CsA9 vs CsA5,  $p<0,05$ ). No grupo onde a CsA foi suspensa na quinta semana de tratamento (CsAWT) houve estabilização nos níveis de ácido úrico (CsAWT vs CsA5,  $p=ns$ ), em valores inferiores ao grupo com tratamento persistente ( $1,9\pm 0,14$  vs  $3,8\pm 1,45$ mg/dL, CsAWT vs CsA9,  $p<0,05$ ).

A co-administração de alopurinol ou benzbromarona, após o período inicial de tratamento com CsA, promoveu redução dos níveis séricos de ácido úrico, quando comparados com o grupo CsA9 ( $1,4\pm 0,5$  e  $1,6\pm 0,20$  vs  $3,8\pm 1,45$ mg/dL, CsA+ALP e CsA+BENZ vs CsA9,  $p<0,05$ ). A redução dos níveis de ácido úrico foi comparável com as duas drogas (aluporinol e benzbromarona) e, semelhante aos valores encontrados no grupo controle (CsA+ALP e CsA+BENZ vs VEH,  $p=ns$ ). [Tabela 3, Gráfico 3]

**Tabela 3-** Medida dos níveis de ácido úrico (mg/dL) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.

Ácido úrico (mg/dL)				
Grupo	N	Basal	Semana 5	Semana 9
CsA5	06	$1,8\pm 0,3$	$2,2\pm 0,24$	-----
CsA9	05	$1,5\pm 0,4$	$2,4\pm 0,3$	$3,8\pm 1,45^{a,c,d,e}$
CsAWT	04	$1,5\pm 0,2$	$2,1\pm 0,2$	$1,9\pm 0,14^b$
CsA+ALP	06	$1,45\pm 0,25$	$2,3\pm 0,2$	$1,4\pm 0,2^b$
CsA+BENZ	06	$1,4\pm 0,2$	$2,4\pm 0,2$	$1,7\pm 0,2^b$

**a**  $p<0,05$  vs CsA5, **b**  $p<0,05$  vs CsA9, **c**  $p<0,05$  vs CsAWT, **d**  $p<0,05$  vs CsA+ALP, **e**  $p<0,05$  vs CsA+BENZ



**a**  $p < 0,05$  vs CsA5, **b**  $p < 0,05$  vs CsA9, **c**  $p < 0,05$  vs CsAWT, **d**  $p < 0,05$  vs CsA+ALP, **e**  $p < 0,05$  vs CsA+BENZ

**Gráfico 3-** Variação dos níveis séricos de ácido úrico (mg/dL) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.

#### 5.1.4- Avaliação dos níveis de ciclosporina

A dosagem dos níveis sanguíneos de CsA, por imunoenensaio (FPIA) foi comparável entre os grupos, não sofrendo interferência com a co-administração de alopurinol ou de benzbromarona ( $p=ns$ ) [Tabela 4].

**Tabela 4-** Níveis sanguíneos de CsA (C0), em ng/mL, nas semanas 5 e 9 de tratamento.

Grupo	C0 (ng/mL)	
	Semana 5	Semana 9
<b>CsA5</b>	1510,0±398,9	----
<b>CsA9</b>	1517,0±400,1	1543,3±410,1
<b>CsAWT</b>	1532,0±389,5	Não detectável
<b>CsA+ALP</b>	1373,7±346,9	1256,7±410,9
<b>CsA+BENZ</b>	1392,2±377,5	1315,8±394,2

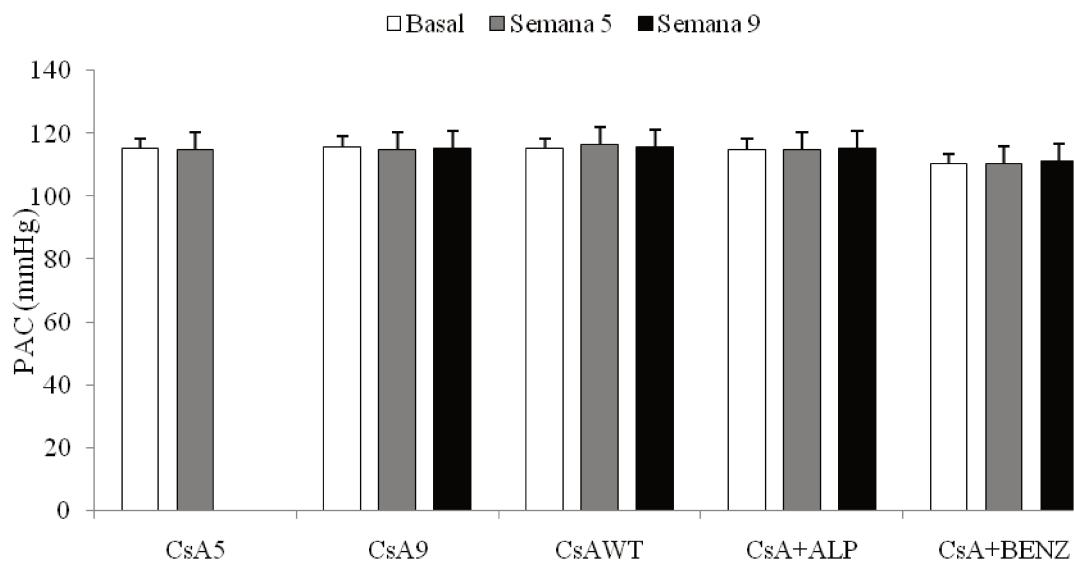
#### 5.1.5- Avaliação da Pressão Arterial

Os animais experimentais mantiveram pressão arterial caudal constante durante todo o período de estudo, sem diferença significativa entre os grupos. [Tabela 5, Gráfico 4].

**Tabela 5-** Variação da pressão arterial de cauda (PAC mmHg) dos animais tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes hipoureçimiantes.

Grupo	PAC (mmHg)		
	Basal	Semana 5	Semana 9
<b>CsA5</b>	115,0±10,1	114,6±9,9	----
<b>CsA9</b>	115,7±8,2	114,8±8,2	115,2±7,9
<b>CsAWT</b>	115,0±12,0	116,3±11,8	115,4±11,0
<b>CsA+ALP</b>	114,9±9,1	114,8±9,0	115,0±8,9
<b>CsA+BENZ</b>	110,2±10,4	110,4±10,2	111,2±11,1





**Gráfico 4-** Variação da pressão arterial de cauda (PAC mmHg) dos animais tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes hipoureçimiantes.

#### 5.1.6- Análise histológica

Os animais tratados com ciclosporina apresentaram, na análise das colorações convencionais (PAS, Tricrômio de Masson e Sirius Red), áreas de fibrose em faixa, hialinose arteriolar e arterioesclerose. Nos animais em que foram co-administrados agentes hipoureçimiantes, estas alterações também estiveram presentes, porém de maneira menos exuberante.

##### 5.1.6.1- Avaliação morfométrica

###### 5.1.6.1.1- Lesão túbulo intersticial

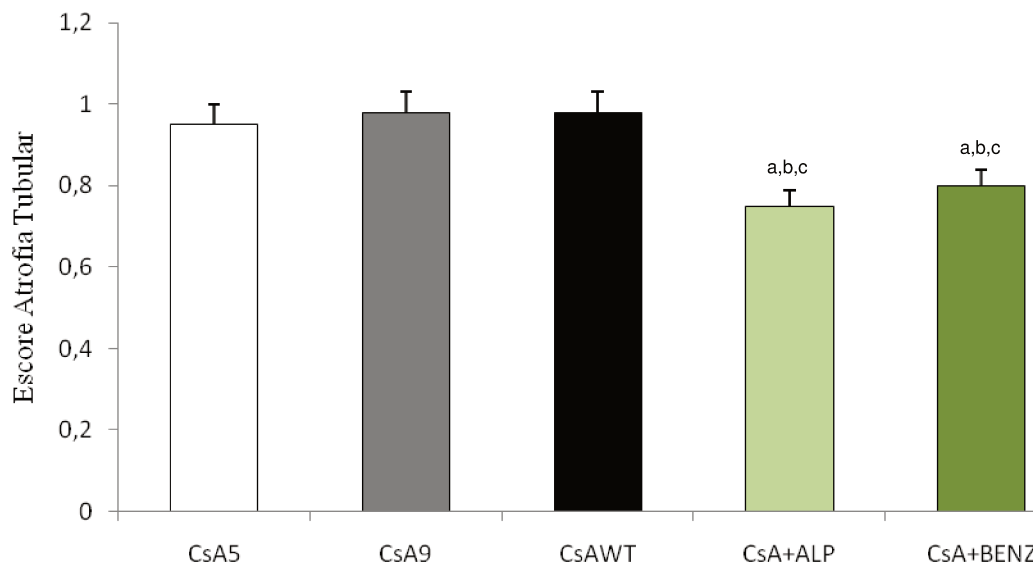
A análise morfométrica [escore semi-quantitativo de PAS], mostrou que a lesão túbulo intersticial foi grave em todos os grupos tratados com CsA, quando comparado com os grupos controles [somatória dos *scores* de dilatação

tubular, atrofia tubular e infiltrado intersticial] ( $1,9\pm0,4$  vs  $0,02\pm0,02$ , CsA5 vs VEH). Entretanto, o tratamento prolongado com CsA não alterou de forma significativa a atrofia tubular ( $2,1\pm0,4$  vs  $1,9\pm0,4$ , CsA9 vs CsA5,  $p=ns$ ). A interrupção de CsA no grupo CsAWT não alterou de forma significativa a lesão cortical ( $2,0\pm0,6$  vs  $2,1\pm0,4$ , CsAWT vs CsA9,  $p=ns$ ). Os grupos tratados com alopurinol ou benzbromarona apresentaram um quadro de atrofia tubular menos intensa, quando comparado com o grupo tratado apenas com CsA (CsA+ALP e CsA+BENZ,  $p<0,05$  vs CsA9) [Tabela 6, Gráfico 5].

**Tabela 6-** Acometimento túbulo intersticial nos diferentes grupos tratados.

<b>Lesão Túbulo Intersticial</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Dilatação Tubular</b>	<b>Atrofia Tubular</b>	<b>Infiltrado Intersticial</b>	<b>Somatória Scores</b>
<b>CsA5</b>	$0,69\pm0,12$	$0,95\pm0,12$	$0,35\pm0,12$	$1,99\pm0,36$
<b>CsA9</b>	$0,76\pm0,11$	$0,98\pm0,12$	$0,39\pm0,14$	$2,13\pm0,37$
<b>CsAWT</b>	$0,62\pm0,16$	$0,98\pm0,22$	$0,42\pm0,20$	$2,02\pm0,58$
<b>CsA+ALP</b>	$0,68\pm0,08$	$0,75\pm0,05^{a,b,c}$	$0,26\pm0,16$	$1,69\pm0,29^b$
<b>CsA+BENZ</b>	$0,74\pm0,05$	$0,79\pm0,04^{a,b,c}$	$0,32\pm0,21$	$1,85\pm0,30^b$

**a**  $p<0,05$  vs CsA5, **b**  $p<0,05$  vs CsA9, **c**  $p<0,05$  vs CsAWT, **d**  $p<0,05$  vs CsA+ALP, **e**  $p<0,05$  vs CsA+BENZ



**a**  $p < 0,05$  vs CsA5, **b**  $p < 0,05$  vs CsA9, **c**  $p < 0,05$  vs CsAWT, **d**  $p < 0,05$  vs CsA+ALP, **e**  $p < 0,05$  vs CsA+BENZ

**Gráfico 5-** Variação da lesão túbulo intersticial (atrofia tubular) nos grupos tratados sem e com intervenção terapêutica com agentes hipouricemiantes.

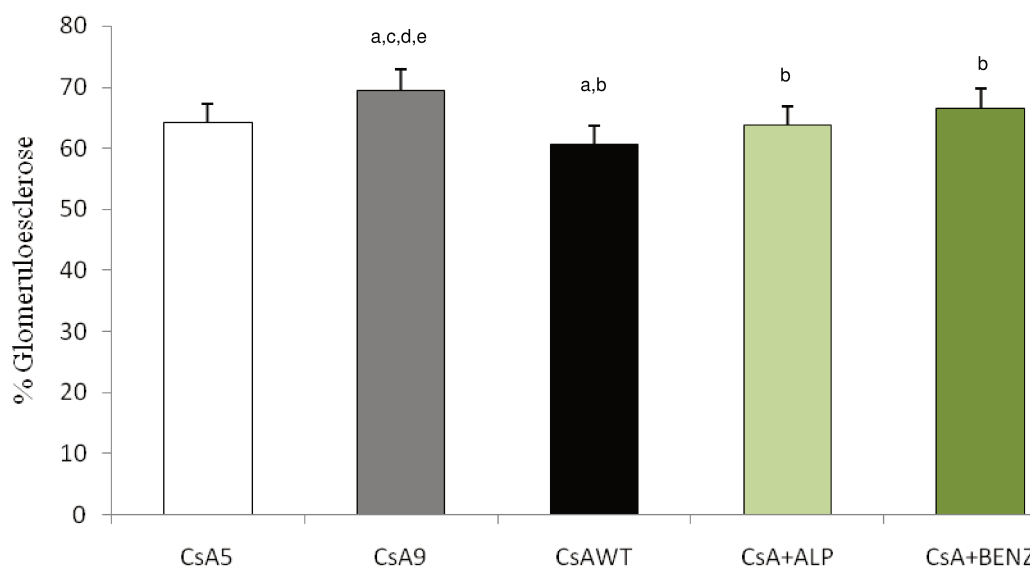
#### 5.1.6.1.2- Lesão glomerular- glomerulosclerose isquêmica

Foram considerados como positivos apenas os glomérulos que apresentavam esclerose em mais de 50% da área total do tufo. O tratamento com CsA cursou com aumento da esclerose glomerular, mais acentuada no grupo com exposição prolongada à CsA ( $69,5 \pm 3,0$  vs  $64,1 \pm 2,1\%$ , CsA9 vs CsA5,  $p < 0,05$ ). A suspensão da CsA na quinta semana de tratamento cursou com a estabilização da lesão glomerular. A administração de alopurinol ou benzbromarona, em presença de CsA, reduziu a progressão da esclerose, mais evidente no grupo tratado com alopurinol [Tabela 7, Gráfico 6].

**Tabela 7-** Percentual de glomérulos esclerosados (%GE) nos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes hipoureçimiantes.

	<b>CsA5</b>	<b>CsA9</b>	<b>CsAWT</b>	<b>CsA+ALP</b>	<b>CsA+BENZ</b>
<b>% GE</b>	64,1±2,1 <sup>b,c</sup>	69,5±3,0 <sup>a,c,d,e</sup>	60,7±2,9 <sup>a,b</sup>	63,7±1,3 <sup>b</sup>	66,4±2,0 <sup>b</sup>

**a** p<0,05 vs CsA5, **b** p<0,05 vs CsA9, **c** p<0,05 vs CsAWT, **d** p<0,05 vs CsA+ALP, **e** p<0,05 vs CsA+BENZ



**a** p<0,05 vs CsA5, **b** p<0,05 vs CsA9, **c** p<0,05 vs CsAWT, **d** p<0,05 vs CsA+ALP, **e** p<0,05 vs CsA+BENZ

**Gráfico 6-** Percentual de glomérulos esclerosados nas biopsias renais dos diferentes grupos experimentais.

## 5.1.7- Avaliação de fibrose intersticial

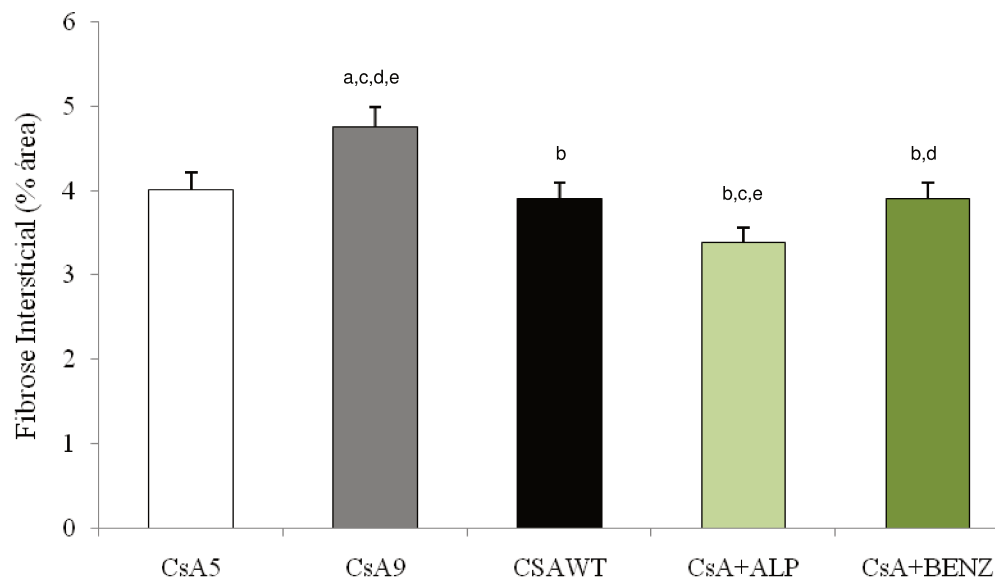
### 5.1.7.1- Tricômio de masson

Os animais que receberam CsA apresentaram extensas áreas de fibrose intersticial em faixa e atrofia tubular ( $4,0\pm 0,2$  vs  $1,0\pm 0,3\%$ , CsA5 vs VEH,  $p<0,05$ ). A lesão foi mais acentuada no grupo tratado por nove semanas ( $4,8\pm 0,2$  vs  $4,0\pm 0,2\%$ , CsA9 vs CsA5,  $p<0,05$ ). No grupo CsAWT houve estabilização da lesão ( $3,9\pm 0,1$  vs  $4,0\pm 0,2\%$ , CsAWT vs CsA5,  $p=ns$ ). O tratamento com alopurinol ou benzbromarona apresentou resultado semelhante ao observado com a suspensão de CsA. Entretanto, a fibrose intersticial, no grupo alopurinol, foi significativamente menor que nos demais grupos, sugerindo regressão da lesão ( $3,4\pm 0,3$  vs  $4,0\pm 0,2\%$ , CsAALP vs CsA5,  $p<0,05$ ) e ( $3,4\pm 0,3$  vs  $3,9\pm 0,25\%$ , CsA+ALP vs CsA+BENZ,  $p<0,05$ ) [Tabela 8, Gráfico 7, Figura 5].

**Tabela 8-** Fibrose intersticial (% lesão cortical (LC)), nos diferentes grupos de tratamento.

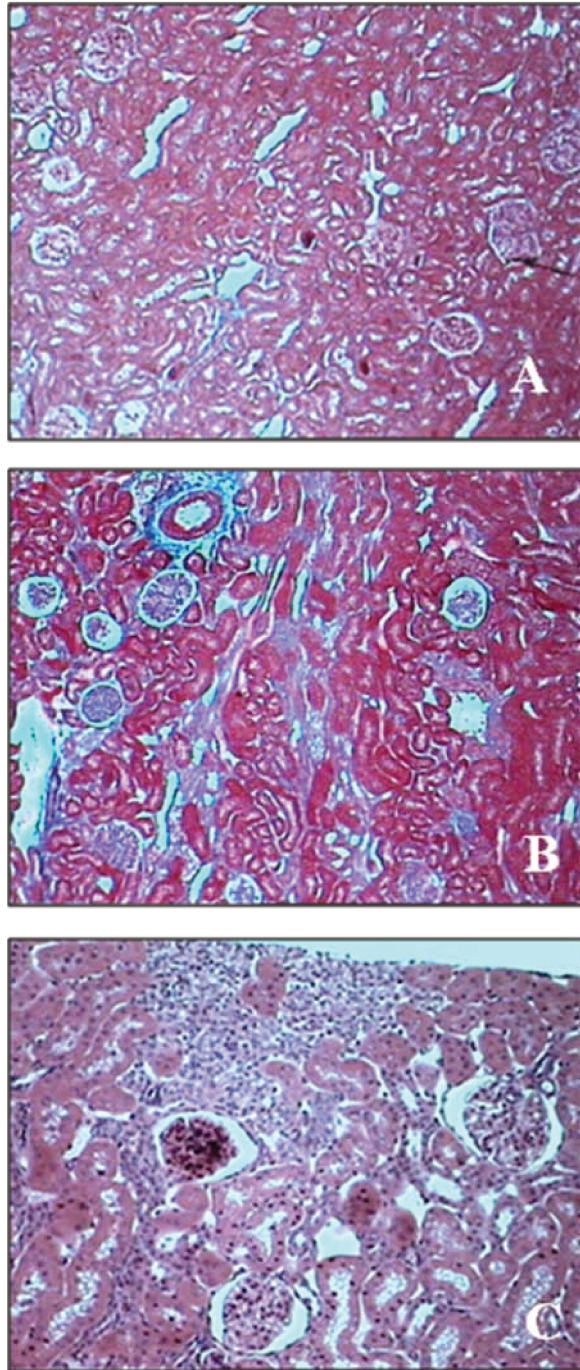
Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ALP	CsA+BENZ
% LC	$4,0\pm 0,2^b$	$4,8\pm 0,2^{a,c,d,e}$	$3,9\pm 0,1^b$	$3,4\pm 0,3^{b,c,e}$	$3,9\pm 0,25^{b,d}$

a  $p<0,05$  vs CsA5, b  $p<0,05$  vs CsA9, c  $p<0,05$  vs CsAWT, d  $p<0,05$  vs CsA+ALP, e  $p<0,05$  vs CsA+BENZ



a  $p < 0,05$  vs CsA5, b  $p < 0,05$  vs CsA9, c  $p < 0,05$  vs CSAWT, d  $p < 0,05$  vs CsA+ALP, e  $p < 0,05$  vs CsA+BENZ

**Gráfico 7-** Percentual de lesão cortical (Coloração de Tricrômio de Masson) em animais de diferentes grupos de tratamento.



**Figura 5- Lesão cortical:** Análise morfológica dos animais tratados com veículo (A) e com ciclosporina (B,C) durante 5 semanas. Em contraste com o grupo controle (A), os animais do grupo CsA apresentaram fibrose intersticial em faixa e atrofia tubular marcadas (B e C), alterações estas quantificadas para todos os grupos experimentais. (Coloração de tricrômio de Masson, aumento 100X (A, B e C)).

### 5.1.7.2- Picrossírius (Direct Red)

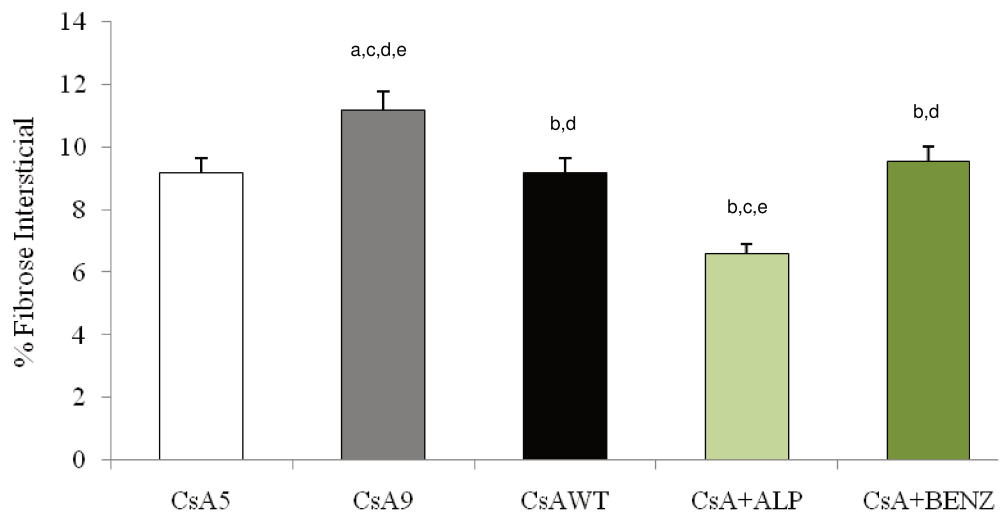
Os animais tratados com CsA desenvolveram fibrose intersticial ( $9,2\pm 0,6$  vs  $3,1\pm 0,03\%$ , CsA5 vs VEH,  $p<0,05$ ), com aumento significativo com o maior tempo de tratamento ( $11,2\pm 0,4$  vs  $9,2\pm 0,6\%$ , CsA9 vs CsA5,  $p<0,05$ ). No grupo em que a CsA foi suspensa na quinta semana de tratamento, a área acometida por fibrose foi equivalente à do grupo CsA5, sugerindo estabilização da lesão. Os animais tratados com alopurinol ou benzbromarona apresentaram redução significativa da área de fibrose intersticial, mais proeminente no grupo CsA+ALP ( $6,6\pm 0,4$  vs  $9,6\pm 1,0\%$ , CsA+ALP vs CsA+BENZ,  $p<0,05$ ). O grupo tratado com alopurinol apresentou a menor extensão de fibrose intersticial comparado com os demais grupos, a despeito da manutenção da ciclosporina, sugerindo regressão do processo fibrótico. [Tabela 9, Gráfico 8, Figura 6].

**Tabela 9-** Fibrose intersticial (% área) em região cortical renal dos diferentes grupos.

Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ALP	CsA+BENZ
% fibrose	$9,2\pm 0,6^{b,d}$	$11,2\pm 0,4^{a,c,d,e}$	$9,2\pm 0,7^{b,d}$	$6,6\pm 0,4^{b,c,e}$	$9,6\pm 1,0^{b,d}$

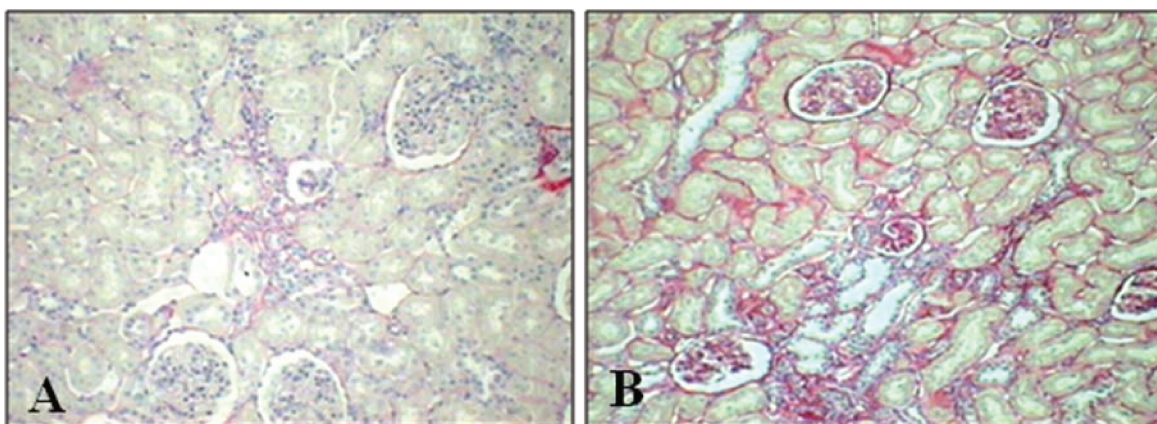
a  $p<0,05$  vs CsA5, b  $p<0,05$  vs CsA9, c  $p<0,05$  vs CsAWT, d  $p<0,05$  vs CsA+ALP, e  $p<0,05$  vs CsA+BENZ





a  $p < 0,05$  vs CsA5, b  $p < 0,05$  vs CsA9, c  $p < 0,05$  vs CsAWT, d  $p < 0,05$  vs CsA+ALP, e  $p < 0,05$  vs CsA+BENZ

**Gráfico 8-** Fibrose intersticial (% área) em córtex renal, nos diferentes grupos experimentais.



**Figura 6- Fibrose intersticial:** Em contraste com o grupo veículo (A), os animais do grupo CsA5 apresentaram extensas áreas de fibrose intersticial em faixa (B), alterações estas quantificadas para todos os grupos experimentais. (Coloração de Direct Red, aumento 100x).

## 5.1.8- Avaliação de Inflamação Intersticial

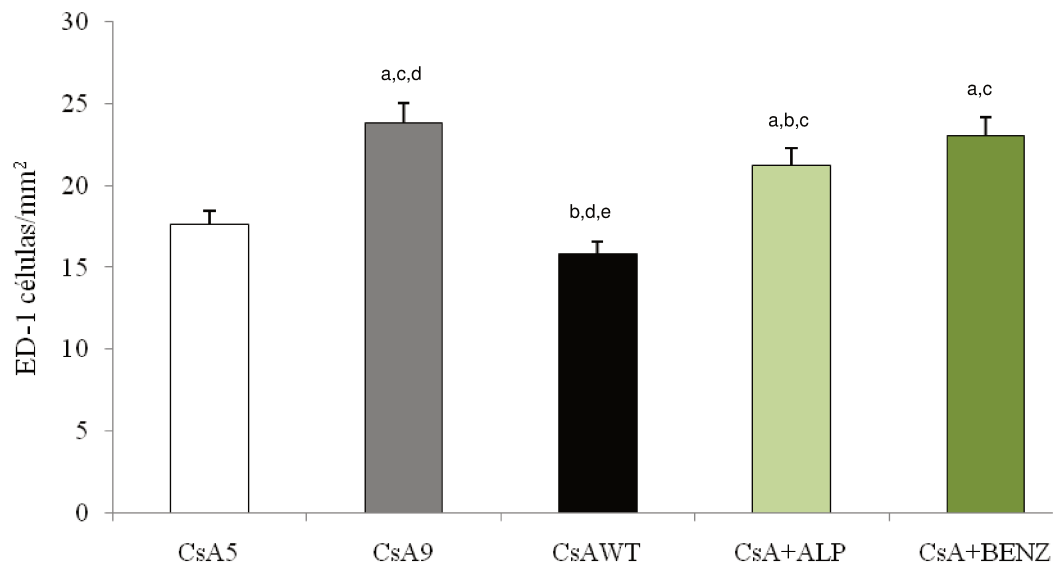
### 5.1.8.1- Infiltrado Intersticial de Macrófagos

O tratamento com CsA aumentou significativamente o infiltrado intersticial de macrófagos ( $17,6 \pm 2,25$  vs  $1,9 \pm 1,1$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA5 vs VEH,  $p < 0,05$ ), com aumento progressivo com o uso prolongado com CsA ( $23,8 \pm 1,7$  vs  $17,6 \pm 2,25$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA9 vs CsA5,  $p < 0,05$ ). A interrupção de CsA foi associada à estabilização do infiltrado inflamatório, comparável grupo CsA5 ( $15,8 \pm 2,0$  vs  $17,6 \pm 2,25$  vs cel/mm<sup>2</sup>, CsAWT vs CsA5,  $p = ns$ ). Nos grupos tratados, o uso de alopurinol cursou com redução da inflamação intersticial ( $21,3 \pm 1,6$  vs  $23,8 \pm 1,7$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA+ALP vs CsA9,  $p < 0,05$ ), enquanto que a benzbromarona não alterou a inflamação intersticial ( $23,0 \pm 1,6$  vs  $23,8 \pm 1,7$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA+BENZ vs CsA9;  $p = ns$ ). [Tabela 10, Gráfico 9, Figura 7].

**Tabela 10-** Infiltrado intersiticial de macrófagos (células ED-1 +/mm<sup>2</sup>) nos diferentes grupos experimentais

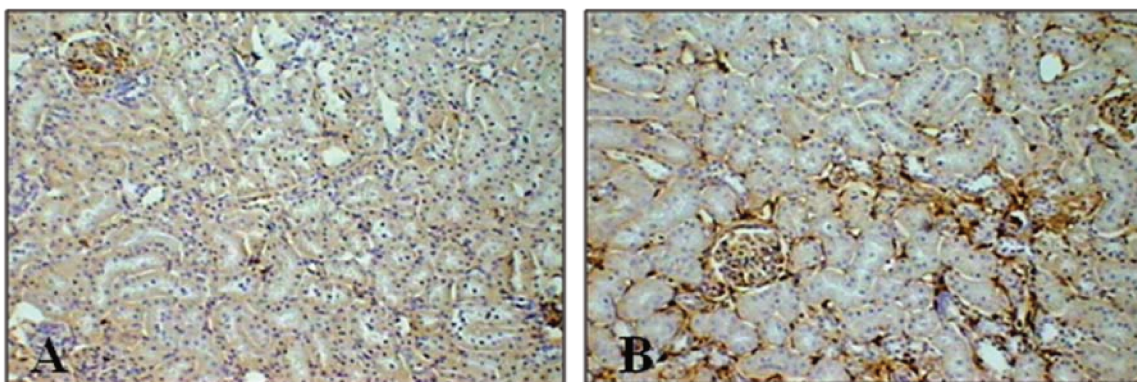
Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ALP	CsA+BENZ
Cél. ED1+/mm <sup>2</sup>	$17,6 \pm 2,25^{b,d,f}$	$23,8 \pm 1,7^{a,c,d}$	$15,8 \pm 2,0^{b,d,e}$	$21,3 \pm 1,6^{a,b,c}$	$23,0 \pm 1,6^{a,c}$

**a**  $p < 0,05$  vs CsA5, **b**  $p < 0,05$  vs CsA9, **c**  $p < 0,05$  vs CsAWT, **d**  $p < 0,05$  vs CsA+ALP, **e**  $p < 0,05$  vs CsA+BENZ



**a**  $p < 0,05$  vs CsA5, **b**  $p < 0,05$  vs CsA9, **c**  $p < 0,05$  vs CsAWT, **d**  $p < 0,05$  vs CsA+ALP, **e**  $p < 0,05$  vs CsA+BENZ

**Gráfico 9-** Infiltrado intersticial de macrófagos nos diferentes grupos.



**Figura 7-** Infiltrado de macrófagos: Em contraste com o grupo veículo (A), os animais do grupo CsA5 apresentaram intenso infiltrado de macrófagos no interstício renal (B), alteração quantificada em todos os grupos experimentais propostos. (Imunohistoquímica para ED-1, aumento 100x).

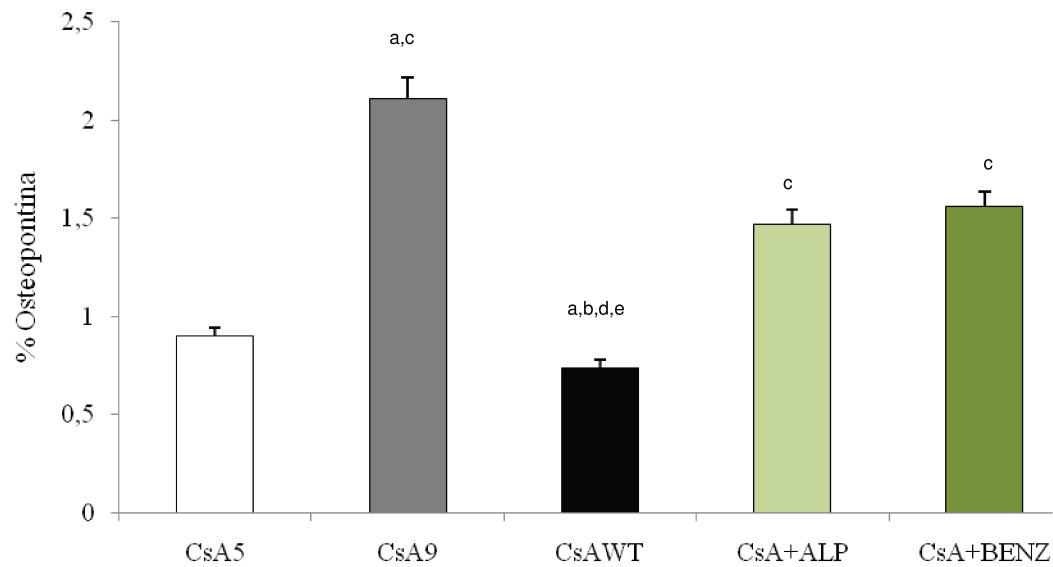
### 5.1.8.2- Expressão de osteopontina em região cortical

Observamos um aumento significativo da expressão de OPN em túbulos de região cortical renal nos grupos tratados com CsA ( $0,9 \pm 0,6$  vs  $0,2 \pm 0,2\%$ , CsA5 vs VEH,  $p < 0,05$ ), com aumento progressivo com o maior tempo de tratamento ( $2,1 \pm 0,9$  vs  $0,9 \pm 0,6\%$ , CsA9 vs CsA5,  $p < 0,05$ ). A intervenção terapêutica, com a interrupção de CsA ou a adição de ALP e BENZ, mostrou que a suspensão da CsA foi mais eficiente que a introdução de agentes hipouricemiantes na redução da expressão de OPN ( $0,7 \pm 0,3$  vs  $1,5 \pm 0,3\%$ , CsAWT vs CsA+ALP,  $p < 0,05$ ) e ( $0,7 \pm 0,3$  vs  $1,6 \pm 0,5$ , CsAWT vs CsA+BENZ,  $p < 0,05$ ). Nos grupos CsA+ALP e CsA+BENZ a expressão de OPN foi intermediária aos grupos CsA5 e CsA9, sugerindo proteção parcial contra o estímulo lesivo da CsA. [Tabela 11, Gráfico 10, Figura 8].

**Tabela 11-** Expressão de Osteopontina (% área) em região cortical renal dos animais dos diferentes grupos de tratamento.

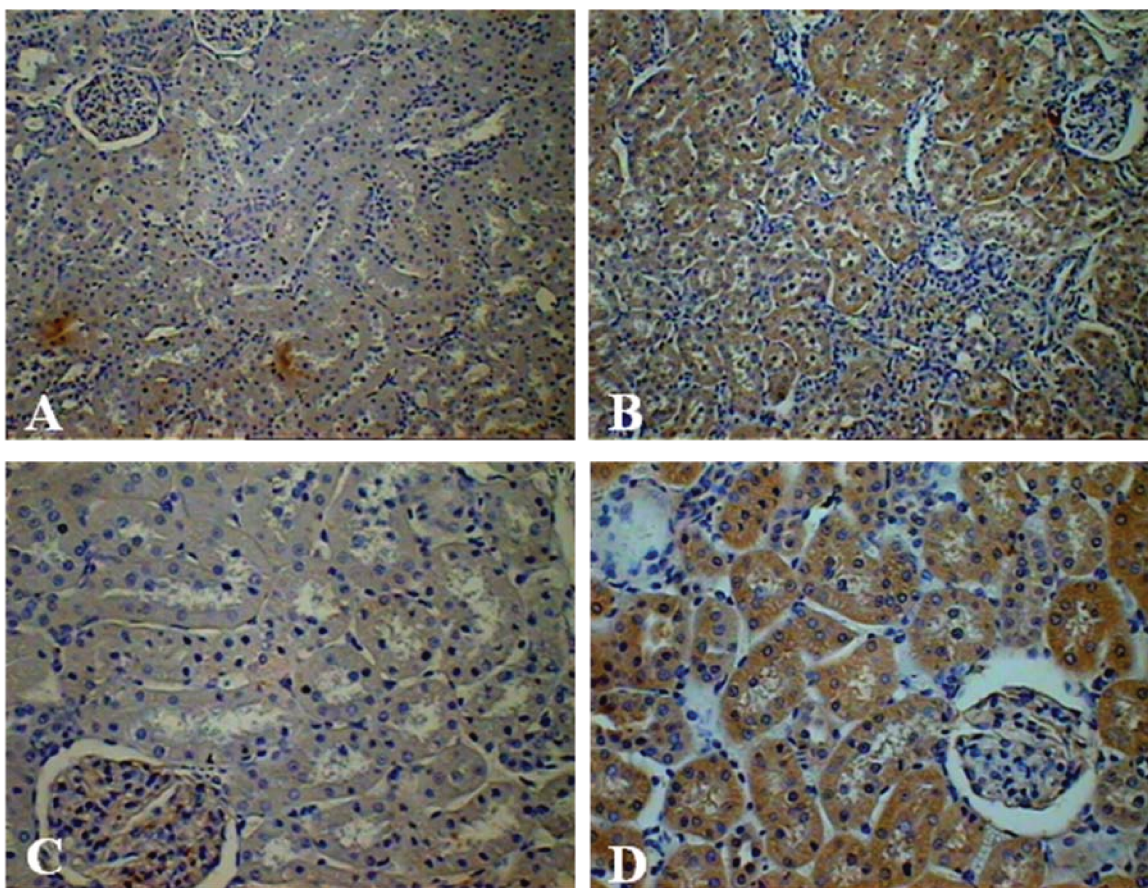
Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ALP	CsA+BENZ
% OPN	$0,9 \pm 0,6^b$	$2,1 \pm 0,9^{a,c}$	$0,7 \pm 0,3^{a,b,d,e}$	$1,5 \pm 0,3^c$	$1,6 \pm 0,5^c$

**a**  $p < 0,05$  vs CsA5, **b**  $p < 0,05$  vs CsA9, **c**  $p < 0,05$  vs CsAWT, **d**  $p < 0,05$  vs CsA+ALP, **e**  $p < 0,05$  vs CsA+BENZ



**a**  $p < 0,05$  vs CsA5, **b**  $p < 0,05$  vs CsA9, **c**  $p < 0,05$  vs CsAWT, **d**  $p < 0,05$  vs CsA+ALP, **e**  $p < 0,05$  vs CsA+BENZ

**Gráfico 10-** Expressão de osteopontina (% área) em região cortical renal dos animais dos diferentes grupos.



**Figura 8- Osteopontina:** Em contraste com o grupo veículo (A), os animais do grupo CsA5 apresentaram expressão significativa de osteopontina (B), alteração quantificada em todos os grupos experimentais propostos. (Imunohistoquímica para OPN, aumento 100x (A,B) e aumento 200X (C,D)).

#### 5.1.9- Lesão microvascular - hialinose de arteríola aferente glomerular

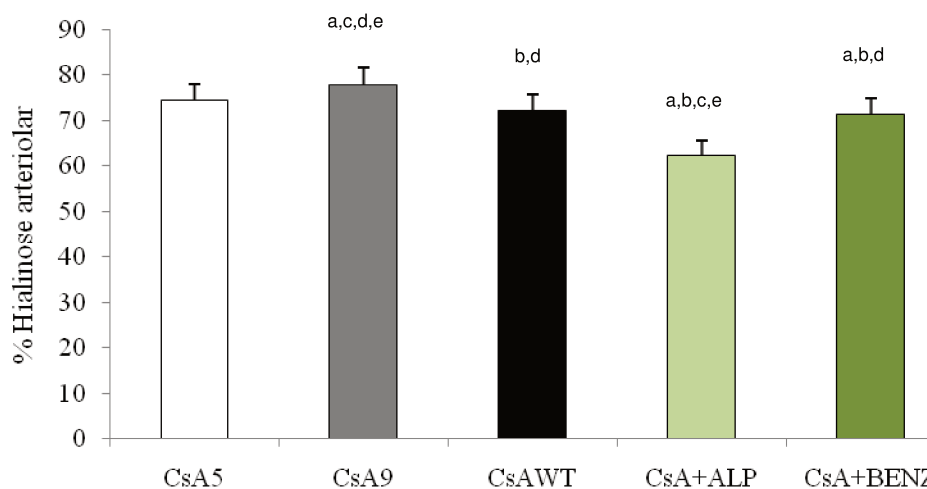
Hialinose arteriolar aferente, quantificada em % de arteríolas acometidas/total de arteríolas aferentes, mostrou um aumento significativo da hialinose arteriolar nos animais tratados com CsA, progredindo com a exposição prolongada da droga ( $77,70 \pm 2,45$  vs  $74,3 \pm 1,15\%$ , CsA9 vs CsA5,  $p < 0,05$ ). A administração de agentes hipouricemiantes promoveu uma redução significativa da hialinose arteriolar, mais acentuada nos animais tratados com alopurinol

(62,4±2,15 vs 71,2±0,95%, CsA+ALP vs CsA+BENZ, p<0,05). A suspensão da CsA e o uso de benzbromarona apresentaram efeitos semelhantes, com estabilização da lesão vascular (72,1±0,9 vs 71,2±0,9%, CsAWT vs CsA+BENZ, p=ns). Entretanto, o uso de alopurinol cursou com redução significativa da hialinose arteriolar, comparado com os demais grupos analisados. [Tabela 12, Gráfico 11, Figura 9].

**Tabela 12-** Hialinose de arteríola aferente glomerular (%) nos diferentes grupos.

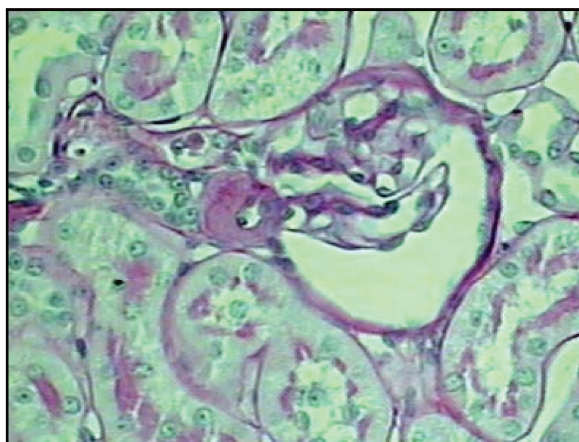
Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ALP	CsA+BENZ
%Hialinose	74,3±1,15 <sup>b,d,e</sup>	77,7±2,45 <sup>a,c,d,e</sup>	72,1±0,9 <sup>b,d</sup>	62,4±2,15 <sup>a,b,c,e</sup>	71,2±0,95 <sup>a,b,d</sup>

a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ALP, e p<0,05 vs CsA+BENZ



a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ALP, e p<0,05 vs CsA+BENZ

**Gráfico 11-** Porcentagem de hialinose de arteríola (% HA) aferente induzida por ciclosporina nos diferentes grupos experimentais.



**Figura 9- Hialinose arteriolar:** Os animais do grupo CsA5 apresentaram hialinose arteriolar severa (Coloração PAS, aumento 1000X), alteração quantificada em todos os grupos experimentais propostos.

#### 5.1.10- Avaliação de estresse oxidativo

##### 5.1.10.1- Detecção de dano oxidativo ao DNA por 8-OHdG

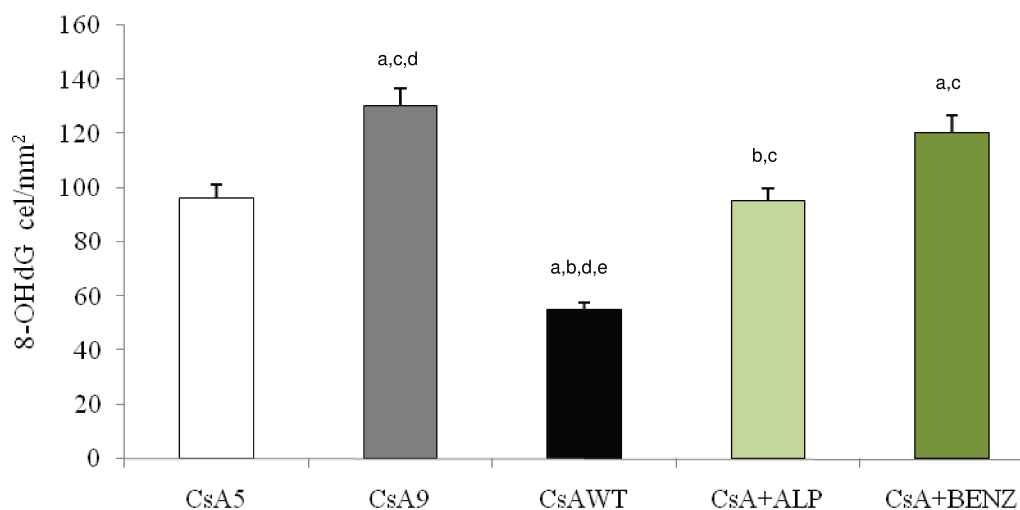
O uso de CsA promoveu aumento significativo da expressão de 8-OHdG em córtex renal ( $96,3 \pm 12,7$  vs.  $10,0 \pm 5,0$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA5 vs VEH,  $p < 0,05$ ), com evolução progressiva com o tempo de exposição à droga ( $130,3 \pm 21,9$  vs  $96,3 \pm 12,7$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA9 vs. CsA5,  $p < 0,05$ ). A interrupção do tratamento com CsA promoveu reparo tecidual, comparado ao grupo CsA5 ( $55,5 \pm 12,7$  vs  $96,3 \pm 12,7$  cel/mm<sup>2</sup>, CsAWT vs CsA5,  $p < 0,05$ ). O uso de alopurinol preveniu a progressão da lesão de estresse oxidativo, mesmo com a manutenção da administração de CsA ( $95,2 \pm 22,7$  vs  $130,3 \pm 21,9$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA+ALP vs CsA9,  $p < 0,05$ ), efeito não observado com o co-tratamento com benzbromarona ( $112,7 \pm 17,6$  vs  $130,3 \pm 21,9$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA+BENZ vs CsA9,  $p = ns$ ). [Tabela 13, Gráfico 12, Figura 10].



**Tabela 13-** Detecção de dano oxidativo ao DNA (células 8-OHdG positivas) em córtex renal dos diferentes grupos experimentais.

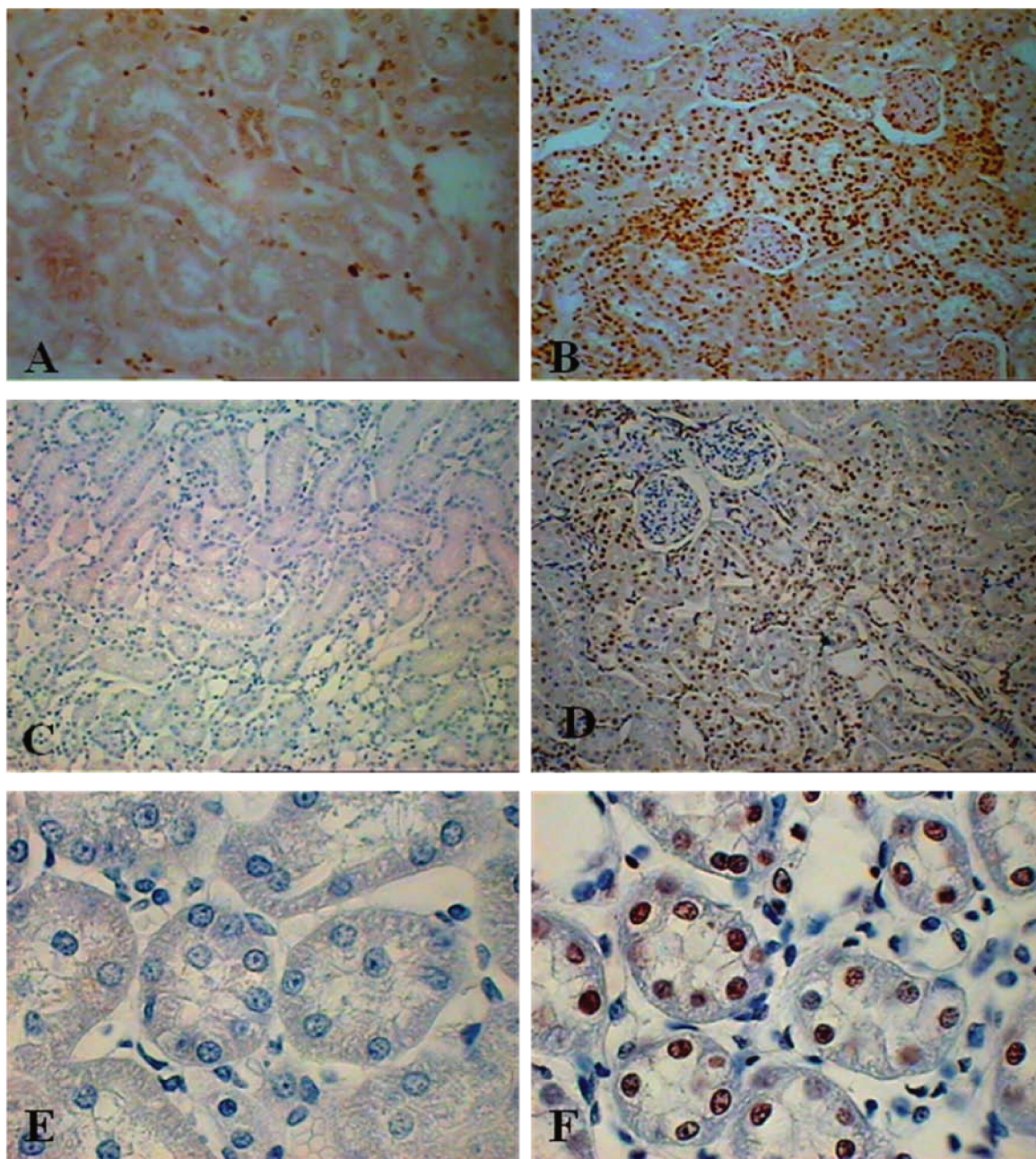
Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ALP	CsA+BENZ
<b>8-OHdG</b>	96,3±12,7 <sup>b,c,e</sup>	130,3±21,9 <sup>a,c,d</sup>	55,2±12,6 <sup>a,b,d,e</sup>	95,2±22,7 <sup>b,c</sup>	120,7±17,6 <sup>a,c</sup>

**a** p<0,05 vs CsA5, **b** p<0,05 vs CsA9, **c** p<0,05 vs CsAWT, **d** p<0,05 vs CsA+ALP, **e** p<0,05 vs CsA+BENZ



**a** p<0,05 vs CsA5, **b** p<0,05 vs CsA9, **c** p<0,05 vs CsAWT, **d** p<0,05 vs CsA+ALP, **e** p<0,05 vs CsA+BENZ

**Gráfico 12-** Detecção de dano oxidativo ao DNA (células 8-OHdG positivas) em córtex renal dos diferentes grupos experimentais.



**Figura 10- Estresse Oxidativo:** Em contraste com o grupo veículo (A: biópsia contra-corada com PAS/C e E: contra-corada com hematoxilina de Harris), os animais do grupo CsA5 apresentaram expressão significativa de osteopontina (B: biópsia contra-corada com PAS/D e F: contra-corada com hematoxilina de Harris), alteração quantificada em todos os grupos experimentais propostos. (Imunohistoquímica para 8-OHdG, aumento 100x (A,B,C,D) e aumento 1000X (E,F)).

#### 5.1.10.2- Quantificação de peroxidação lipídica através da concentração de malonaldeído (método TBARS)

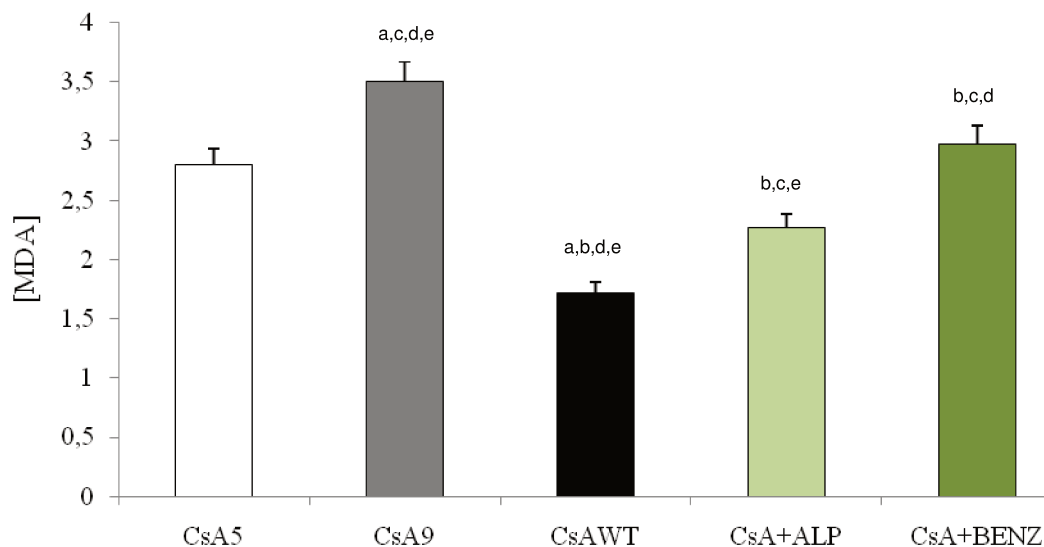
O uso crônico de ciclosporina promoveu dano celular mediado por espécies reativas de oxigênio ( $2,8 \pm 0,7$  vs  $1,5 \pm 0,45 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ , CsA5 vs VEH,  $p < 0,05$ ), proporcional ao maior tempo de exposição à droga ( $3,5 \pm 0,6$  vs  $2,8 \pm 0,7 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ , CsA9 vs CsA5,  $p < 0,05$ ). Após a suspensão da CsA, houve redução significativa dos níveis de MDA, comparado aos animais tratados ( $1,7 \pm 0,2$  vs  $2,8 \pm 0,70 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ , CsAWT vs CsA5,  $p < 0,05$ ), sugerindo que a ciclosporina é o principal estímulo para o dano celular neste modelo.

O tratamento com agentes hipouricemiantes reduziu significativamente a concentração de malonaldeído quando comparado aos animais tratados com CsA isolada por 9 semanas ( $2,3 \pm 0,3$  vs  $3,5 \pm 0,6 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ , CsA+ALP vs CsA9,  $p < 0,05$ ) ( $2,9 \pm 0,7$  vs  $3,5 \pm 0,6 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ , CsA+BENZ vs CsA9,  $p < 0,05$ ). A co-administração de benzbromarona cursou com estabilização da peroxidação lipídica ( $2,9 \pm 0,7$  vs  $2,8 \pm 0,7 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ , CsA+BENZ vs CsA5,  $p = \text{ns}$ ), enquanto que o tratamento com reduziu a concentração de MDA comparado aos animais tratados por 5 semanas ( $2,3 \pm 0,3$  vs  $2,8 \pm 0,7 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ , CsA+ALP vs CsA5,  $p < 0,05$ ). Este efeito mais acentuado do alopurinol comparado com a benzbromarona ( $2,3 \pm 0,3$  vs  $2,9 \pm 0,7 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ , CsA+ALP vs CsA+BENZ,  $p < 0,05$ ), sugere que parte da eficácia do alopurinol possa ser consequência de seu efeito antioxidante. Entretanto, apesar da redução de peroxidação lipídica obtida com os agentes hipouricemiantes, o efeito não foi tão intenso quanto o obtido com a interrupção do tratamento com ciclosporina (CsA+ALP vs CsAWT,  $p < 0,05$ ), (CsA+BENZ vs CsAWT,  $p < 0,05$ ). [Tabela 14, Gráfico 13].

**Tabela 14-** Detecção de malonaldeído [MDA] em homogenato de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ALP	CsA+BENZ
[MDA]	2,8±0,7 <sup>c</sup>	3,5±0,6 <sup>a,c,d,e</sup>	1,7±0,2 <sup>a,b,d,e</sup>	2,3±0,3 <sup>b,c,e</sup>	2,9±0,7 <sup>b,c,d</sup>

a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ALP, e p<0,05 vs CsA+BENZ



a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ALP, e p<0,05 vs CsA+BENZ

**Gráfico 13-** Detecção de malonaldeído [MDA] em homogenato de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.

### 5.1.11- Avaliação de Apoptose

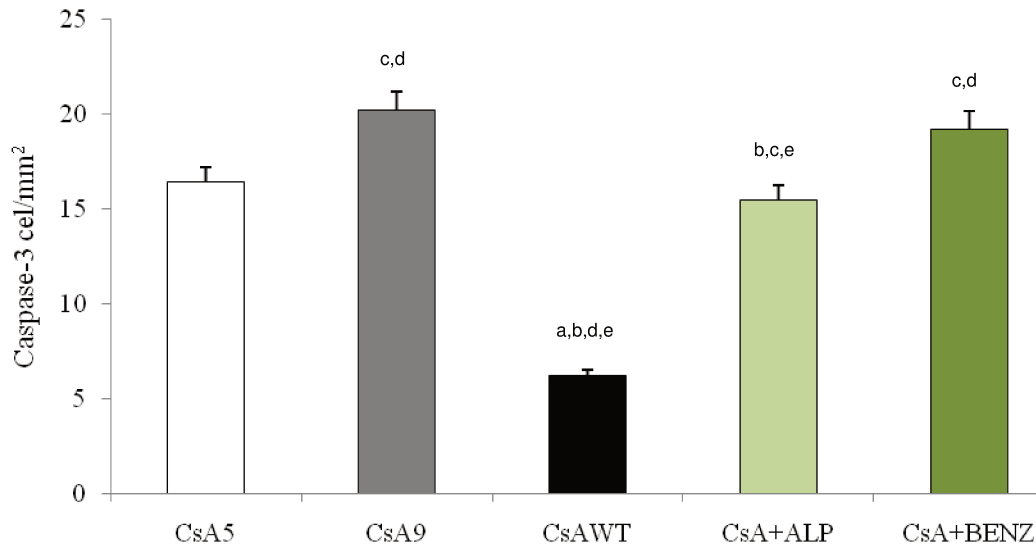
#### 5.1.11.1- Detecção de Caspase-3 em córtex renal

A identificação de células caspase-3 positivas (em toda extensão da biopsia renal) foi significativamente maior nos animais tratados com CsA ( $16,4 \pm 3,9$  vs  $2,5 \pm 0,9$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA5 vs VEH,  $p < 0,05$ ), com aumento da apoptose com o tratamento prolongado com o inibidor de calcineurina ( $20,2 \pm 4,5$  vs  $16,4 \pm 3,9$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA9 vs CsA5,  $p < 0,05$ ). A suspensão da CsA cursou com redução da apoptose, mesmo comparado aos animais tratados por 5 semanas ( $6,2 \pm 2,1$  vs  $16,4 \pm 3,9$  cel/mm<sup>2</sup>, CsAWT vs CsA5,  $p < 0,05$ ). O tratamento com benzbromarona não apresentou efeito sobre a apoptose (CsA+BENZ vs CsA9,  $p = ns$ ). Entretanto o uso de alopurinol manteve a intensidade de apoptose comparável à de cinco semanas de tratamento, sugerindo bloqueio parcial ( $15,5 \pm 2,0$  vs  $16,4 \pm 3,9$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA+ALP vs CsA5,  $p = ns$ ) [Tabela 15, Gráfico 14, Figura 11].

**Tabela 15-** Detecção de células caspase-3 positivas em camada cortical dos fragmentos de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.

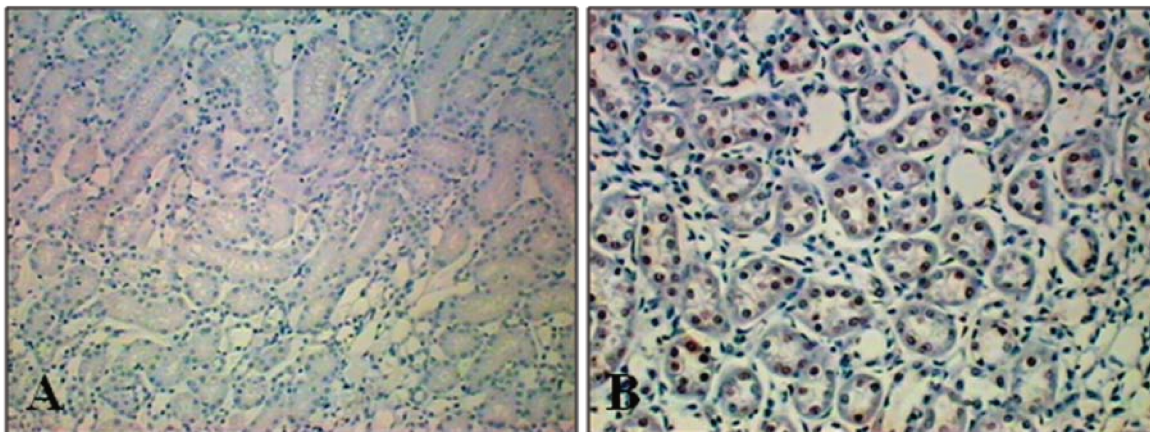
Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ALP	CsA+BENZ
<b>Caspase-3</b>	$16,4 \pm 3,9^c$	$20,2 \pm 4,5^{c,d}$	$6,2 \pm 2,1^{a,b,d,e}$	$15,5 \pm 2,0^{b,c,e}$	$19,2 \pm 1,7^{c,d}$

**a**  $p < 0,05$  vs CsA5, **b**  $p < 0,05$  vs CsA9, **c**  $p < 0,05$  vs CsAWT, **d**  $p < 0,05$  vs CsA+ALP, **e**  $p < 0,05$  vs CsA+BENZ



**a** p<0,05 vs CsA5, **b** p<0,05 vs CsA9, **c** p<0,05 vs CsAWT, **d** p<0,05 vs CsA+ALP, **e** p<0,05 vs CsA+BENZ

**Gráfico 14-** Detecção de apoptose (células caspase-3+/mm<sup>2</sup>) em camada cortical dos fragmentos de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.



**Figura 11- Apoptose:** Em contraste com o grupo veículo (A), os animais do grupo CsA5 apresentaram expressão significativa de Caspase-3 em núcleo de célula tubular (B), alteração quantificada em todos os grupos experimentais propostos. (Imunohistoquímica para Caspase-3, aumento 100x (A,B)).

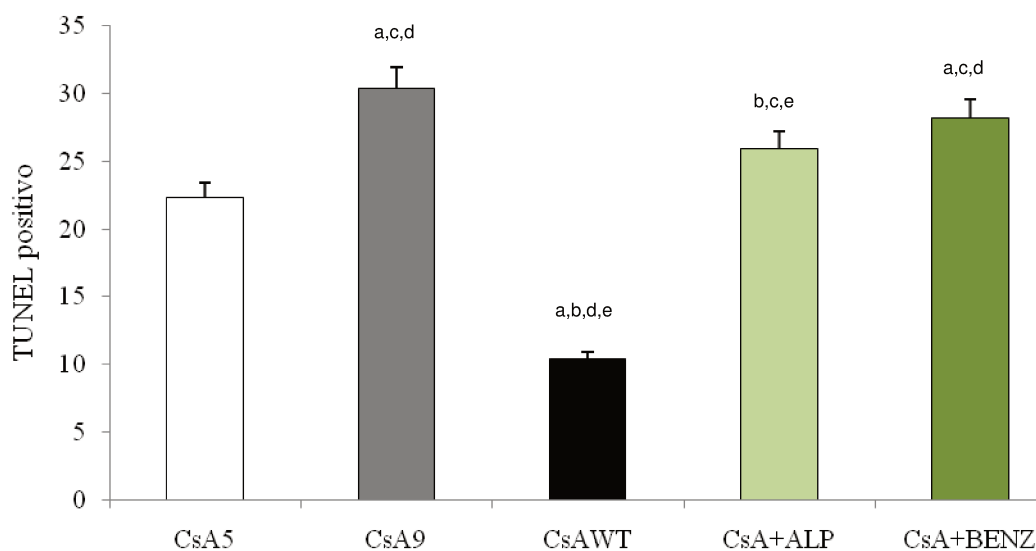
#### 5.1.11.2- Detecção de células tubulares positivas para a reação de TUNEL

O número de células tubulares TUNEL+ foi aumentado nos animais tratados com CsA ( $22,3 \pm 4,2$  vs  $4,2 \pm 0,5$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA5 vs VHE,  $p < 0,05$ ), progressivo com o maior tempo de exposição à droga ( $30,4 \pm 3,7$  vs  $25,9 \pm 2,2$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA9 vs CsA5,  $p < 0,05$ ). A interrupção do tratamento com CsA foi associada com redução significativa da apoptose de células tubulares ( $10,4 \pm 1,7$  cel/mm<sup>2</sup>, CsAWT vs CsA5,  $p < 0,05$ ). O tratamento com alopurinol impediu a progressão da apoptose ( $25,9 \pm 2,2$  vs  $22,3 \pm 4,2$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA+ALP vs CsA5,  $p = ns$ ), apesar da manutenção do estímulo da CsA ( $25,9 \pm 2,2$  vs  $30,4 \pm 3,7$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA+ALP vs CsA9,  $p < 0,05$ ). Em contraste, o tratamento com benzbromarona não apresentou efeito sobre a apoptose de células tubulares renais ( $28,2 \pm 1,9$  vs  $30,4 \pm 3,7$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA+BENZ vs CsA9,  $p = ns$ ). [Tabela 16, Gráfico 15, Figura 12].

**Tabela 16-** Detecção de células positivas para reação de TUNEL em camada cortical dos fragmentos de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ALP	CsAB+ENZ
TUNEL	22,3±4,2 <sup>b,c,e</sup>	30,4±3,7 <sup>a,c,d</sup>	10,4±1,7 <sup>a,b,d,e</sup>	25,9±2,2 <sup>b,c,e</sup>	28,2±1,9 <sup>a,c,d</sup>

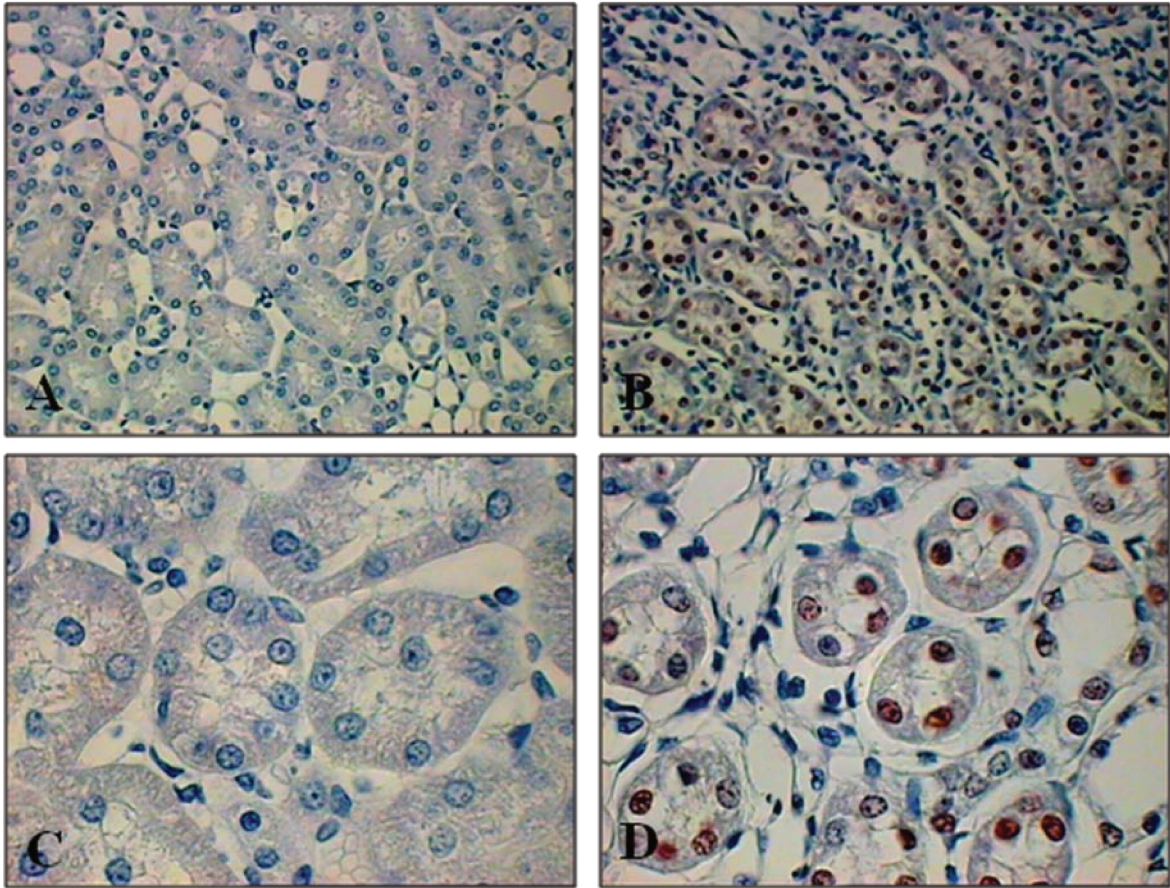
a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ALP, e p<0,05 vs CsA+BENZ



a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ALP, e p<0,05 vs CsA+BENZ

**Gráfico 15-** Detecção de células positivas para reação de TUNEL em camada cortical dos fragmentos de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.





**Figura 12- Apoptose:** Em contraste com o grupo veículo (A e C), os animais do grupo CsA5 apresentaram um aumento expressivo de células tubulares positivas para a reação de TUNEL (B e D), alteração quantificada em todos os grupos experimentais propostos. (Reação de TUNEL, aumento, 200x (A e B) e aumento, 1000X (C e D)).

**Tabela 17-** Resumo dos resultados da intervenção com hipouricemiantes na nefropatia por ciclosporina.

	<b>CsA5</b>	<b>CsA9</b>	<b>CsAWT</b>	<b>CsAALP</b>	<b>CsABENZ</b>
<b>Função renal</b>	↔	↓↓	↔	↔	↔
<b>Morfologia</b>					
Lesão túbulo intersticial	↔	↑↑↑	↔	↔	↔
Glomeruloesclerose	↔	↑↑	↔	↔	↔
<b>Fibrose intersticial</b>					
Tricrômio de Masson	↔	↑↑↑	↔	↓	↔
Sirius Red	↔	↑↑↑	↔	↓	↔
<b>Inflamação</b>					
Macrófagos	↔	↑↑↑	↔	↑	↑↑
Osteopontina	↔	↑↑↑	↔	↔	↑
<b>Apoptose</b>					
Caspase- 3	↔	↑↑	↓↓	↔	↑↑
Tunel	↔	↑↑	↓↓	↔	↑↑
<b>Vasculopatia</b>					
Hialinose arteriolar	↔	↑↑	↔	↓	↔
<b>Estresse oxidativo</b>					
8-OHdG	↔	↑↑↑	↓↓	↔	↑↑
TBARS	↔	↑↑↑	↓↓	↓	↔

Para comparação, o grupo CsA5 foi considerado como padrão de lesão estabelecida.

↔: estabilização, ↑: aumento, ↓: redução

## 5.2- Modelo experimental de nefrotoxicidade por ciclosporina com intervenção terapêutica para modulação do sistema renina-angiotensina- aldosterona

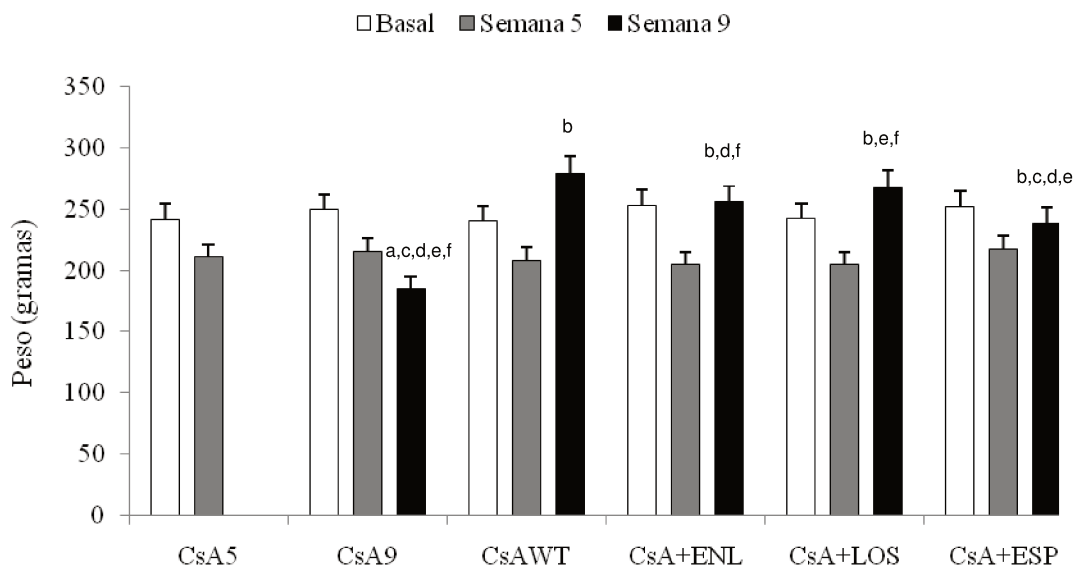
### 5.2.1- Variação de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais

Os animais tratados com CsA apresentaram uma significativa perda de peso, mais acentuada no grupo com tratamento prolongado ( $210,7 \pm 25,71$  vs  $185,2 \pm 12,5g$ , CsA5 vs CsA9,  $p < 0,05$ ). A interrupção da CsA cursou com recuperação ponderal ( $278,9 \pm 20,45$  vs  $185,2 \pm 12,50g$ , CsAWT vs CsA9,  $p < 0,05$ ). Nos animais tratados com CsA associada a bloqueadores o SRAA a perda de peso foi menos acentuada que nos animais com CsA isolada ( $256,0 \pm 6,9g$  CsA+ENL,  $267,0 \pm 7,3g$  CsA+LOS e  $238,65 \pm 5,2g$  CsA+ESP,  $p < 0,05$  vs CsA9). O efeito protetor foi mais acentuado nos grupos CsA+LOS e CsA+ENL ( $p = ns$  vs CsAWT). Nos animais tratados com espironolactona, entretanto, a proteção foi apenas parcial ( $238,65 \pm 5,2$  vs  $185,2 \pm 12,5g$ , CsA+ESP vs CSA9,  $p < 0,05$ ) ( $238,65 \pm 5,2$  vs  $278,9 \pm 20,45g$ , CsA+ESP vs CsAWT,  $p < 0,05$ ). [Tabela 18, Gráfico 16].

**Tabela 18-** Medida dos pesos (g) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com modeladores do SRAA.

Grupo	N	Peso (g)		
		Basal	Semana 5	Semana 9
<b>CsA5</b>	06	$241,7 \pm 19,0$	$210,7 \pm 25,7$	-----
<b>CsA9</b>	05	$249,5 \pm 18,3$	$215,25 \pm 18,2$	$185,2 \pm 12,5^{a,c,d,e,f}$
<b>CsAWT</b>	04	$240,5 \pm 18,4$	$208,15 \pm 17,4$	$278,9 \pm 20,45^b$
<b>CsA+ENL</b>	05	$252,75 \pm 27,8$	$204,5 \pm 18,1$	$256,0 \pm 6,9^{b,d,f}$
<b>CsA+LOS</b>	05	$242,25 \pm 22,2$	$204,75 \pm 16,7$	$267,5 \pm 7,3^{b,e,f}$
<b>CsA+ESP</b>	05	$252,25 \pm 5,1$	$217,75 \pm 5,3$	$238,65 \pm 5,2^{b,c,d,e}$

a  $p < 0,05$  vs CsA5, b  $p < 0,05$  vs CsA9, c  $p < 0,05$  vs CsAWT, d  $p < 0,05$  vs CsA+ENL, e  $p < 0,05$  vs CsA+LOS, f  $p < 0,05$  CsA+ESP



a  $p < 0,05$  vs CsA5, b  $p < 0,05$  vs CsA9, c  $p < 0,05$  vs CsAWT, d  $p < 0,05$  vs CsA+ENL, e  $p < 0,05$  vs CsA+LOS, f  $p < 0,05$  CsA+ESP

**Gráfico 16-** Variação do peso (g) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com modeladores do SRAA.

### 5.2.2- Avaliação da função renal

Os animais tratados com CsA evoluíram com piora da função renal ( $1,13 \pm 0,17$  vs  $0,32 \pm 0,08$  mg/dL, CsA9 vs VEH,  $p < 0,05$ ), com agravamento associado ao tratamento prolongado ( $1,13 \pm 0,17$  vs  $0,55 \pm 0,07$  mg/dL, CsA9 vs CsA5,  $p < 0,05$ ). A suspensão da CsA cursou com estabilização da função renal ( $0,63 \pm 0,08$  vs  $0,55 \pm 0,07$  mg/dL, CsAWT vs CsA5,  $p = ns$ ).

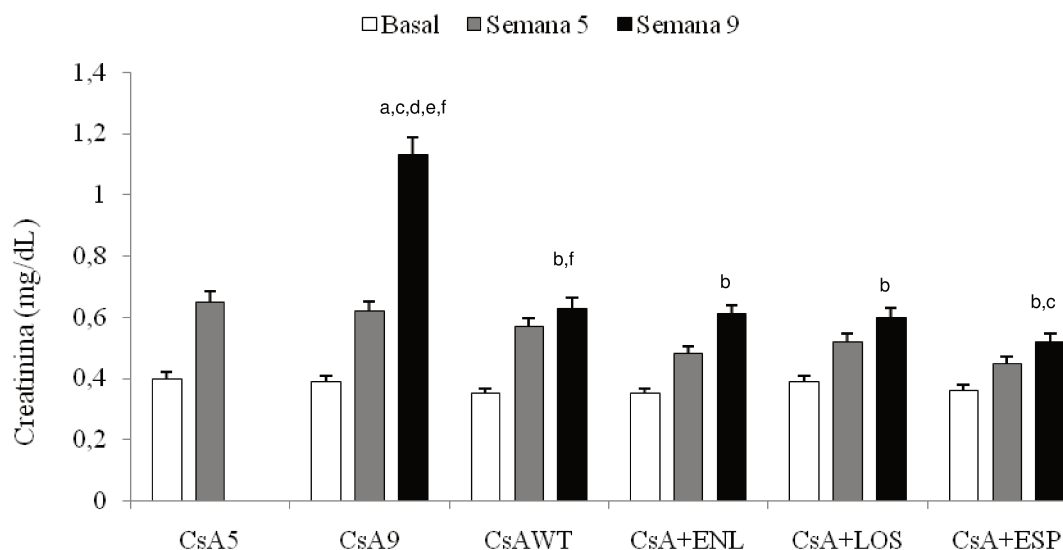
A intervenção terapêutica com modeladores do SRAA depois de 5 semanas do início do tratamento com CsA foi associada à preservação da função renal, ( $0,61 \pm 0,17$  mg/dL CsA+ENL,  $0,60 \pm 0,09$  mg/dL CsA+LOS,  $0,52 \pm 0,05$  mg/dL CsA+ESP,  $p < 0,05$  vs CsA9,  $p = ns$  vs CsA5), com efeito comparável entre os diferentes grupos de drogas. Entretanto, a co-administração de espironolactona promoveu melhor função renal final que a interrupção do

tratamento com ciclosporina ( $0,52\pm 0,05$  vs  $0,6\pm 0,08$ mg/dL; CsA+ESP vs CsAWT,  $p<0,05$ ) [Tabela 19, Gráfico 17].

**Tabela 19-** Função renal (creatinina sérica, mg/dL) dos animais experimentais, com e sem co-administração de agentes modeladores do sistema-renina-angiotensina-aldosterona, no modelo de nefropatia pela ciclosporina.

Grupo	N	Creatinina (mg/dL)		
		Basal	Semana 5	Semana 9
<b>CsA5</b>	06	$0,40\pm 0,12$	$0,65\pm 0,07$	-----
<b>CsA9</b>	05	$0,39\pm 0,17$	$0,62\pm 0,08$	$1,13\pm 0,17^{a,c,d,e,f}$
<b>CsAWT</b>	04	$0,35\pm 0,20$	$0,57\pm 0,11$	$0,63\pm 0,08^{b,f}$
<b>CsA+ENL</b>	05	$0,35\pm 0,15$	$0,48\pm 0,34$	$0,61\pm 0,17^b$
<b>CsA+LOS</b>	05	$0,39\pm 0,18$	$0,52\pm 0,23$	$0,60\pm 0,09^b$
<b>CsA+ESP</b>	05	$0,36\pm 0,25$	$0,45\pm 0,14$	$0,52\pm 0,05^{b,c}$

**a**  $p<0,05$  vs CsA5, **b**  $p<0,05$  vs CsA9, **c**  $p<0,05$  vs CsAWT, **d**  $p<0,05$  vs CsA+ENL, **e**  $p<0,05$  vs CsA+LOS, **f**  $p<0,05$  CsA+ESP



a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ENL, e p<0,05 vs CsA+LOS, f p<0,05 CsA+ESP

**Gráfico 17-** Variação da creatinina (mg/dL) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com modeladores do SRAA.

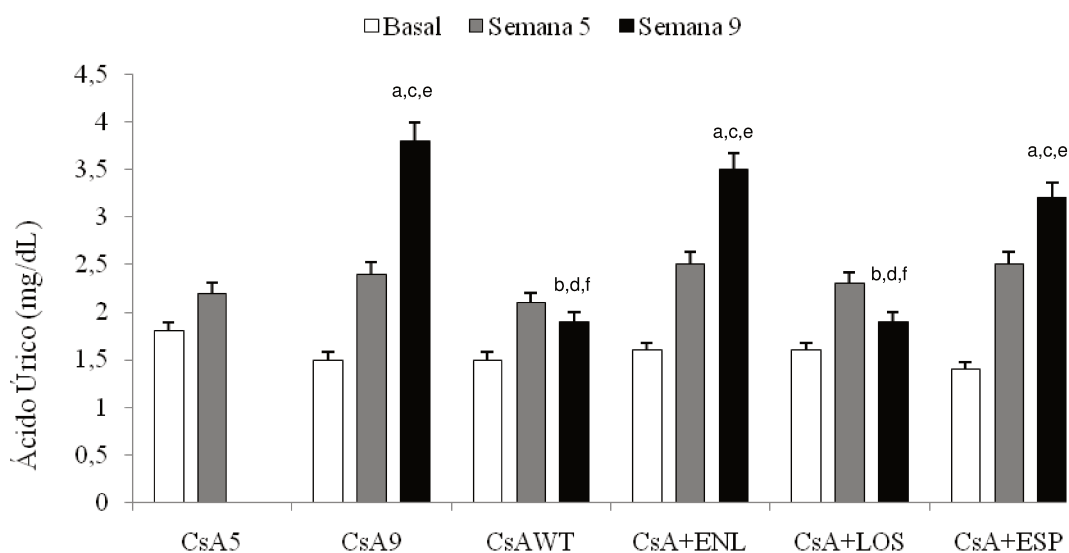
### 5.2.3- Níveis de ácido úrico nos grupos avaliados

O tratamento com CsA elevou os níveis de ácido úrico ( $2,2 \pm 0,2$  vs  $1,4 \pm 0,6$  mg/dL, CsA5 vs VEH,  $p < 0,05$ ), progressivamente com o tratamento prolongado ( $3,8 \pm 1,4$  vs  $2,2 \pm 0,2$  mg/dL, CsA9 vs CsA5,  $p < 0,05$ ). A interrupção do tratamento com CsA preveniu a progressão da hiperuricemia ( $1,9 \pm 0,1$  vs  $2,2 \pm 0,2$  mg/dL, CsAWT vs CsA5,  $p = ns$ ). A co-administração de losartan após o período inicial de tratamento com CsA promoveu redução dos níveis séricos de ácido úrico ( $1,9 \pm 0,3$  vs  $3,8 \pm 1,45$  mg/dL, CsA+LOS vs CsA9,  $p < 0,05$ ), efeito não observado com o uso de enalapril ou espironolactona ( $p = ns$  vs CsA9). [Tabela 20, Gráfico 18].

**Tabela 20-** Medida dos níveis séricos de ácido úrico (mg/dL) dos animais com e sem intervenção terapêutica com agentes modeladores de SRAA no modelo de nefropatia pela ciclosporina.

Ácido Úrico (mg/dL)				
Grupo	N	Basal	Semana 5	Semana 9
<b>CsA5</b>	06	1,8±0,3	2,2±0,2	-----
<b>CsA9</b>	05	1,5±0,4	2,4±0,3	3,8±1,4 <sup>a,c,e</sup>
<b>CsAWT</b>	04	1,5±0,2	2,1±0,2	1,9±0,1 <sup>b,d,f</sup>
<b>CsA+ENL</b>	05	1,6±0,5	2,45±0,2	3,5±1,2 <sup>a,c,e</sup>
<b>CsA+LOS</b>	05	1,6±0,3	2,3±0,4	1,9±0,3 <sup>b,d,f</sup>
<b>CsA+ESP</b>	05	1,4±0,5	2,5±0,4	3,2±1,65 <sup>a,c,e</sup>

**a** p<0,05 vs CsA5, **b** p<0,05 vs CsA9, **c** p<0,05 vs CsAWT, **d** p<0,05 vs CsA+ENL, **e** p<0,05 vs CsA+LOS, **f** p<0,05 CsA+ESP



**a** p<0,05 vs CsA5, **b** p<0,05 vs CsA9, **c** p<0,05 vs CsAWT, **d** p<0,05 vs CsA+ENL, **e** p<0,05 vs CsA+LOS, **f** p<0,05 CsA+ESP

**Gráfico 18-** Variação dos níveis de ácido úrico (mg/dL) dos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com modeladores do SRAA.

#### 5.2.4- Avaliação dos níveis de ciclosporina

Não houve alteração nos níveis sanguíneos de CsA, com a co-administração de bloqueadores do SRAA, nos diferentes períodos de estudo. [Tabela 21].

**Tabela 21-** Níveis sanguíneos de CsA (C0), em ng/mL, nas semanas 5 e 9 de tratamento nos diferentes grupos experimentais.

Grupo	C0 (ng/mL)	
	Semana 5	Semana 9
CsA5	1510,0±398,9	----
CsA9	1517,0±400,1	1543,3±410,1
CsAWT	1532,0±389,5	Não detectável
CsAENL	1770,3±349,5	1553,8±402,9
CsALOS	1706,2±329,5	1604,6±357,8
CsAESP	1580,3±345,1	1031,2±230,0

#### 5.2.5- Avaliação da pressão arterial

A pressão arterial de cauda (mmHg) manteve-se dentro dos parâmetros normais, em todos os grupos experimentais, nos períodos 5 e 9 semanas. A utilização de moduladores do SRAA, não alterou a pressão arterial de cauda dos animais experimentais. [Tabela 22].



**Tabela 22-** Variação da pressão arterial de cauda (PAC mmHg) dos animais tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes modeladores do SRAA.

Grupo	PAC (mmHg)		
	Basal	Semana 5	Semana 9
<b>CsA5</b>	115,0±10,1	114,6±9,9	-----
<b>CsA9</b>	115,7±8,2	114,8±8,2	115,2±7,9
<b>CsAWT</b>	115,0±12,0	116,3±11,8	115,4±11,0
<b>CsA+ENL</b>	112,5±5,9	110,45±7,0	108,4±8,0
<b>CsA+LOS</b>	110,8±8,3	112,3±7,8	109,3±6,8
<b>CsA+ESP</b>	111,45±5,6	110,4±6,6	109,7±8,0

#### 5.2.6- Análise histológica

Os animais tratados com ciclosporina apresentaram, na análise das colorações convencionais (PAS, Tricrômio de Masson e Sirius Red), áreas de fibrose em faixa, hialinose arteriolar e arteriosclerose. Nos animais em que foram co-administrados losartan, enalapril e espironolactona estas alterações foram menos intensas.

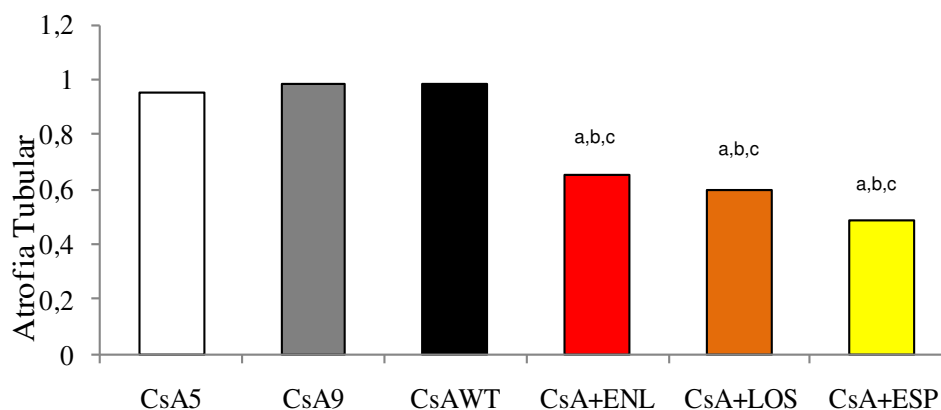
##### 5.2.6.1- Lesão túbulo intersticial

A análise morfométrica [escore semi-quantitativo de PAS], mostrou que ocorre desenvolvimento de lesão túbulo intersticial nos animais tratados com CsA, sem piora progressiva com a manutenção do tratamento (1,99±0,36 vs 2,13±0,37; CsA5 vs CsA9; p=ns). Os grupos tratados com enalapril, losartan e espironolactona apresentaram um quadro de atrofia tubular renal menos intensa, quando comparados com os grupos tratados com CsA independente de tempo de exposição à droga (0,65±0,19 e 0,60±0,08 e 0,49±0,20 vs 0,98±0,12; CsA+ENL e CsA+LOS e CsA+ESP vs CsA9, p<0,05). [Tabela 23, Gráfico 19].

**Tabela 23-** Acometimento túbulo intersticial nos diferentes grupos tratados.

Grupo	Córtex		Renal	
	Dilatação Tubular	Atrofia Tubular	Infiltrado Intersticial	Somatória Scores
VEH	0,0065±0,006	0,0067±0,006	0,0064±0,007	0,02±0,02
CsA5	0,69±0,12	0,95±0,12	0,35±0,12	1,99±0,36
CsA9	0,76±0,11	0,98±0,12	0,39±0,14	2,13±0,37
CsAWT	0,62±0,16	0,98±0,22	0,42±0,20	2,02±0,58
CsA+ENL	0,51±0,20	0,65±0,19 <sup>a,b,c</sup>	0,22±0,20	1,38±0,59
CsA+LOS	0,57±0,12	0,60±0,08 <sup>a,b,c</sup>	0,19±0,12	1,36±0,32
CsA+ESP	0,52±0,18	0,49±0,20 <sup>a,b,c</sup>	0,17±0,19	1,18±0,57

a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ENL, e p<0,05 vs CsA+LOS, f p<0,05 CsA+ESP



a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ENL, e p<0,05 vs CsA+LOS, f p<0,05 CsA+ESP

**Gráfico 19-** Acometimento túbulo intersticial (atrofia tubular) nos diferentes grupos tratados.

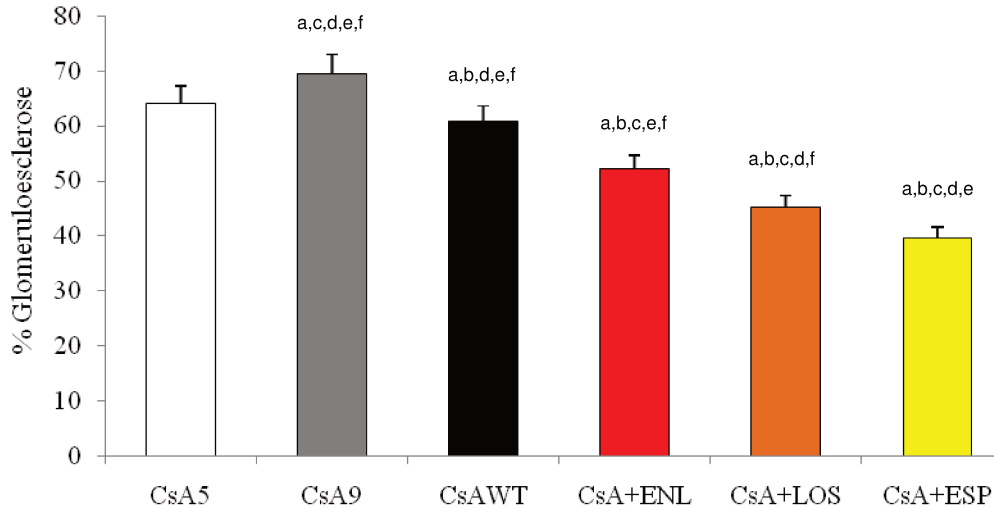
### 5.2.6.2- Lesão glomerular - glomeruloesclerose isquêmica

Glomeruloesclerose isquêmica foi observada com maior frequência nos animais tratados com CSA, aumentando com o maior tempo de exposição à droga (69,5±3,0 vs 64,1±2,1%, CsA9 vs CsA5, p<0,05). No grupo de animais em que a CsA foi suspensa na quinta semana de tratamento, houve recuperação parcial da lesão isquêmica (60,7±2,9 vs 69,5±3,0%, CsAWT vs CsA9, p<0,05), (60,7±2,9 vs 64,1±2,1%, CsAWT vs CsA5, p<0,05). Em todos os animais tratados, a co-administração de bloqueadores do SRAA cursou com a diminuição da glomeruloesclerose isquêmica, de forma mais acentuada no grupo que recebeu espironolactona em associação com CsA (39,7±2,0 vs 69,5±3,0%; CsA+ESP vs CsA9, p<0,05) [Tabela 24, Gráfico 20].

**Tabela 24-** Percentual de glomérulos esclerosados (%GE) nos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes modeladores do SRAA.

Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsAENL	CsALOS	CsAESP
%GE	64,1±2,1	69,5±3,0 <sup>a,c,d,e,f</sup>	60,7±2,9 <sup>a,b,d,e,f</sup>	52,1±2,0 <sup>a,b,c,e,f</sup>	45,2±3,0 <sup>a,b,c,d,f</sup>	39,7±2,0 <sup>a,b,c,d,e</sup>

**a** p<0,05 vs CsA5, **b** p<0,05 vs CsA9, **c** p<0,05 vs CsAWT, **d** p<0,05 vs CsA+ENL, **e** p<0,05 vs CsA+LOS, **f** p<0,05 CsA+ESP



a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ENL, e p<0,05 vs CsA+LOS, f p<0,05 CsA+ESP

**Gráfico 20-** Esclerose glomerular (%) nos animais, tratados ou não com CsA, sem e com intervenção terapêutica com agentes modeladores do SRAA.

## 5.2.7- Avaliação de Fibrose Intersticial

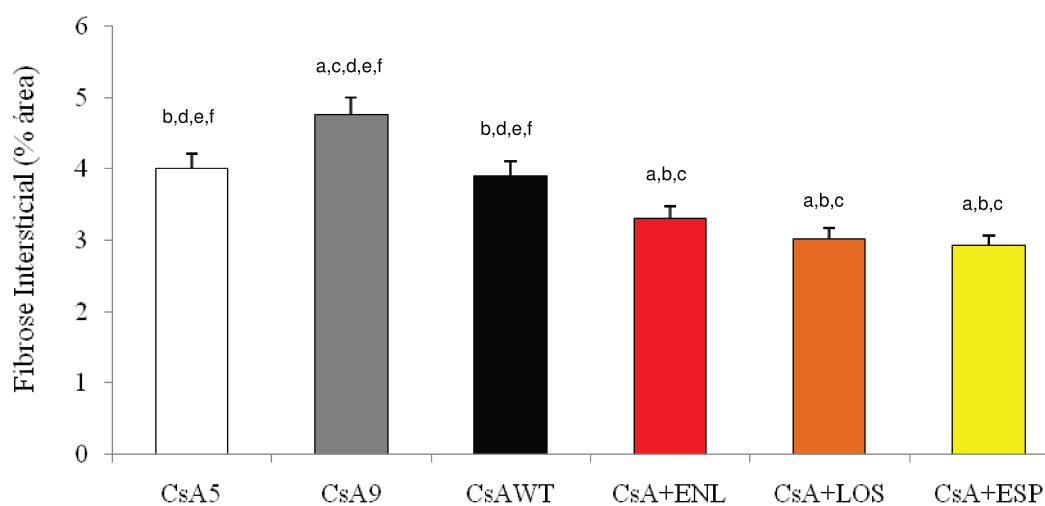
### 5.2.7.1- Tricômio de Masson

Nesta coloração observou-se extensas áreas de fibrose intersticial em faixa e atrofia tubular, mais intensas nos animais tratados por 9 semanas ( $4,8 \pm 0,2$  vs  $4,0 \pm 0,2\%$ , CsA9 vs CsA5, p<0,05). A interrupção da CsA cursou com estabilização da lesão ( $4,0 \pm 0,2$  vs  $3,9 \pm 0,1\%$ , CsA5 vs CsAWT, p=ns). Os grupos tratados com bloqueadores do SRAA cursaram com regressão da fibrose intersticial, com acometimento cortical significativamente inferior àquele observado no grupo CsA5, não havendo, entretanto, diferença entre os diferentes bloqueadores do SRAA empregados [Tabela 25, Gráfico 21].

**Tabela 25-** Fibrose intersticial (% área), nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ENL	CsA+LOS	CsA+ESP
% LC	4,0±0,2 <sup>b,d,e,f</sup>	4,8±0,2 <sup>a,c,d,e,f</sup>	3,9±0,1 <sup>b,d,e,f</sup>	3,3±0,1 <sup>a,b,c</sup>	3,0±0,2 <sup>a,b,c</sup>	2,9±0,2 <sup>a,b,c</sup>

a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ENL, e p<0,05 vs CsA+LOS, f p<0,05 CsA+ESP



a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ENL, e p<0,05 vs CsA+LOS, f p<0,05 CsA+ESP

**Gráfico 21-** Expressão de acometimento cortical % (LC) em animais dos diferentes grupos de tratamento.

#### 5.2.7.2- Picrossírius (Direct Red)

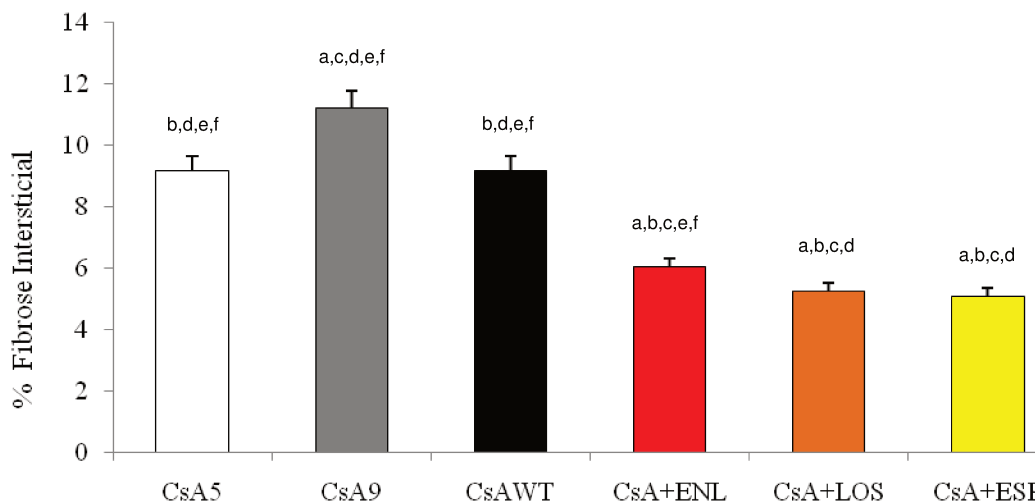
A avaliação da fibrose, pela coloração de Direct Red, assim como pelo Tricrômio de Masson, mostrou aumento progressivo da lesão intersticial com tratamento prolongado com CsA (11,2±0,4 vs 9,2±0,6%, CsA9 vs 5, p<0,05) e estabilização da lesão com a suspensão da droga (9,2±0,9 vs 9,2±0,6%, CsAWT

vs CsA5, p=ns). Nos animais tratados com enalapril, losartan ou espironolactona, ocorreu redução significativa da área de fibrose, sugerindo regressão da lesão ( $p < 0,05$  vs CsA5), com efeito, mais acentuado nos animais tratados com losartan e espironolactona [Tabela 26, Gráfico 22].

**Tabela 26-** Fibrose intersticial (% área Direct red+) em córtex renal dos animais dos diferentes grupos de tratamento.

Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ENL	CsA+LOS	CsA+ESP
% FI	9,2±0,6 <sup>b,d,e,f</sup>	11,2±0,4 <sup>a,c,d,e,f</sup>	9,2±0,9 <sup>b,d,e,f</sup>	6,0±0,15 <sup>a,b,c,e,f</sup>	5,3±0,4 <sup>a,b,c,d</sup>	5,1±0,3 <sup>a,b,c,d</sup>

a  $p < 0,05$  vs CsA5, b  $p < 0,05$  vs CsA9, c  $p < 0,05$  vs CsAWT, d  $p < 0,05$  vs CsA+ENL, e  $p < 0,05$  vs CsA+LOS, f  $p < 0,05$  CsA+ESP



a  $p < 0,05$  vs CsA5, b  $p < 0,05$  vs CsA9, c  $p < 0,05$  vs CsAWT, d  $p < 0,05$  vs CsA+ENL, e  $p < 0,05$  vs CsA+LOS, f  $p < 0,05$  CsA+ESP

**Gráfico 22-** Fibrose intersticial (% área cortical) dos animais dos diferentes grupos de tratamento.

## 5.2.8- Avaliação de inflamação intersticial

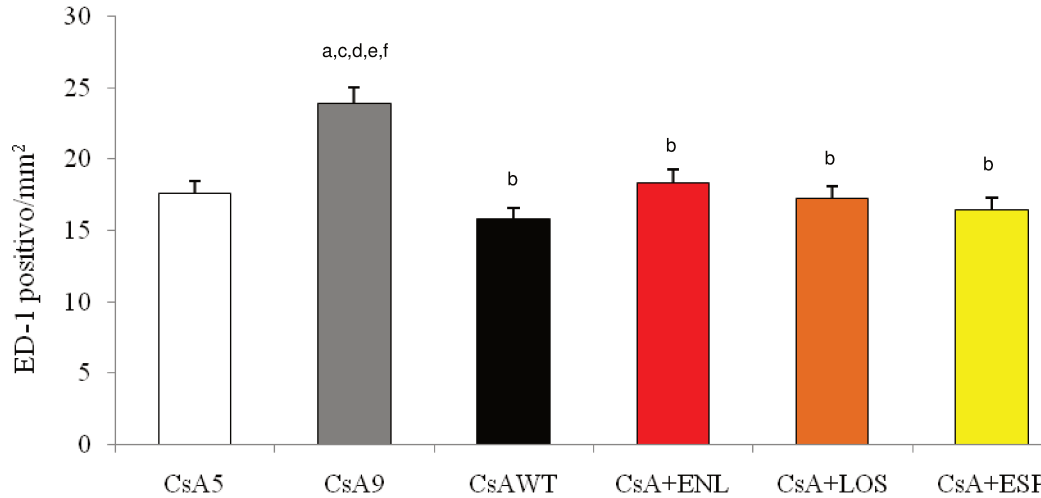
### 5.2.8.1- Infiltrado de macrófagos

Observou-se um aumento no infiltrado intersticial de macrófagos nos animais tratados com CsA, com aumento significativo com maior tempo de exposição à droga ( $23,8 \pm 1,7$  vs  $17,6 \pm 2,25$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA9 vs CsA5,  $p < 0,05$ ). A interrupção da administração de CsA (CsAWT) ou a co-administração de bloqueadores do SRAA (CsA+ENL, CsA+LOS e CsA+ESP) cursou com a estabilização do quadro inflamatório intersticial, comparável ao tratamento de 5 semanas ( $p = ns$  vs CsA5). Entretanto, a avaliação de macrófagos glomerulares mostrou que, enquanto a suspensão da CsA estabilizava a lesão (CsAWT vs CsA5,  $p = ns$ ), o uso de bloqueadores do SRAA levou à regressão do infiltrado de macrófagos glomerulares ( $p < 0,05$  vs CsA5). [Tabela 27, Gráfico 23].

**Tabela 27-** Infiltrado de macrófagos (células ED-1+/mm<sup>2</sup>) em interstício cortical e glomérulos dos animais dos diferentes grupos de tratamento.

Infiltrado de Macrófagos		
Grupo	Intersticial	Glomerular
CsA5	$17,6 \pm 2,25$	$3,9 \pm 1,35$
CsA9	$23,8 \pm 1,7^{a,c,d,e,f}$	$4,5 \pm 1,3$
CsAWT	$15,8 \pm 2,0^b$	$3,6 \pm 1,3$
CsA+ENL	$18,3 \pm 2,45^b$	$3,2 \pm 0,1^{a,b,c}$
CsA+LOS	$17,2 \pm 1,2^b$	$3,0 \pm 0,5^{a,b,c}$
CsA+ESP	$16,45 \pm 2,0^b$	$2,9 \pm 0,9^{a,b,c}$

**a**  $p < 0,05$  vs CsA5, **b**  $p < 0,05$  vs CsA9, **c**  $p < 0,05$  vs CsAWT, **d**  $p < 0,05$  vs CsA+ENL, **e**  $p < 0,05$  vs CsA+LOS, **f**  $p < 0,05$  vs CsA+ESP



a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ENL, e p<0,05 vs CsA+LOS, f p<0,05 CsA+ESP

**Gráfico 23-** Infiltrado intersticial de macrófagos (células ED-1 positivas/mm<sup>2</sup>) em córtex renal, dos animais dos diferentes grupos de tratamento.

#### 5.2.8.2- Expressão de osteopontina em região cortical

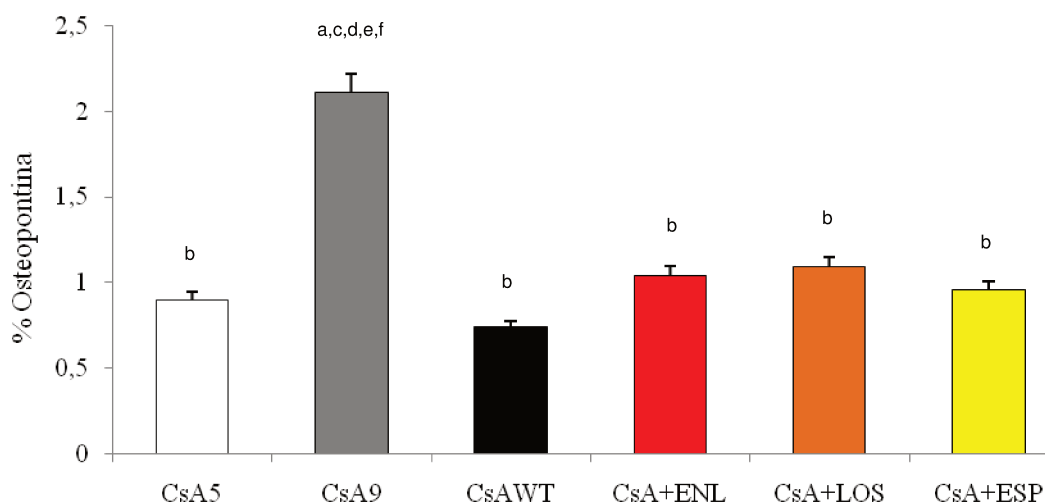
Observou-se um aumento significativo da expressão de osteopontina nos animais tratados com CsA, com aumento progressivo com o tempo de exposição à droga ( $2,1 \pm 0,9$  vs  $0,9 \pm 0,6\%$ , CsA9 vs CsA5, p<0,05). A suspensão do tratamento com CsA cursou com estabilização da expressão de OPN ( $0,7 \pm 0,4$  vs  $0,9 \pm 0,6\%$ , CsAWT vs CsA5, p<0,05), semelhante à observada nos grupos tratados com bloqueadores do SRAA ( $1,0 \pm 0,2$  CsAENL,  $1,0 \pm 0,1\%$  CsALOS e  $0,9 \pm 0,5\%$  CsAESP, p=ns vs CsA5). Não houve diferença na expressão de OPN com os diferentes tratamentos. [Tabela 28, Gráfico 24].



**Tabela 28-** Expressão de Osteopontina (% área) em região cortical renal dos animais dos diferentes grupos de tratamento.

Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ENL	CsA+LOS	CsA+ESP
% OPN	0,9±0,6 <sup>b</sup>	2,1±0,9 <sup>a,c,d,e,f</sup>	0,7±0,3 <sup>b</sup>	1,0±0,2 <sup>b</sup>	1,1±0,1 <sup>b</sup>	0,6±0,1 <sup>b</sup>

a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ENL, e p<0,05 vs CsA+LOS, f p<0,05 CsA+ESP



a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ENL, e p<0,05 vs CsA+LOS, f p<0,05 CsA+ESP

**Gráfico 24-** Expressão de osteopontina (% área) em região cortical renal dos animais dos diferentes grupos de tratamento.

#### 5.2.9- Avaliação de lesão microvascular - hialinose de arteríola aferente glomerular

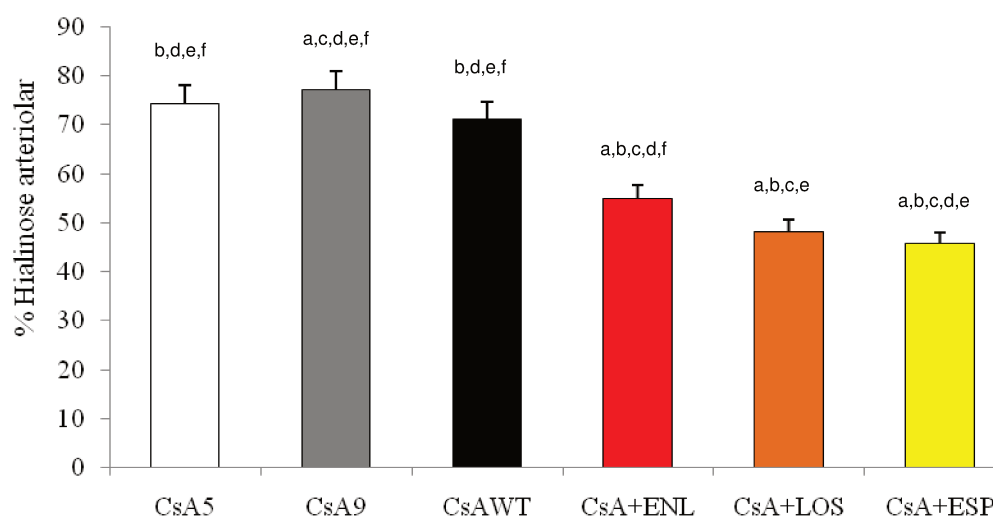
Hialinose arteriolar foi frequente nos animais tratados com CsA, independentemente da pressão arterial (77,7±2,45 vs 74,3±1,15%, CsA9 vs CsA5, p<0,05). A interrupção da CsA na semana 5 levou a estabilização da hialinose

arteriolar ( $74,3 \pm 1,15$  vs  $72,1 \pm 0,9\%$ , CsA5 vs CsAWT,  $p < 0,05$ ). A co-administração de enalapril ( $54,9 \pm 3,5\%$ ,  $p < 0,05$  vs CsA5), losartan ( $48,2 \pm 2,7\%$ ,  $p < 0,05$  vs CsA5) ou espironolactona ( $45,7 \pm 3,8\%$ ,  $p < 0,05$  vs CsA5) promoveu redução significativa da hialinose arteriolar, mais acentuada nos animais tratados com losartan ( $p < 0,05$  vs CsA+ENL) ou espironolactona ( $p < 0,05$  vs CsA+ESP), sugerindo controle do remodelamento vascular pelo bloqueio do SRAA. [Tabela 29, Gráfico 25].

**Tabela 29-** Hialinose arteriolar aferente (%) nos diferentes grupos de estudo

Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ENL	CsA+LOS	CsA+ESP
%Hialinose	$74,3 \pm 1,15^{b,d,e,f}$	$77,7 \pm 2,45^{a,c,d,e,f}$	$71,1 \pm 0,9^{b,d,e,f}$	$54,9 \pm 3,5^{a,b,c,f}$	$48,2 \pm 2,7^{a,b,c,e}$	$45,7 \pm 3,8^{a,b,c,d,e}$

**a**  $p < 0,05$  vs CsA5, **b**  $p < 0,05$  vs CsA9, **c**  $p < 0,05$  vs CsAWT, **d**  $p < 0,05$  vs CsA+ENL, **e**  $p < 0,05$  vs CsA+LOS, **f**  $p < 0,05$  CsA+ESP



**a**  $p < 0,05$  vs CsA5, **b**  $p < 0,05$  vs CsA9, **c**  $p < 0,05$  vs CsAWT, **d**  $p < 0,05$  vs CsA+ENL, **e**  $p < 0,05$  vs CsA+LOS, **f**  $p < 0,05$  CsA+ESP

**Gráfico 25-** Hialinose de arterióla aferente glomerular (%), nos diferentes grupos de estudo, com utilização de moduladores do SRAA.

## 5.2.10- Avaliação de estresse oxidativo

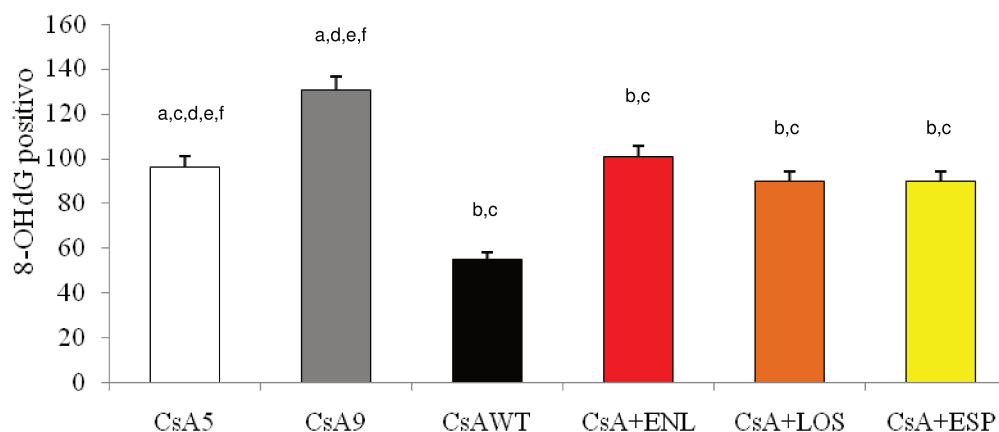
### 5.2.10.1- Detecção de dano oxidativo ao DNA por 8-OHdG

A marcação cortical dos núcleos 8-OHdG positivos foi significativamente aumentada nos animais tratados cronicamente com CsA ( $130,3 \pm 21,95$  vs  $96,3 \pm 12,7$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA9 vs CsA5,  $p < 0,05$ ). A suspensão do tratamento com CsA promoveu reparo do DNA durante o período de acompanhamento de 4 semanas ( $96,3 \pm 12,7$  vs  $55,5 \pm 12,6$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA5 vs CsAWT,  $p < 0,05$ ). O tratamento com enalapril ( $100,0 \pm 5,7$ , CsA+ENL vs CsA9,  $p < 0,05$ ), losartan ( $89,8 \pm 8,0$  CsA+LOS vs CsA9,  $p < 0,05$ ) ou espironolactona ( $89,7 \pm 9,3$ , CsA+ESP vs CsA9,  $p < 0,05$ ) evitou a progressão da lesão por estresse oxidativo, mesmo com manutenção da administração de CsA. Este efeito foi mais evidente nos grupos tratados com losartan ou espironolactona. [Tabela 30, Gráfico 26].

**Tabela 30-** Detecção de dano oxidativo ao DNA (8-OHdG+/mm<sup>2</sup>) em córtex renal dos diferentes grupos de tratamento.

Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ENL	CsA+LOS	CsA+ESP
<b>8OHdG</b>	$96,3 \pm 12,7^{b,c}$	$130,3 \pm 21,9^{a,c,d,e,f}$	$55,2 \pm 12,6^{a,d,e,f}$	$100,0 \pm 5,7^{b,c}$	$89,8 \pm 8,0^{b,c}$	$89,7 \pm 9,3^{b,c}$

a  $p < 0,05$  vs CsA5, b  $p < 0,05$  vs CsA9, c  $p < 0,05$  vs CsAWT, d  $p < 0,05$  vs CsA+ENL, e  $p < 0,05$  vs CsA+LOS, f  $p < 0,05$  CsA+ESP



**a**  $p < 0,05$  vs CsA5, **b**  $p < 0,05$  vs CsA9, **c**  $p < 0,05$  vs CsAWT, **d**  $p < 0,05$  vs CsA+ENL, **e**  $p < 0,05$  vs CsA+LOS, **f**  $p < 0,05$  vs CsA+ESP

**Gráfico 26-** Dano oxidativo ao DNA (8OHdG+/mm<sup>2</sup>) nos grupos de estudo.

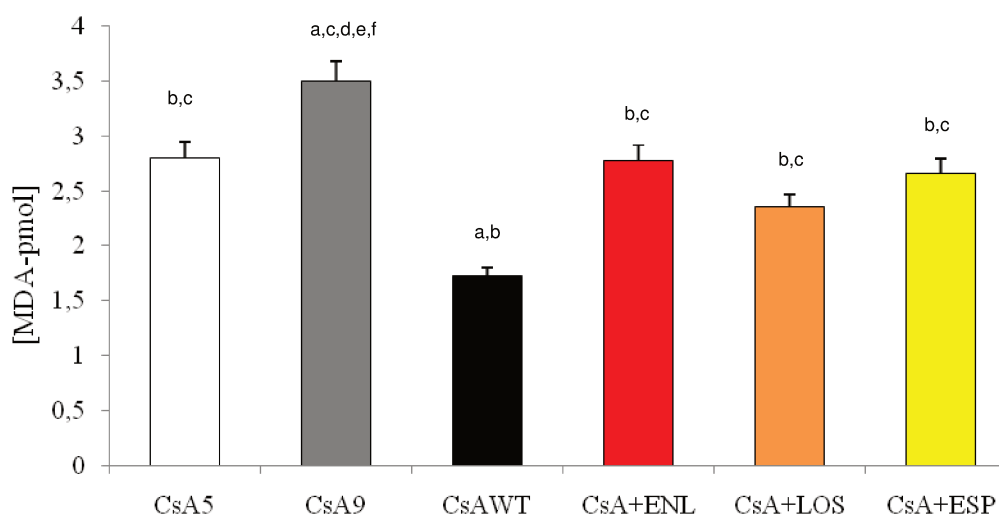
#### 5.2.10.2- Quantificação de peroxidação lipídica através da concentração de malonaldeído (método TBARS)

O tratamento com ciclosporina causou dano tecidual mediado por espécies reativas de oxigênio ( $2,8 \pm 0,7$  vs  $1,5 \pm 0,45 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ , CsA5 vs VEH,  $p < 0,05$ ), agravada pela exposição prolongada à CsA ( $3,5 \pm 0,6$  vs  $2,8 \pm 0,7 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ , CsA9 vs CsA5,  $p < 0,05$ ). A interrupção da CsA cursou com redução significativa dos níveis de TBARS, sugerindo recuperação tecidual com a interrupção do estímulo ( $1,7 \pm 0,2$  vs  $2,8 \pm 0,7 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ , CsAWT vs CsA5,  $p < 0,05$ ). A co-administração de bloqueadores do SRRRA levou à estabilização da lesão tecidual ( $p = \text{ns}$  vs CsA5), porém menos eficaz que no grupo onde a CsA foi retirada. [Tabela 31, Gráfico 27].

**Tabela 31-** Detecção de malonaldeído em homogenato de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais tratados com bloqueadores do SRAA.

Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ENL	CsA+LOS	CsA+ESP
[MDA]	2,8±0,7 <sup>b,c</sup>	3,5±0,6 <sup>a,c,d,e,f</sup>	1,7±0,2 <sup>a,b</sup>	2,8±0,3 <sup>b,c</sup>	2,35±0,3 <sup>b,c</sup>	2,7 ±0,35 <sup>b,c</sup>

a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ENL, e p<0,05 vs CsA+LOS, f p<0,05 CsA+ESP



a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ENL, e p<0,05 vs CsA+LOS, f p<0,05 CsA+ESP

**Gráfico 27-** Detecção de malonaldeído em homogenato de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais tratados com bloqueadores do SRAA.

## 5.2.11- Avaliação de apoptose

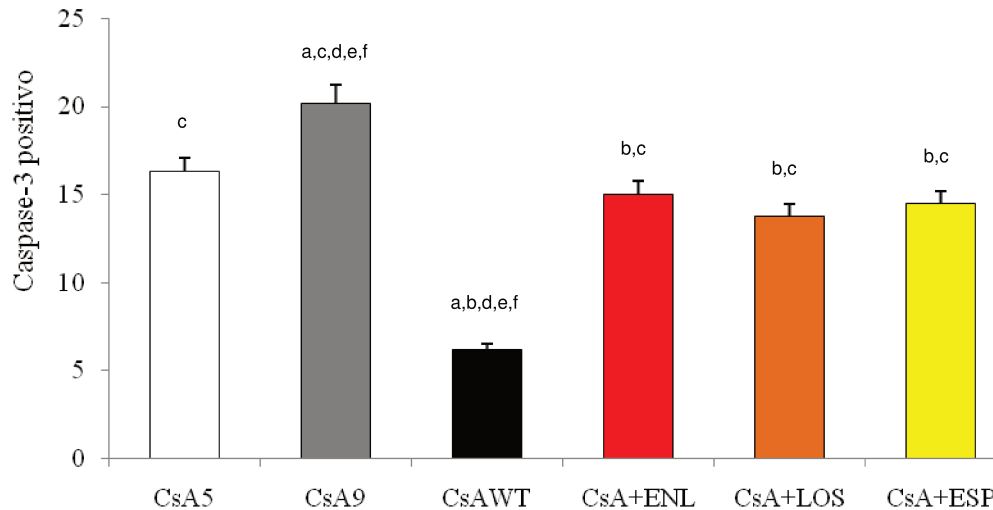
### 5.2.11.1- Detecção de caspase-3 em córtex renal

O tratamento com CsA cursou com aumento progressivo de apoptose ( $20,2\pm 4,5$  vs  $16,4\pm 3,9$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA9 vs CsA5,  $p<0,05$ ). A interrupção da CsA resultou em redução significativa da apoptose ( $6,2\pm 2,1$  vs  $20,2\pm 4,5$  cel/mm<sup>2</sup>, CsAWT vs CsA5,  $p<0,05$ ), enquanto a co-administração de enalapril ( $15,0\pm 2,2$  cel/mm<sup>2</sup> CsA+ENL vs CsA5,  $p=ns$ ), losartan ( $13,8\pm 3,4$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA+LOS vs CsA5,  $p=ns$ ) ou espironolactona ( $14,5\pm 3,0$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA+ESP vs CsA5,  $p=ns$ ), manteve o grau de apoptose comparável ao observado com 5 semanas de uso de ciclosporina. Não houve diferença entre os diferentes grupos de drogas. [Tabela 32, Gráfico 28].

**Tabela 32-** Detecção de células caspase-3 positivas em camada cortical dos fragmentos de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ENL	CsA+LOS	CsA+ESP
<b>Caspase-3</b>	$16,4\pm 3,9^c$	$20,2\pm 4,5^{a,c,d,e,f}$	$6,2\pm 2,1^{a,b,d,e,f}$	$15,0\pm 2,2^{b,c}$	$13,8\pm 3,4^{b,c}$	$14,5\pm 3,0^{b,c}$

**a**  $p<0,05$  vs CsA5, **b**  $p<0,05$  vs CsA9, **c**  $p<0,05$  vs CsAWT, **d**  $p<0,05$  vs CsA+ENL, **e**  $p<0,05$  vs CsA+LOS, **f**  $p<0,05$  CsA+ESP



**a** p<0,05 vs CsA5, **b** p<0,05 vs CsA9, **c** p<0,05 vs CsAWT, **d** p<0,05 vs CsA+ENL, **e** p<0,05 vs CsA+LOS, **f** p<0,05 CsA+ESP

**Gráfico 28-** Detecção de células caspase-3 positivas em camada cortical dos fragmentos de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.

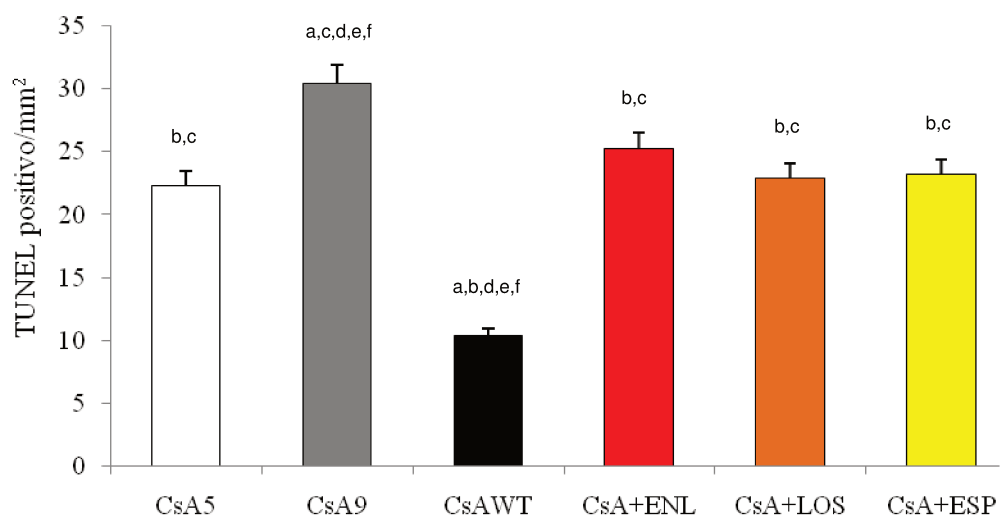
#### 5.2.11.2- Detecção de células tubulares positivas para a reação de TUNEL

O número de células tubulares TUNEL+ aumentou progressivamente nos animais tratados com CsA ( $30,4 \pm 3,7$  vs  $22,3 \pm 4,2$  cel/mm<sup>2</sup>, CsA9 vs CsA5, p<0,05). A suspensão da CsA levou a redução significativa da apoptose de células tubulares, sugerindo reversão da lesão com a interrupção do estímulo lesivo ( $10,4 \pm 1,7$  vs  $25,9 \pm 2,2$  cel/mm<sup>2</sup>, CsAWT vs CsA5, p<0,05). O tratamento com enalapril ( $25,2 \pm 1,9$  cel/mm<sup>2</sup>), losartan ( $22,9 \pm 4,8$  cel/mm<sup>2</sup>) ou espironolactona ( $23,2 \pm 1,9$  cel/mm<sup>2</sup>), impediu a progressão da apoptose (p<0,05 vs CsA9 e p=ns vs CsA5), porém foi menos eficaz que a suspensão da droga (p<0,05 vs CsAWT). [Tabela 33, Gráfico 29].

**Tabela 33-** Detecção de células positivas para reação de TUNEL em camada cortical dos fragmentos de biopsia renal dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	CsA5	CsA9	CsAWT	CsA+ENL	CsA+LOS	CsA+ESP
TUNEL	22,3±4,2 <sup>b,c</sup>	30,4±3,7 <sup>a,c,d,e,f</sup>	10,4±1,7 <sup>a,b,d,e,f</sup>	25,2±1,9 <sup>b,c</sup>	22,9±4,8 <sup>b,c</sup>	23,2±1,9 <sup>b,c</sup>

a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ENL, e p<0,05 vs CsA+LOS, f p<0,05 CsA+ESP



a p<0,05 vs CsA5, b p<0,05 vs CsA9, c p<0,05 vs CsAWT, d p<0,05 vs CsA+ENL, e p<0,05 vs CsA+LOS, f p<0,05 CsA+ESP

**Gráfico 29-** Apoptose (células TUNEL+) em células tubulares de cortex renal nos diferentes grupos.



**Tabela 34-** Resumo dos resultados da intervenção com moduladores de SRAA no modelo de nefropatia pela ciclosporina.

	<b>CsA5</b>	<b>CsA9</b>	<b>CsAWT</b>	<b>CsAENL</b>	<b>CsALOS</b>	<b>CsAESP</b>
<b>Função renal</b>	↔	↓↓	↔	↔	↔	↔
<b>Morfologia</b>						
Lesão tubulo intersticial	↔	↑↑↑	↔	↓	↓	↓↓
Glomeruloesclerose	↔	↑↑	↔	↓	↓	↓↓
<b>Fibrose intersticial</b>						
Tricrômio de Masson	↔	↑↑↑	↔	↓	↓	↓
Sirius Red	↔	↑↑↑	↔	↓	↓	↓
<b>Inflamação</b>						
Macrófagos	↔	↑↑↑	↔	↔	↔	↔
Osteopontina	↔	↑↑↑	↔	↔	↔	↔
<b>Apoptose</b>						
Caspase 3	↔	↑↑	↓↓	↔	↔	↔
Tunel	↔	↑↑	↓↓	↔	↔	↔
<b>Vasculopatia</b>						
Hialinose arteriolar	↔	↑↑	↔	↓	↓↓	↓↓
<b>Estresse oxidativo</b>						
8-OHdG	↔	↑↑↑	↓↓	↔	↔	↔
TBARS	↔	↑↑↑	↓↓	↔	↔	↔

Para comparação, o grupo CsA5 foi considerado como padrão de lesão estabelecida.

↔: estabilização, ↑: aumento, ↓: redução.



## **6- DISCUSSÃO**



O desenvolvimento de um modelo de nefrotoxicidade crônica por ciclosporina, em ratos, permitiu a compreensão de possíveis mecanismos da gênese desta lesão. Esse modelo caracteriza-se por utilizar doses de ciclosporina capazes de reproduzir a disfunção renal e as lesões histológicas vasculares e túbulo-intersticiais observadas em humanos, tornando-se um instrumento útil para o estudo da toxicidade renal pela CsA [Elzinga et al, 1993].

A nefrotoxicidade crônica da ciclosporina caracteriza-se, do ponto de vista histológico, pelo desenvolvimento de fibrose intersticial em faixa, atrofia tubular, hialinose de arteríolas aferentes glomerulares e glomeruloesclerose, ou seja, um quadro histológico compatível com doença isquêmica renal, por comprometimento de microvasculatura, levando a uma redução progressiva da taxa de filtração glomerular [Myers e Newton, 1991]. Sua etiopatogenia parece estar relacionada tanto à isquemia mantida por vasoconstrição pré-glomerular como pela ativação direta de fatores pró-fibrogênicos em tecido renal [Shehata et al, 1995, Shihab et al 1999; Shihab et al, 2000].

A melhor compreensão das vias regulatórias e dos mecanismos inflamatórios envolvidos na nefrotoxicidade pela CsA permite o desenvolvimento de estratégias experimentais capazes de bloquear ou modular estas vias. Estudos prévios utilizando bloqueadores do SRAA, moduladores da síntese do óxido nítrico, drogas com propriedades anti-proliferativas e anti-tumorais [Bobadilla et al, 2007] e agentes hipouricemiantes [Mazali et al, in press] mostraram-se capazes de prevenir o desenvolvimento da nefrotoxicidade pela CsA, pelo menos parcialmente. Entretanto, o efeito destas abordagens na nefropatia estabelecida ainda é incerto.

O modelo animal de nefrotoxicidade pela ciclosporina emprega injeções diárias, na dose de 15mg/Kg/dia, por via subcutânea [Hunley et al, 1995; Pichler et al, 1995; Assis et al, 1997; Thomas et al, 1998; Shihab et al, 2001; Kang et al, 2001]. A utilização de dieta restrita em sal facilita o desenvolvimento

das alterações histológicas características da nefrotoxicidade crônica por ciclosporina [Elzinga et al, 1993], não reprodutíveis em presença de dieta normal em sódio [Bennett et al, 1996].

No presente estudo, utilizamos como dieta restrita em sódio a proteína texturizada de soja. Esta dieta, à base de flavonóides, (fitoestrógenos) ajuda a manter os níveis de triglicérides e de ácido úrico dentro da faixa de normalidade em animais espontaneamente hipertensos [Bhatena et al, 2002], além de diminuir a progressão da lesão glomerular em ratos com obesidade induzida [Maddox et al, 2002; Trujillo et al, 2005]. Dietas ricas em flavonóides inibem a xantina oxidase, e diminuem a síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS) contribuindo, desta maneira, para a redução de estresse oxidativo, inflamação e arteriosclerose [Silva et al, 2004].

A nefrotoxicidade pela ciclosporina foi avaliada ao final de 2 períodos, de 5 e 9 semanas, em animais tratados com CsA (15mg/Kg/dia) subcutânea em vigência de dieta hipossódica. O modelo de 5 semanas apresenta alterações clássicas da nefrotoxicidade pela ciclosporina, e foi utilizado como controle de doença. O modelo de tratamento prolongado, por 9 semanas, reproduzindo as alterações funcionais e histológicas da progressão da nefropatia. Após o insulto inicial, ocorre uma deterioração progressiva da função renal, caracterizada por alterações da hemodinâmica renal e inflamação local. Além disso, fenômenos inflamatórios, citocinas e fatores de crescimento fazem parte dos mecanismos de propagação da lesão.

Os animais tratados com CsA por 9 semanas apresentaram alterações histológicas e funcionais mais exuberantes quando comparados com o grupo CsA5, confirmando que o tempo de exposição à CsA é primordial para a intensidade da lesão renal.

Um terceiro grupo experimental foi incluído para avaliar o efeito da interrupção do tratamento com ciclosporina, ao final de 5 semanas, porém com acompanhamento por período prolongado (9 semanas), tratado apenas com

veículo. O objetivo deste grupo era avaliar a evolução das lesões preexistentes após a interrupção do estímulo lesivo, a ciclosporina. Nestes animais (CsAWT), a retirada da CsA cursou com recuperação do peso dos animais e melhora significativa da creatinina sérica, quando comparado com o grupo que recebeu CsA por 9 semanas. Os níveis de ácido úrico, nos animais onde a CsA foi interrompida, foram comparáveis aos dos animais tratados por 5 semanas, o que pode ser consequência tanto da recuperação da taxa de filtração glomerular como da redução da reabsorção tubular de urato induzida pela ciclosporina [Marcén et al, 1996].

A suspensão da administração de CsA na quinta semana de estudo cursou com estabilização da reação inflamatória e da fibrose intersticial, comprovadas pelas colorações de Tricrômio de Masson, Sirius Red, imunohistoquímica para macrófagos e osteopontina.

A estabilização, mas não a reversão da lesão observadas com a interrupção da ciclosporina pode ser explicada pela manutenção do processo inflamatório, que uma vez iniciado, desencadeia a fibrogênese, com duas etapas fundamentais. A primeira consiste na migração, proliferação, diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, e do processo de transdiferenciação a partir de células tubulares renais que, ao modificam seu fenótipo preservam energia e reduzem a necessidade de oxigênio em situações de hipóxia tecidual [Semenza et al, 2000; Gabbini et al, 2003; Nangaku et al, 2007; Higgins et al, 2008]. A segunda caracteriza-se pela excessiva produção e deposição de matriz extracelular preenchendo desordenadamente o espaço intersticial. Ambas as etapas são desencadeadas e estimuladas pela presença de citocinas fibrogênicas como TGF- $\beta$ , PDGF, TNF- $\alpha$ , interleucina-1, OPN e angiotensina-II produzidas no local do processo inflamatório [Krum et al, 2007]. Assim, a fibrose intersticial, presente neste modelo experimental, depende da ativação, proliferação, migração e diferenciação de vários tipos celulares incluindo principalmente fibroblastos, miofibroblastos, macrófagos e células epiteliais dos túbulos renais. A descontinuação da CsA leva a uma menor exposição das células epiteliais

tubulares a hipóxia, inibindo dessa maneira a proliferação e transdiferenciação celular, bem como a síntese do colágeno.

A fibrose intersticial cursa com redução de número de capilares peritubulares que, associada à isquemia tecidual resultante da arteriopatía aferente glomerular, levam à redução da perfusão de oxigênio tecidual, resultando na liberação do fator de indução de hipóxia (HIF-1) em tecido renal. O HIF-1 modula a expressão de genes envolvidos na angiogênese, eritropoese, proliferação celular, remodelamento vascular e resposta vasomotora, além de transição epitélio-mesenquimal. O HIF-1 ativa a expressão do gene de VEGF em células tubulares renais, em resposta a hipóxia crônica no modelo de nefrotoxicidade por CsA, promovendo remodelamento vascular e angiogênese [Higgins et al, 2008; Nangaku et al, 2007].

A arteriopatía, quantificada através da porcentagem de hialinose arteriolar, foi observada em todos os animais tratados com ciclosporina, e mais exuberante nos animais tratados por 9 semanas. A célula muscular lisa da arteríola aferente, evidenciada na coloração de PAS, apresenta circunferência espessa, típica de lesão vascular por inibidor de calcineurina. A patogênese da arteriopatía não é bem definida, mas acredita-se que o SRRA participe ativamente do remodelamento vascular. No presente estudo, observamos uma redução significativa de hialinose arteriolar após a suspensão do uso da ciclosporina, comparado ao grupo cronicamente tratado. Resultados semelhantes haviam sido relatados por Franceschini et al (1998), após a suspensão da ciclosporina por um período de 8 semanas.

A estabilização da lesão vascular e da inflamação, caracterizada pelo infiltrado de macrófagos, células ricas em espécies reativas de oxigênio, interferem diretamente em outro mediador, o estresse oxidativo [Ghee et al, 2008], que no presente estudo foi avaliado pela imunohistoquímica para 8-OHdG e pela quantificação de TBARS. A suspensão da ciclosporina cursou com estabilização do infiltrado intersticial de macrófagos, promoveu redução do estresse oxidativo,

com reparo no DNA, quantificado através da imunohistoquímica para a base modificada 8-OHdG. A administração de CsA induz a peroxidação lipídica, com aumento de formação de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) [Galletti et al, 2005]. A suspensão de CsA reduziu significativamente os níveis de malonaldeído, resultado de uma menor produção de radicais livres e, conseqüente redução da peroxidação lipídica.

A maioria das drogas nefrotóxicas, é excretada pelos rins e, na presença de transportadores celulares específicos, acumula-se nas células tubulares renais, o que não contribui para a sua eficácia terapêutica, mas favorece o processo apoptótico que regula ou inibe os transportadores ou receptores de drogas nos rins [Servais et al, 2008]. Na progressão da doença renal a apoptose de células tubulares precede alterações morfológicas como atrofia tubular, dilatação tubular e inflamação perivascular. Alguns autores têm mostrado que a diminuição do número de células está relacionada com a ativação de genes de apoptose e, com a expressão de fatores pró-fibróticos em tecido renal. A ciclosporina induz apoptose por via mitocondrial, ao causar ativação da caspase-9 que ao se clivar em caspase-3, migra para o interior da mitocôndria promovendo a morte celular [Park et al, 2010]. No presente estudo o número de células TUNEL-positivas e a expressão de caspase-3 aumentam após o tratamento com o inibidor de calcineurina. A suspensão da droga após 5 semanas de tratamento reduziu significativamente a quantidade de células em apoptose.

Dessa maneira, a nefrotoxicidade por CsA pode ser estabilizada com a descontinuação da droga por longo período de tempo. Entretanto, a aplicação clínica desta estratégia é controversa, em indivíduos transplantados, pelo risco imunológico da redução da imunossupressão, com desenvolvimento de rejeição aguda [Franceschini et al, 1998]. Quando a retirada da ciclosporina não é possível, a modulação das vias efetoras da nefrotoxicidade torna-se uma alternativa viável, estabilizando ou revertendo o quadro funcional e histológico da nefropatia pela CsA. Dentre os moduladores de nefrotoxicidade, duas vias podem sofrer interferência farmacológica: a via do ácido úrico e o sistema renina angiotensina aldosterona.



Os modelos experimentais de hiperuricemia e de nefrotoxicidade pela ciclosporina apresentam em comum achados histológicos de nefropatia isquêmica. No modelo experimental clássico de hiperuricemia, ratos Sprague-Dawley são tratados com dieta hipossódica e ácido oxônico (inibidor da uricase hepática) durante sete semanas, com o desenvolvimento de glomeruloesclerose, fibrose intersticial e arteriopatias, sugestivos de doença renal isquêmica [Mazzali et al, 2001a; Mazzali, et al 2002b]. O ácido úrico também atua como mediador de disfunção endotelial e inflamação, agravando a doença vascular renal [Kanellis & Kang, 2005].

Estudos prévios demonstraram que a hiperuricemia agrava a nefrotoxicidade experimental pela ciclosporina [Mazzali et al, 2001], e também que o controle da hiperuricemia previne o desenvolvimento de nefropatia pela ciclosporina [Mazali et al, in press]. Assim, a primeira hipótese deste estudo foi que a redução dos níveis séricos de ácido úrico levaria à estabilização ou reversão da nefropatia estabelecida pela ciclosporina. Para tanto, os animais experimentais foram tratados durante cinco semanas com CsA em presença de dieta restrita em sódio. Após a lesão estabelecida, foi co-administrado, por um período adicional de 4 semanas, agentes hipouricemiantes, alopurinol ou benzbromarona, em associação com ciclosporina. Como o alopurinol pode apresentar também atividade antioxidante e ter seu efeito potencializado pela dieta à base de proteína de soja [Trujillo et al, 2005], benzbromarona, um agente uricosúrico sem efeito sistêmico, foi utilizado como controle dos efeitos observados pela diminuição dos níveis de ácido úrico.

Para avaliar o efeito da redução dos níveis de ácido úrico, os animais foram comparados a controles com manutenção do estímulo crônico pela ciclosporina (CsA9, ou grupo nefropatia avançada), e aos animais onde o estímulo foi interrompido, com estabilização do quadro (CsA5, nefropatia estabelecida e CsAWT, retirada de ciclosporina).

Os animais tratados com agentes hipouricemiantes associados à administração crônica de ciclosporina apresentaram uma perda de peso menos intensa que os animais cronicamente tratados com ciclosporina, sugerindo que a co-administração de alopurinol e benzbromarona reverta à doença renal provocada pela ciclosporina. O baixo peso dos animais experimentais pode ser explicado pela dieta à base de proteína de soja, hipocalórica. O efeito nos níveis de ácido úrico obtido com os dois medicamentos foi semelhante, e comparável ao obtido com a interrupção do tratamento com ciclosporina.

Fatores que poderiam interferir na análise dos efeitos da normalização do ácido úrico na progressão da doença renal seriam os níveis pressóricos e os níveis sanguíneos de ciclosporina durante o tratamento. A análise destes parâmetros mostrou que todos os grupos cronicamente tratados com ciclosporina apresentavam níveis sanguíneos do medicamento comparáveis nos períodos 5 e 9 semanas de tratamento, indicando que não houve interação medicamentosa nos grupos tratados. Da mesma forma, a pressão arterial de cauda permaneceu estável e comparável entre os grupos durante todos os períodos de tratamento. Estudos anteriores mostram que roedores tratados com CsA em presença de dieta restrita em sal, mantêm os mesmos níveis pressóricos dos grupos controle, permanecendo normotensos durante todo o período experimental [Hunley et al, 1995; Shehata et al, 1995; Pichler et al, 1995; Andoh et al, 1997; Shihab et al, 1999; Shihab et al, 2000]. Apesar de estudos prévios terem demonstrado que o tratamento com alopurinol ou benzbromarona pode reduzir a pressão arterial de animais hipertensos [Mazzali et al, 2002; Watanabe et al, 2002], este fenômeno não foi observado no presente estudo.

A função renal dos animais tratados com alopurinol ou benzbromarona foi melhor que naqueles com uso crônico de ciclosporina, porém inferior à dos grupos CsA5 e CsAWT, sugerindo que estas drogas promovem proteção parcial, mas insuficiente para, do ponto de vista da função renal, neutralizar os efeitos da administração crônica de ciclosporina. Entretanto, a análise morfológica mostrou que tanto o alopurinol como a benzbromarona promoveram redução da atrofia

tubular, quando comparados aos animais tratados por 5 semanas, sugerindo reversão da lesão. Entretanto, a intervenção farmacológica não apresentou efeito sobre a lesão glomerular isquêmica.

Além da atrofia tubular, outro marcador importante da nefropatia crônica pela ciclosporina é a fibrose intersticial, em faixa, que ocorre como consequência de processo inflamatório desencadeado pela CsA e também como resultado de aumento de apoptose de células tubulares secundário à hipóxia, com estímulo à diferenciação epitélio mesenquimal. Entre os vários mediadores pró inflamatórios e pró fibróticos, a osteopontina (OPN) atua como uma molécula de adesão e atração de macrófagos, envolvida na proliferação celular e regeneração tecidual após a lesão renal. No modelo experimental de nefropatia pela CsA ocorre aumento de expressão cortical de OPN, associada a um afluxo de macrófagos. [Young et al, 1995; Thomas et al, 1998; Lim et al, 2004, Mazzali et al, 2002a; Mazzali et al, 2002c]. Estudos em camundongos depletados de osteopontina (knock out), a lesão induzida pela ciclosporina foi menos intensa, sugerindo a participação ativa desta glicoproteína no processo inflamatório [Mazzali et al, 2002].

No presente modelo, observamos um aumento significativo do infiltrado intersticial de macrófagos nos animais tratados com ciclosporina em relação aos controles. Nos animais tratados com alopurinol ou benzbromarona não houve redução significativa da inflamação intersticial. Entretanto, no grupo onde a CsA foi interrompida, observamos redução significativa da inflamação, comparada aos demais grupos, sugerindo que a suspensão da ciclosporina foi fator protetor mais intenso que a variação dos níveis de ácido úrico. Nos grupos CsAALP e CsABENZ não houve redução da expressão de osteopontina, o que manteve elevada a quantidade de macrófagos no interstício e glomérulo destes animais. Estes achados sugerem que a normalização dos níveis de ácido úrico, apesar de cursar com melhora funcional, não foi suficiente para contrabalançar o estímulo tóxico mantido da ciclosporina sobre as células tubulares renais, com ativação de osteopontina e inflamação intersticial. Entretanto, a análise do evento final,

ou seja, da fibrose intersticial, mostrou que, enquanto o tratamento com benzbromarona estabilizou a lesão, ou seja, manteve níveis de deposição de colágeno intersticial comparáveis aos dos animais tratados por 5 semanas ou com interrupção do tratamento com ciclosporina, o uso de alopurinol cursou com redução significativa da intensidade de fibrose intersticial, nas colorações de Tricrômio de Masson e Sirius Red. Estes resultados sugerem que, em presença de quadro de nefropatia estabelecida, a normalização dos níveis sanguíneos de ácido úrico foi suficiente para retardar ou reverter parcialmente à fibrose intersticial, por mecanismo independente da inflamação intersticial. Outros mecanismos possíveis seriam a melhora da hipóxia tecidual, com restabelecimento de microcirculação e/ou redução do estresse oxidativo induzido pela ciclosporina.

Ao avaliar a lesão de microvasculatura, através da hialinose arteriolar, observamos que a retirada de CsA na quinta semana de tratamento cursou com redução da lesão, demonstrando que o tempo de exposição à CsA tem papel importante fator na progressão da lesão vascular. Nos animais tratados com agentes hipouricemiantes, a despeito da manutenção do estímulo da ciclosporina, houve redução da lesão arteriolar, sugerindo a participação do ácido úrico no processo de remodelamento vascular. Estes achados são compatíveis com estudos anteriores, que demonstraram que a hiperuricemia induz remodelamento vascular independente dos níveis pressóricos [Mazzali et al, 2002] e também que a utilização de alopurinol ou benzbromarone foi associada com melhora da lesão da nefropatia crônica no modelo de nefrectomia a 5/6 [Kang et al, 2001].

Este efeito protetor do alopurinol, superior ao da benzbromarona, em relação à vasculopatia e à fibrose intersticial, mas não à inflamação, pode ser atribuído à atividade antioxidante adicional do alopurinol. O ácido úrico apresenta efeito deletério sobre o endotélio, particularmente no bloqueio da produção de NO, mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS), conforme demonstrado em modelos de doença cardiovascular e renal. Estas ROS podem ser geradas por uma série de mecanismos, dentre os quais o que envolve

a reação da xantina oxidase com a xantina, gerando ânion superóxido e ácido úrico [Khosla et al, 2005]. No entanto, inibidores da xantina oxidase, como o alopurinol, minimizam a formação destes radicais livres, diminuindo a lesão endotelial [Kobelt et al, 2002; Raymond et al, 2003]. O alopurinol, ao inibir a formação de radicais livres, aumenta a biodisponibilidade do óxido nítrico, promovendo a vasodilatação de microvasculatura, resultando em reposta moderada ao estresse oxidativo [Kobelt et al, 2002].

Conforme esperado, o grupo que recebeu CsA associado ao alopurinol apresentou redução significativa da detecção da base 8-OHdG em núcleo de células tubulares corticais. Esta redução, entretanto, não foi tão intensa quanto no grupo onde a ciclosporina foi interrompida. Resultados semelhantes foram obtidos na quantificação do malonaldeído em homogenato de tecido renal, onde a utilização de alopurinol promoveu proteção parcial, ou seja, houve redução do estresse oxidativo, com redução da peroxidação lipídica, porém insuficiente para neutralizar o efeito oxidante da ciclosporina. Este efeito protetor parcial também foi observado sobre a apoptose de células epiteliais tubulares, onde a retirada da ciclosporina foi à intervenção mais eficaz, seguida do tratamento com alopurinol.

Em resumo, a co-administração de alopurinol ou benzbromarona cursou com redução dos níveis de ácido úrico e minimizou o quadro de nefrotoxicidade estabelecida por ciclosporina, através da redução de hialinose arteriolar, glomeruloesclerose e fibrose intersticial, além da melhora da função renal, do estresse oxidativo e da apoptose, porém sem efeito antiinflamatório. Além do efeito hipouricemiante, o alopurinol pode também apresentar um mecanismo antioxidante, com efeito protetor adicional sobre a lesão de microvasculatura e redução da área de fibrose intersticial, mas não da lesão inflamatória.

O desenvolvimento de lesão morfológica e a disfunção renal, observada neste modelo experimental, está relacionado com o aumento da síntese e liberação de renina [Mason et al, 1991]. A ativação do SRAA, em especial da

angiotensina-II, através da ativação do receptor AT1, promove vasoconstrição de microvasculatura renal, além de estimular o processo fibrótico e a liberação da aldosterona, que por sua vez, aumenta a retenção de sódio e o volume de sangue circulante [Bobadilla et al, 2007]. A estimulação do SRAA acarreta num aumento expressivo de citocinas pró-fibróticas e de seus respectivos receptores, como o TGF- $\beta$  [Nangaku et al, 2008], além de induzir a hipóxia tecidual, com diminuição de capilares peritubulares, comprometimento de oxigenação de células tubulares, favorecendo a transdiferenciação em miofibroblastos. Estas alterações culminam num ciclo, onde a fibrose leva a hipóxia, e esta por sua vez, a fibrose [Nangaku et al, 2008].

Considerando este efeito direto da angiotensina-II como mediador de progressão de lesão renal, a terceira fase deste estudo propôs que, a utilização de drogas bloqueadoras do sistema-renina-angiotensina-aldosterona como o enalapril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) o losartan (antagonista de receptor AT1 de angiotensina II), e a espironolactona (inibidor competitivo da aldosterona), provocariam reversão ou estabilização do quadro estabelecido de nefrotoxicidade por CsA.

O enalapril e o losartan são comumente usados com hipotensores, ao modular o SRAA. Entretanto foi descrito que estas drogas podem reverter o quadro de falência renal, associado à hipertensão, nefrotoxicidade, nefrite intersticial e lesão arteriolar de rins nativos ou transplantados [Azzadin et al, 2002]. Em estudos anteriores, tanto o enalapril como o losartan, co-administrados com CsA, reduziram os efeitos tóxicos desta droga em ratos urêmicos. Os inibidores de enzima conversora de angiotensina apresentam propriedades nefroprotetoras, ao prevenir a hipertensão e a deterioração da função renal em ratos espontaneamente hipertensos tratados com CsA [Azzadin et al, 2002]. Estudos prévios demonstraram que a modulação do SRAA pelo iECA e o bloqueio de receptor AT1 melhoraram a função endotelial, reduziram o estresse oxidativo e, conseqüentemente, reduziram ou reverteram parcialmente, a inflamação e a arteriosclerose em modelo animal [Argani et al, 2008].

O antagonista de receptor de angiotensina-II (losartan) aumenta a excreção urinária de ácido úrico e de potássio, efeitos benéficos em transplantados renais em uso de CsA, que frequentemente apresentam alterações metabólicas, dentre elas, hiperuricemia e hipercalemia [Schmidt et al, 2001]. Este efeito uricosúrico adicional do losartan baseia-se na inibição da reabsorção de urato nos túbulos renais [Hatch et al, 1995; Iwanga et al, 2006, Feria et al, 2003].

O emprego de um inibidor competitivo de aldosterona baseou-se em trabalhos recentes demonstrando que a aldosterona pode ser uma molécula-chave na progressão da lesão renal, independentemente da atividade da angiotensina-II. Pacientes com hiperaldosteronismo primário apresentam alta prevalência de proteinúria e arterioesclerose. Fibrose intersticial foi observada em 50% das 32 biópsias renais de pacientes com produção anormal de aldosterona [Pérez - Rojas et al, 2007]. Em modelos experimentais com roedores, a infusão contínua de aldosterona induz o aumento da expressão de TGF- $\beta$  mRNA nos rins [Feria et al, 2003]. O tratamento com espironolactona reduziu a lesão glomerular e tubulointersticial em modelos de nefropatia severa, independente do controle pressórico, tanto em modelos de nefrectomia 5/6 como em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). [Pérez - Rojas et al, 2007]. No modelo de nefrotoxicidade por CsA, a espironolactona, preveniu a disfunção renal e o desenvolvimento de lesão tecidual, empregada de forma profilática desde o início da administração de CsA [Pérez - Rojas et al, 2007].

Para avaliar o papel do SRAA no modelo de nefrotoxicidade crônica por CsA já estabelecida, no presente estudo, os animais foram tratados durante cinco semanas com CsA 15mg/Kg/dia, subcutânea, em presença de dieta hipossódica. Posteriormente, os mesmos, foram divididos em três grupos experimentais (CsAENL, CsALOS e CsAESP), nos quais foi avaliada a progressão, estabilização e possível reversão do quadro de nefropatia por CsA, através de parâmetros como peso, função renal, hiperuricemia, inflamação, fibrose intersticial, lesão túbulo-intersticial e microvascular e, estresse oxidativo.

Os animais tratados com agentes modeladores do sistema-renina-angiotensina-aldosterona associados à administração crônica de CsA apresentaram uma perda de peso inferior ao grupo com tratamento isolado com CsA. Neste modelo experimental a CsA promove alterações histopatológicas e funcionais, que resultam num quadro de doença renal catabólica. Assim a co-administração de losartan, enalapril e espironolactona protegeu os animais da perda de peso, que, neste modelo, pode ser atribuída em parte à dieta hipossódica e hipocalórica de proteína de soja.

Ao avaliar a função renal destes animais após a introdução de modeladores do SRAA, observamos estabilização da função renal em todos os grupos, comparável ao tratamento de 5 semanas, sugerindo que a intervenção terapêutica retardou a progressão da nefropatia. Nos animais tratados com espironolactona a função renal final foi significativamente melhor que nos demais grupos, sugerindo proteção adicional. [Feria et al, 2003]. Neste sub estudo, os níveis de ácido úrico foram comparáveis entre os grupos tratados com ciclosporina, com e sem bloqueio do SRAA, resultado do efeito direto da ciclosporina sobre a reabsorção tubular de urato e, da inibição da secreção de ácido úrico mediado pelo lactato, em situação de hipóxia tecidual [Corry et al, 2008]. Apenas nos animais tratados com losartan observamos redução dos níveis de ácido úrico. Estudos anteriores demonstraram que o losartan, apresenta efeito uricosúrico em ratos com função renal normal e diminuída, inibindo a reabsorção de urato, nas células do túbulo proximal, através dos URAT1. [Hatch et al, 1996].

Estudos clínicos sugerem que o SRAA eleva os níveis de ácido úrico em pacientes hipertensos e, que exista forte correlação entre ácido úrico e angiotensina-II. Corry et al (2008) observou que o ácido úrico ativa componentes vasculares do SRAA, incluindo a estimulação da angiotensina-II; e que este efeito pode ser reduzido com o uso de iECA e de inibidor de receptor de angiotensina-II. Assim, os moduladores do SRAA inibem a proliferação de células musculares lisas via ácido úrico, deixando evidências que este efeito proliferativo é mediado, em partes, pelo aumento da produção de angiotensina-II. O ácido úrico estimula a



produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo o ânion superóxido, em cultura de células musculares lisas. A disfunção endotelial está associada com redução da síntese e rápida degradação óxido nítrico, via radicais livres.

As medidas de pressão arterial de cauda (PAC-mmHg) demonstraram que os animais permanecem normotensos durante toda a fase experimental. A co-administração de losartan, enalapril e espironolactona não reduziu a pressão arterial dos roedores de maneira significativa, sendo comparável com os grupos CsA5, VEH9, CsAWT e CsA9. As ações nefroprotetoras destes bloqueadores aparentemente independem de sua eficácia anti-hipertensiva [Pichler et al, 1995; Argani et al, 2008].

A intervenção terapêutica com modeladores do sistema-renina-angiotensina-aldosterona, no modelo de nefrotoxicidade estabelecida por CsA, reverteu à lesão tubulointersticial, com redução significativa de atrofia tubular, glomeruloesclerose isquêmica e fibrose intersticial. Estas alterações ocorreram independentes dos níveis sanguíneos de ciclosporina ou da pressão arterial, que foram comparáveis entre todos os grupos experimentais durante as 9 semanas de estudo. A comparação entre os diferentes grupos de drogas mostrou que o bloqueio de aldosterona com espironolactona apresentou o efeito mais intenso. Estes resultados são comparáveis aos de estudo anterior, utilizando espironolactona profilática na nefropatia por ciclosporina, com prevenção do desenvolvimento de lesão tecidual. [Macunluoglu et al, 2008].

A co-administração de losartan, em roedores recebendo CsA, reduz a fibrose em aproximadamente 50%, em relação aos animais controle CsA [Bobadilla et al 2007]. Este efeito pode ser consequência, em parte, da inibição da osteopontina pelo bloqueio do SRAA. Células epiteliais renais expressam OPN em resposta a estímulo de angiotensina II e hipóxia, e foi demonstrado que o tratamento com enalapril inibe a expressão de osteopontina e de TGF- $\beta$  [Lee et al, 1999]. Mais recentemente, Bobadilla et al (2007), sugeriram a participação da aldosterona no desenvolvimento da fibrose renal, no modelo de nefrotoxicidade

por CsA, via aumento da expressão de TGF- $\beta$  e de apoptose. No presente estudo, observamos que os grupos tratados com modeladores do SRAA apresentaram uma menor expressão de OPN, quando comparado com o grupo cronicamente tratado com CsA, com expressão semelhante aos animais onde a ciclosporina foi interrompida. O infiltrado inflamatório de macrófagos apresentou padrão semelhante, sugerindo que o tratamento com moduladores de SRAA não foi suficiente para reverter o estímulo inflamatório da ciclosporina. Entretanto, a análise da quantificação de fibrose intersticial mostrou redução significativa da fibrose intersticial nos animais tratados, independente do bloqueador de SRAA utilizado. Da mesma forma que nos animais tratados com hipouricemiantes, a fibrose intersticial foi revertida a despeito da manutenção da inflamação intersticial. Assim, optamos por avaliar a ocorrência de hipofluxo (secundário à vasculopatia), hipóxia tecidual, geração de radicais livres de oxigênio e apoptose celular como possíveis mediadores desta lesão.

Os animais tratados com modeladores do SRAA apresentaram redução significativa da hialinose arteriolar, sugerindo que o bloqueio do SRAA reverteu o remodelamento vascular induzido pela ciclosporina, de forma mais acentuada nos animais tratados com espironolactona. Apesar da redução significativa da lesão arteriolar, com conseqüente redução de hipóxia tecidual, não observamos efeito semelhante na apoptose de células tubulares renais ou na geração de radicais livres de oxigênio. A avaliação de dano oxidativo ao DNA celular e a quantificação de malonaldeído tecidual mostraram que o tratamento com enalapril, losartan ou espironolactona reduziu a peroxidação lipídica e a formação de radicais livres, porém mantendo valores semelhantes aos dos animais tratados por 5 semanas, sugerindo que o tratamento apenas estabilizou a lesão. Em contrapartida, a interrupção do tratamento com ciclosporina cursou com redução significativa dos marcadores de estresse oxidativo. Considerados em conjunto, estes resultados sugerem que o dano celular provocado pela ciclosporina é intenso e não revertido pela intervenção farmacológica. A apoptose celular apresentou resultados comparáveis aos da avaliação de estresse oxidativo, sugerindo a perpetuação da lesão em presença do estímulo tóxico da ciclosporina.

Em resumo, os resultados do presente estudo indicam que em modelo experimental de nefrotoxicidade por CsA, o uso de hipouricemiantes ou de modeladores do sistema-renina-angiotensina-aldosterona apresentaram um importante efeito renoprotetor, comparável, do ponto de vista funcional, à interrupção do tratamento com ciclosporina.

A associação de alopurinol ou de benzbromarona, neste modelo, apesar de não reverter o quadro inflamatório intersticial, cursou com redução de fibrose intersticial e de hialinose arteriolar, mais acentuadas com a utilização de alopurinol. Este efeito adicional pode ser consequência de um efeito antioxidante da droga, conforme demonstrado pela redução da peroxidação lipídica e da geração de radicais livres, resultando em menor intensidade de apoptose de células tubulares renais.

A utilização de moduladores do SRAA também cursou com melhora funcional e histológica da nefropatia pela ciclosporina, sem alteração dos marcadores de inflamação intersticial. A melhora da vasculopatia pode ser atribuída à redução do remodelamento vascular com estas drogas, porém com efeito limitado sobre a geração de radicais livres de oxigênio e apoptose de células tubulares.

As duas abordagens terapêuticas foram eficientes na limitação da progressão da nefropatia, com reversão parcial da fibrose intersticial, provavelmente mediada por melhora de oxigenação tecidual secundária à redução da vasculopatia e do remodelamento vascular. A manutenção do estímulo tóxico da ciclosporina, com manutenção da inflamação, da geração de radicais livres de O<sub>2</sub> e da apoptose de células tubulares, entretanto, não foi completamente neutralizado pela intervenção farmacológica.



## **7- CONCLUSÕES**



## 7.1- Gerais

- ❖ A administração de CsA (15mg/Kg/dia, subcutânea) por 5 e 9 semanas em vigência de dieta hipossódica resultou num quadro de nefropatia crônica por ciclosporina, com alterações funcionais e histológicas características desse modelo experimental;
- ❖ Os animais tratados por 9 semanas com ciclosporina apresentaram lesão funcional e histológica mais severa, comparados com o grupo CsA5; o tempo de exposição a CsA é determinante do grau de severidade da lesão renal;
- ❖ A manutenção da administração de CsA após há quinta semana cursa com progressão da nefropatia por CsA;
- ❖ A suspensão da administração de ciclosporina cursou com estabilização funcional e regressão de fibrose intersticial em faixa, porém com manutenção do quadro inflamatório.

## 7.2- Específicos

### 7.2.1- Uso de hipouricemiantes

- ❖ A diminuição dos níveis de ácido úrico com a utilização de alopurinol ou benzbromarona minimizou a lesão renal provocada pela CsA ao longo das 9 semanas, impedindo, parcialmente, a progressão da nefropatia crônica;
- ❖ Houve reversão parcial do quadro de nefrotoxicidade por CsA, especialmente em relação à fibrose e, as alterações microvasculares;
- ❖ O efeito antioxidante adicional do alopurinol foi secundário a redução dos níveis séricos de ácido úrico neste modelo.

### 7.2.2- Uso de Modeladores do sistema-renina-angiotensina-aldosterona

- ❖ A modulação do SRAA com a utilização de losartan, enalapril ou espironolactona minimizou a lesão renal provocada pela CsA ao longo das 9 semanas, impedindo, parcialmente, a progressão da nefropatia crônica;
- ❖ Houve reversão parcial do quadro de nefrotoxicidade por CsA, especialmente em relação à disfunção renal, a fibrose e, as alterações microvasculares;
- ❖ Redução do quadro de hipóxia tecidual e estresse oxidativo causado pela CsA.



## **8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**





Adamczak M, Gross ML, Krtil A, Koch A, Tyralla K, Amann K, et al. Reversal of glomerulosclerosis after high-dose enalapril treatment in subtotally nephrectomized rats. *J Am Soc Nephrol*, 14:2833, 2003.

Alderman M, Aiyer KJ. Uric acid: role in cardiovascular disease and effects of losartan. *Curr Med Res Opin*, 20(3):369-379, 2004.

Amuchastegui SC, Azzollini N, Mister M, Pezzotta A, Perico N, Remuzzi G. Chronic allograft nephropathy in the rat is improved by angiotensin II receptor blockade but not calcium channel antagonism. *J Am Soc Nephrol*, 9:1948, 1998.

Anarat A, Noyan A, Gonlusen G, Duman N, Toncer B. Influence of enalapril on experimental cyclosporine A nephrotoxicity. *Pediatr Nephrol*, 10:626-628, 1998.

Andoh T, Lam T, Lindsley J, Alpers CE, Bennett WM. Enhancement of chronic cyclosporine nephrotoxicity by sodium depletion in an experimental mouse model. *Nephrology*, 3:471-478, 1997.

Araujo M, Welch W. Oxidative stress nitric oxide in kidney function. *Nephrology and hypertension*, 15:72-77, 2006.

Argani H, Ghorbanihaghjo A, Aghaeishahsavari M, Noroozianavval M, Rashtchizadeh N, Veisi P, et al. Effects of Losartan and enalapril on high-sensitivity C-reactive protein and total antioxidant in renal transplant recipients with renin-angiotensin system polymorphisms. *Transplant Proc*; 40(1):16-21, 2008.

Assis SMA, Monteiro JL, Seguro AC. L-arginine and allopurinol protect against cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation*, 63(8):1070-1073, 1997.

Azzadin A, Malyszko J, Maluszko JS, Tankiewicz A, Mysliwiec M, et al. Effects of combination of cyclosporine with losartan or enalapril on kidney function in uremic rats. *Pol J Pharmacol*, 54:469-473, 2002.

Bhathena SJ, Ali AA, Mohamed AI, Hansen CT, Valasquez MT. Differential effects of dietary flaxseed protein and soy protein on plasma triglyceride and uric acid levels in animal models. *J Nutr Biochem*, 13(11):684-689, 2002.

Bennett WM. Insights into chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 34(11):515-519, 1996a.

Bennett WM, de Mattos A, Meyer MM. Chronic cyclosporine nephropathy: The Achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int*, 50:1089-1100, 1996.

Biswas SK, Faria JBL. Hypertension induces oxidative stress but not macrophage infiltration in the kidney in the early stage of experimental diabetes mellitus. *Am J Nephrol*, 26:415-422, 2006.

Bobadilla N, Gamba G. New insights the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293:F2-F9, 2007.

Bonventre JV. Pathogenetic and regenerative mechanisms in acute tubular necrosis. *Kidney Blood Press Res*, 21:226, 1998.

Brenner BM. Remission of renal disease: recounting the challenge, acquiring the goal. *J Clin Invest*, 110:1753, 2002.

Burdmann EA, Andoh TF, Lindsley J, Houghton DC, Bennett WM, Nast CC, et al. Prevention of experimental cyclosporin- induced interstitial fibrosis by losartan and enalapril. *Am J Physiol*, 269(4pt2):F491-499, 1995.

Burdmann EA, Andoh TF, Rosen S, Lindsley J, Munar MY, Elzinga LW, et al. Experimental nephrotoxicity, hepatotoxicity and pharmacokinetics of cyclosporin G versus cyclosporin A. *Kidney Int*, 45(3):684-691, 1994a.

Burdmann EA, Yuong B, Andoh T, Evans A, Alpers C, Lindsley J, et al. Mechanisms of cyclosporine - Induced interstitial fibrosis. *Transplant Proc*, 26(5):2588-2589, 1994b.

Burdmann EA, Andoh TF, Yu L, Bennett WM. Cyclosporine nephrotoxicity. *Semin Nephrol*, 23(5): 465-476, 2003.

Capasso G, di Gennaro C, Ragione F, Manna C, Ciarcia R, et al. In vivo effect of the natural antioxidant hydroxytyrosol on cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant*, 23:1186-1195, 2008.

Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type-2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*, 35:155-63, 2000.

Cid TP, Conejo García TP, Carballo Álvarez F, de Arriba G. Antioxidant nutrients protect against cyclosporine A nephrotoxicity. *Toxicology*, 189:99-111, 2003.

Corry DB, Eslami P, Yamamoto K, Nyby MD, Makino H, Tuck ML. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and oxidative stress via the vascular renin-angiotensin system. *Journal of Hypertension*, 26:269-275, 2008.

Csikó B, Markó L, Mohás M, Cseh J, Mikolás E, et al. The pleiotropic effects of losartan-the importance of decreasing uric acid level. *Lege Artis Med*, 18(10):663-666, 2008.

Culleton BF. Uric acid cardiovascular disease: a renal-cardiac relationship? *Curr Opin in Nephrol and Hypertens*, 10:371-375, 2001.

Darlametsos, Varonos D. Role of prostanoids and endothelins in the prevention of cyclosporine-induced nephrotoxicity. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 64(4&5):231-239, 2001.

Daskalopoulou S, Tzovaras V, Mikhailidis DP, Elisaf FM. Effects on serum uric acid levels of drug prescribed for indications other than treating hyperuricemia. *Curr Pharm Des*, 11(32):4161-4175, 2005.

Dawson J, Walters M. Uric acid and xanthine oxidase: future therapeutic targets in the prevention of cardiovascular disease? *British J Clin Pharmacol*, 62(6): 633-644, 2006.

de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Pharmacology of immunosuppressive medications used in renal transplantation. *Am J Kidney Dis*, 28:631-657, 1996.

Deppe C, Heering P, Viengchareun S, Grabensee B, Farman N, et al. Cyclosporine A and FK506 inhibit transcriptional activity of the human mineralocorticoid receptor: A cell-based model to investigate partial aldosterone resistance in kidney transplantation. *Endocrinology*, 143(5):1932-1941, 2002.

Dzau VJ, Wilcox CS, Sands K, Dunckel P. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation*, 77 (Suppl1): I4-I13, 1998a.

Dzau VJ. Molecular and physiological aspects of tissue renin-angiotensin system: emphasis on cardiovascular control. *J of Hypertension*, 6 (Suppl3): S7-S12, 1998b.

Elzinga LW, Rosen S, Bennett WM. Dissociation of glomerular filtration rate from tubulointerstitial fibrosis in experimental chronic nephropathy: Role of sodium intake. *J Am Soc Nephrol*, 4: 214-221, 1993.

Elzinga LW, Rosen S, Burdmann EA, Hatton DC, Lindsley J, Bennett WM. The role of renal sympathetic nerves in experimental chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation*, 68(11):1746-1453, 2000.

Feig DI. Uric acid: a novel mediator and marker of risk in chronic kidney disease? *Curr Opinion in Nephrol and Hypertens*, 18:526-530, 2009.

Feliers D, Gorin Y, Ghosh-Choudhury G, Abboud H, Kasinath B. Angiotensin II stimulation of VEGF mRNA translation requires production of reactive oxygen species. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290: F927-F936, 2006.

Feria I, Pichardo I, Juarez P, Ramirez V, et al. Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int*, 63: 43-52, 2003.

Franceschini N, Alpers CE, Bennett WM, Andoh TF. Cyclosporine arteriopathy: Effects of drug withdrawal. *Am J kidney Dis*, 32(2): 247-253, 1998.

Franco M, Tapia E, Santamaria J, Zafra I, Garcia-Torres R, Gordon KL, et al. Renal cortical vasoconstriction contributes to development of salt sensitive hypertension after angiotensin II exposure. *J Am Soc Nephrol*, 12(11):2263-2271, 2001.

Gabbini G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *Expert Opin Biol Ther*, 192:500-503, 2003.

Galletti P, di Genaro C, Migliardi V, Indaco S, Ragione FDR, et al. Diverse effects of natural antioxidants on cyclosporin cytotoxicity in rat renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant*, 20:1551-1558, 2005.

Gardiner S, March J, Kemp P, Fallgren B, Bennett T. Regional haemodynamic effects of cyclosporine A, tacrolimus and sirolimus in conscious rats. *British J Pharm*, 141:634-643, 2004.

Ghee J, Han D, Song H, Kim W, Kim S, et al. The role of macrophage in the pathogenesis of chronic cyclosporine-induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 23:4061-4069, 2008.

Ghorbanihaghjo A, Veisi P, Argani H, Aghaeishahsavari M, et al. Prevention of DNA damage in renal transplantation by losartan na enalapril: the roel of renin-angiotensin system polymorphisms. *Clin Exp Nephrol*, 12:65-73, 2008.

Hamada T, Ichida K, Hosoyamada M, Mizuta E, Yanagihara K, et al. Uricosuric action of losartan via the inhibition of urate transporter 1 (URAT1) in hypertensive patients. *Am J Hypertens*, 21(10):1157-1162, 2008.

Hatch M, Freel RW, Shahinfar S, Vaziri ND. Effects of specific angiotensin II receptor antagonist losartan on urate homeostais and intestinal transport. *J Pharmacol Exp Ther*, 276(1):187-193, 1996.

Heering P, Klein-Vehene N, Fehsel K. Decreased mineralocorticoid receptor expression in blood cells of kidney transplant recipients undergoing immunosuppressive treatment: cost efficient determination by quantitative PCR. *J Clin Pathol*, 57:33-36, 2004a.

Heering P, Kurschat C, Vo D, Klein-Vehne N, Fehsel K, et al. Aldosterone resistance in kidney transplantation is in part induced by a down-regulation of mineralocorticoid receptor expression. *Clin Transplant*, 18:186-192, 2004b.

Higgins D, Kimura K, Iwano M, Haase V. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. *Cell Cycle*, 7(9):1128-1132, 2008.

Hillebrand U, Kobelt V, Vophoven M, Suwelack B, Gerhardt U, et al. Influence of antihypertensive drugs on renal microcirculation and renal hemodynamics in cyclosporine A- treat rats. *Transplantation Proceedings*, 34:1383-1384, 2002.

Hunley TE, Fogo A, Iwasaki S, Kon V. Endothelin A receptor mediates functional but not structural damage in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*, 5(9):1718-1723, 1995.

Iwanaga T, Sato M, Maeda T, Ogihara T, Tamai I. Concentration-dependent mode of interaction of angiotensin II receptor blockers with uric acid transporter. *The J Pharmacol an Exp Therap*, 320(1): 211-217, 2007.

Ji P, Si MS, Podnos Y, Chow H, Steward E, Imagawa DK. Prevention of chronic rejection by pravastatin in a rat kidney transplant model. *Transplantation*, 74:821, 2002.

Johnson RJ, Feig DI, Herrera-Acosta J, Kang DH. Resurrection of uric acid as a causal risk factor in essential hypertension. *Hypertension*, 45(1):18-20, 2005.

Kamper A, Nielsen AH. Uricosuric effect of losartan in renal transplant patients. *Transplant Proc*, 33(1-2): 2001.

Kanellis J, Kang DH. Uric acid as a mediator of endothelial dysfunction, inflammation and vascular disease. *Semin Nephrol*, 25(1):39-42, 2005.

Kang DH, Nakagawa T, Feng L, Watanabe S, Han L, Mazzali M, et al. A role for uric acid in the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 13:2888-2897, 2002.

Kang DH, Kim YG, Andoh TF, Gordon KL, Suga SI, Mazzali M, et al. Post-ciclosporine-mediated hypertension and nephropathy: amelioration by vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280: F727-F736, 2001.

Kang SM, Chang W, Lim S, Song BW, Kim HJ, et al. Losartan inhibits proliferation and inflammation of vascular smooth muscle cells by modulation of uric acid transporter. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5(3): 521-527, 2008.

Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int*, 67:1739-1742, 2005.

Kim YG, Huang XR, Suga S, Mazzali M, Tang D, Metz C, et al. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in experimental uric acid nephropathy. *Mol Med*, 6(10):837-848, 2000.

Kobelt V, Hess T, Matzkies F, Gerhardt U, Suwelack B, et al. Does allopurinol prevent side effects of cyclosporine-A treatment? *Transplantation Proceedings*, 34:1425-1427, 2002.

Kumar N, Inamdar M, Venkataraman B. Comparative interaction of few antihypertensive drugs with cyclosporine A- in rats. *Indian J Exp Biol*, 45(7):638-41, 2007.

Krum H, Gilbert RE. Novel therapies blocking the renin-angiotensin-aldosterone system in the management of hypertension and related disorders. *J Hypertens*, 25:25-35, 2007.

Lee S, Park J, Yu E, Yang W, Kim S, et al. Individual or combined effects of enalapril and verapamil on chronic cyclosporine nephrotoxicity in rats. *J Korean Med Sci*, 14:653-8, 1999.

Lee SJ, Terkeltaub RA. New developments in clinically relevant mechanisms and treatment of hyperuricemia. *Curr Rheumatol Rep*, 8(3):224-230, 2006.

Leist M, Jaattelä M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Molecular Cell Biology*, 2:1-10, 2001.

Li C, Lim S, Sun B, Yang C. Chronic cyclosporine nephrotoxicity: new insights and preventive strategies. *Yonsei Med J*, 45(6):1004-1016, 2004.

Li C, Yang CW, Kim WY, Jung JY, Cha JH, et al. Reversibility of chronic cyclosporine nephropathy in rats after withdrawal of cyclosporine. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284: F389-F398, 2003.



Li Y, Sato M, Yanagisawa Y, Mamada H, Fukushi A, et al. Effects of angiotensin II receptors blockers on renal handling of uric acid in rats. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 23(4):263-270, 2008.

Lim BJ, Kim PK, Hong SW. Osteopontin expression and microvascular injury in cyclosporine nephrotoxicity. *Pediatric Nephrol*, 19:288-294, 2004.

Ling H, Li X, Jha S, Wang W, Karetskaya L, Pratt B, et al. Therapeutic role of TGF-beta-neutralizing antibody in mouse cyclosporine A nephropathy: morphologic improvement associated with functional preservation. *J Am Soc Nephrol*, 14:377, 2003.

Ma LJ, Nakamura S, Whitsitt JS, Marcantoni C, Davidson JM, Fogo AB. Regression of sclerosis in aging by an angiotensin inhibition-induced decrease in PAI-1. *Kidney Int*, 58:2425, 2000.

Macunluoglu B, Arikan H, Atakan A, Tuglular S, Ulfer G, et al. Effects of spironolactone in an experimental model of chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation Proceedings*, 40:273-278, 2008.

Maddox DA, Alavi FK, Santella RN, Zawada ET. Prevention of obesity linked renal disease: age dependent effects of dietary food restriction. *Kidney Int*, 62(1):208-219, 2002.

Marcén R, Gallego N, Orofino L, Gámez C, Estepa MR, Sabater J, et al. Impairment of tubular secretion of urate in renal transplant patients on cyclosporine. *Nephrol*, 70:307-310, 1996.

Mason J, Müller-Schweinitzer E, Dupont M, Castellás D, Mihatsch M, et al. Cyclosporine and the rennin-angiotensin system. *Kidney Int*, 39(32):S28-S32, 1991.

Mazali FC, Johnson RJ, Mazzali M. Use of uric acid- Lowering agents limits experimental cyclosporine nephropathy. *Experimental Nephrology*, 2011 (in press).

Mazzali M, Hughes J, Dantas M, Liaw L, Steitz S, Alpers CE, et al. Effects of cyclosporine in osteopontin null mice. *Kidney Int*, 62(1): 78-85,2002a

Mazzali M, Hughes J, Kim YG, Jefferson JA, Kang DH, Gordon KL, et al. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal independent mechanism. *Hypertension*, 38(5):1101-1106, 2001a.

Mazzali M, Kanellis J, Han L, Feng L, Xia YY, Chen Q, et al. Hyperuricemia induces a primary arteriopathy in the rats by a blood pressure independent mechanism. *Am J Physiology Renal*, 282: F991-F997, 2002b.

Mazzali M, Kim YG, Suga S, Gordon KL, Kang DH, Jefreson JA, et al. Hyperuricemia exacerbates chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation*, 71(7), 900-905, 2001b.

Mihastsch MJ, Thiel G, Ryfell B. Histopathology of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc*, 20:759, 1988.

Myers B, Newton L. Cyclosporine induced chronic nephropathy: an obliterative microvascular renal injury. *J Am Soc Nephrol*, 2:S45-S52, 1991.

Nakagawa T, Mazzali M, Kang DH, Kannelis J, Watanabe S, Sanchez-Lozada LG, et al. Hyperuricemia causes glomerular hypertrophy in the rat. *Am J Nephrol*, 23(1):2-7, 2003.

Nangaku M, Eckardt K. Hypoxia and the HIF system in kidney disease. *J Mol Med*, 85:1325-1330, 2007.

Nangaku M, Fujita T. Activation of the renin-angiotensin system and chronic hypoxia of the kidney. *Hypertens Res*, 31:175-184, 2008.

Navar G, Harrison-Bernard LM, Imig JD, Wang CT, Cervenka L, Mitchell K. Intrarenal angiotensin II generation and renal effects of AT1 receptor blockade. *J Am Soc Nephrol*, 10:S266-S272, 1999.

Nishiyama A, Kobori H, Fukui T, Xing Zhang G, Yai L. Role of angiotensin and reactive oxygen species in cyclosporine A dependent hypertension. *Hypertension*, 42(part2):754-760, 2003.

Ortiz A. Apoptotic regulatory proteins in renal injury. *Kidney Int*, 58:467-485, 2000.

Padi SSV, Chopra K. Selective angiotensin II Type 1 Receptor Blockade Ameliorates Cyclosporine Nephrotoxicity. *Pharmacological Research*, 45(5):413-120, 2002.

Parildar M, Parildar Z, Oran I, Kabaroglu C, Memis A, Bayindir O. Nitric oxide and oxidative stress in atherosclerotic renovascular hypertension: effect of endovascular treatment. *J Vasc Interv Radiol*, 14(7):887-892, 2003.

Park WJ, Bae EH, Kim IJ, Ma SK, Choi C, Lee C, et al. Paracalcitriol attenuates cyclosporine induced kidney injury in rats. *Kidney Int*, 77: 1076-1085, 2010.

Patzak A, Persson A. Angiotensin II- nitric oxide interaction in the kidney. *Nephrology and Hypertension*, 16:46-51, 2007.

Pérez-Rojas J, et al. Renocortical RNAm expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289:F1020-1030, 2005.

Pérez-Rojas J, Blanco J, Cruz C, Trujillo J, Vaidya V, et al. Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292:F131-F139, 2007.

Pichler RH, Franceschini N, Young BA, Hugo C, AndoH TF, Burdmann BA. Pathogenesis of cyclosporine nephropaty: roles of angiotensina II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol*, 6:1186-1196, 1995.

Raymond MA, Mollica L, Vigneault N, Désormeaux A, et al. Blockade of the apoptotic machinery by cyclosporine A redirects cell death toward necrosis in arterial endothelial cells: Regulation by reactive oxygen species and cathepsin D. *The FASEB Journal*, 17:515-517, 2003.

Reis F. The unsolved cyclosporine induced kidney injury: is paricalcitol a feasible new renoprotective option? *Kidney Int*, 77: 1055-1057, 2010.

Remuzzi A, Fassi A, Bertani T, Perico N, Remuzzi G. Ace inhibition induces regression of proteinuria and halts progression of renal damage in a genetic model of progressive nephropathy. *Am J Kidney Dis*, 34:626, 1999.

Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med*, 339:1448, 1998.

Remuzzi G, Perico N. Cyclosporine-induced renal dysfunction in experimental animals and humans. *Kidney Int Suppl*, 52:S70, 1995.

Reyes A. Cardiovascular drugs and serum uric acid. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 17: 397-414, 2003.

Rezzani R. Exploring cyclosporine A side effects and the protective role played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies. *Histol Histopathol*, 21:301-316, 2006.

Rossi NF, Churchill FD, McDonald FD, Ellis VR. Mechanism of cyclosporine A induced renal vasoconstriction in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 250(3): 896-901, 1989.

Sánchez-Lozada LG, Nakagawa T, Kang DH, Feig DI, Franco M, Johnson RJ, et al. Hormonal and cytokine effects of uric acid. *Curr Opin in Nephrol and Hypertens*, 15: 30-33, 2006.

Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Rodríguez-Iturbe B, Johnson RJ, Herrera-Acosta J. Hemodynamics of hyperuricemia. *Semin Nephrol*, 25:19-24, 2005.

Schmidt A, Gruber U, Böhmig G, Köller E, Mayer G. The effect of ACE inhibitor and angiotensin II receptor antagonist therapy on serum uric acid levels and potassium homeostasis in hypertensive renal transplant recipients treated with CsA. *Nephrol Dial Transplant*, 16:1034-1037, 2001.

Semenza G. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*, 88:1474-1480, 2000.

Servais H, Ortiz A, Devuyst O, Denamur S, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis*, 13:11-32, 2008.

Shehata M, Cope GH, Johnson TS, Raftery A, Nahas AM. Cyclosporine enhances the expression of TGF- $\beta$  in the justaglomerular cells of the rat kidney. *Kidney Int*, 48:1487-1496, 1995.

Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Andoh TF. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and KDR/Flk-1 in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation*, 72:164, 2001.

Shihab FS, Yi H, Bennett WM, Andoh TF. Effect of nitric oxide modulation TGF- $\beta$ 1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int*, 58:1174-1185, 2000.

Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Yi H, Bennett WM. Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis. *Kidney Int*, 56:2147-2159, 1999.

Shihab FS, Bennett WM, Tanner AM, Andoh TF. Angiotensin II blockade decreases TGF-beta 1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int*, 58:1174, 1997.

Sica DA, Shoolwerth AC. Part 1. Uric acid and losartan. *Curr Opin Nephrol and Hypertens*, 11(5): 475-482, 2002.

Silva SL, Silva A, Honório KM, Marangoni S, Toyama MH, Silva ABF. The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *Journal of Molecular Structure*, 684:1-7, 2004.

Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, Shankland SJ, Couser WG, Bennett WM, et al. Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine- associated interstitial fibrosis. *Kidney Int*, 53:897-908, 1998.

Trujillo J, Ramírez V, Uribe M, Gamba G, Bobadilla N. Renal protection by a soy diet in obese Zucker rats is associated with restoration of nitric oxide generation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288: F108-F116, 2005.

Vítko S, Viklický O. Cyclosporine renal dysfunction. *Transplantation Proceedings*, 36(Suppl2S):243S-247S, 2004.

Watanabe S, Kang DH, Feng L, Nakagawa T, Kanellis J, Lan H, et al. Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt- sensitivity. *Hypertension*, 40:355-360, 2002.

Watari Y, Morita K, Shimoda N, Miura M, Yoshioka M, et al. Effect of tacrolimus and cyclosporine on renal microcirculation and nitric oxide production. *Transplantation Proceedings*, 36:2130-2132.

Weir MR, Blahut S, Drachenburg C, Young C, Papademitriou J, et al. Late calcineurina inhibitor withdrawal as a strategy to prevent graft loss in patient with suboptimal kidney transplant function. *Am J Nephrol*, 24:379, 2004.

Will ED. Lipid peroxide formation in microsomes. *Biochem J*, 113:333-340, 1986.

Wilson MR. Apoptotic signal transduction: emerging pathways. *Biochem Cell Biol*,76:573-582, 1998.

Wissmann C, Frey FJ, Ferrari P, Uehlinger DE. Acute cyclosporine nephrotoxicity in renal transplant recipients: the role of the transplanted kidney. *J Am Soc Nephrol*, 7:2677-2681, 1996.

Wolak T, Kim H, Ren Y, Kim J, Varizi ND, Nicholas SB. Osteopontin modulates angiotensin II induced inflammation, oxidative stress, and fibrosis of the kidney. *Kidney Int*, 76: 32-43, 2009.

Yamanoto T, Moriwaki Y, Takahasshi S, Tsutsumi Z, Hada T. Effect of losartan potassium, an angiotensina II receptor antagonist, on renal excretion of oxypurinol and purine bases. *J Rheumatol*, 27(9):2232-2260, 2000.

Yang CW, Ahn HJ, Kim WY, Jung JY, et al. Influence of the renin-angiotensin system on epidermal growth factor expression in normal and cyclosporine-treated rat kidney. *Kidney Int*, 60: 847- 857, 2001.

Yang CW, Ahn HJ, Kim WY, Jung JY, et al. Synergistic effects of mycophenolate mofetil and losartan in model of chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation*, 75(3): 309-315, 2003.

Yoon HE, Yang CW. Established and newly proposed mechanisms of chronic cyclosporine nephropathy. *Korean J Intern Med*, 24:81-92, 2009.

Yuong BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Alpers CE, Giachelli CM, Eng E, et al. Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int*, 48:439, 1995.

Zeisberg M, Strutz F, Muller GA. Renal fibrosis: na update. *Curr opin Nephrol Hypertens*, 10:315, 2001.

Zurcher RM, Bock HA, Tiel G. Hyperuricemia in cyclosporine treated patients: A GFR related effect. *Nephrol Dial Transplant*, 11:153-157, 1996.