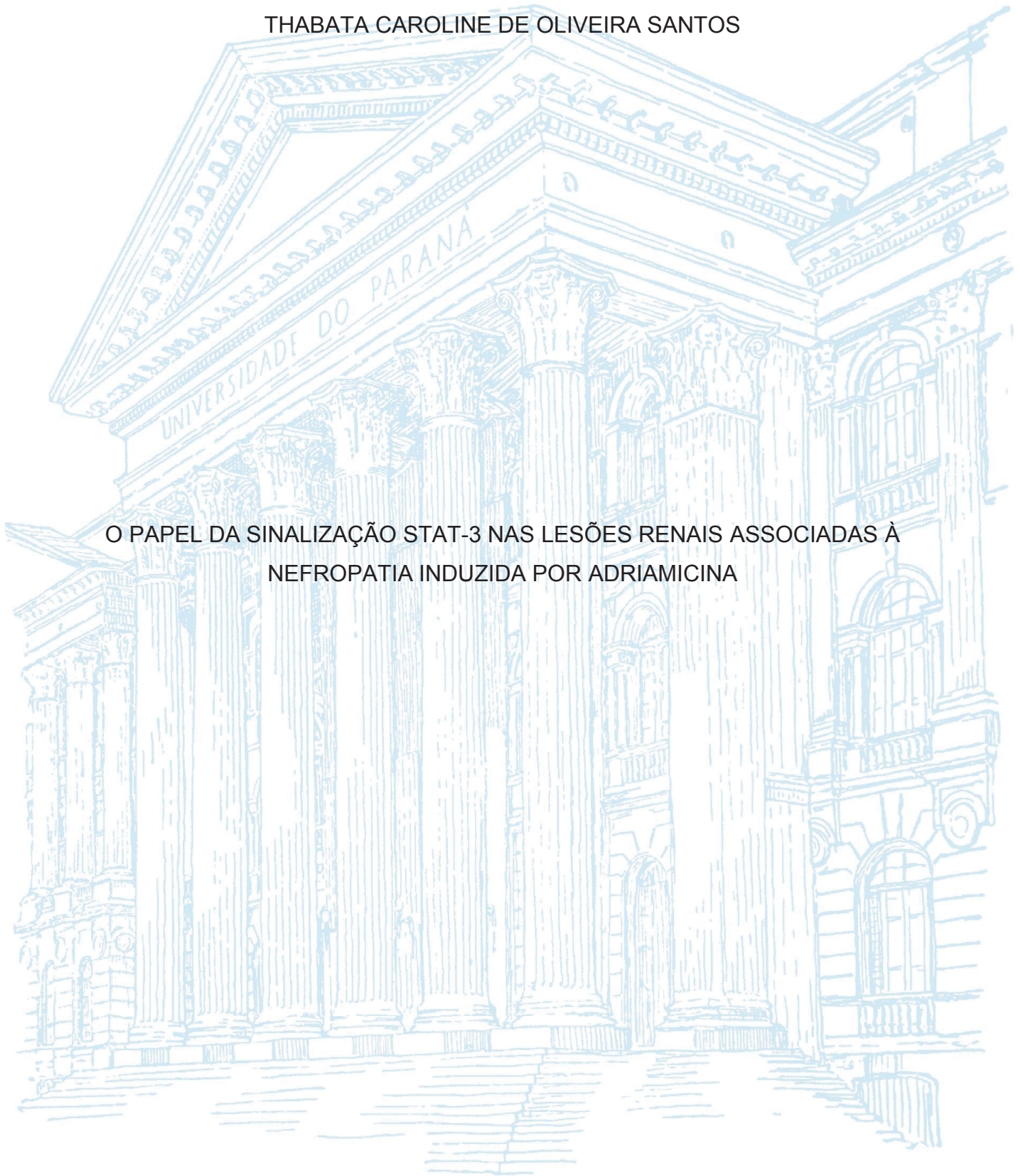


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THABATA CAROLINE DE OLIVEIRA SANTOS



O PAPEL DA SINALIZAÇÃO STAT-3 NAS LESÕES RENAIIS ASSOCIADAS À
NEFROPATIA INDUZIDA POR ADRIAMICINA

CURITIBA

2018

THABATA CAROLINE DE OLIVEIRA SANTOS

O PAPEL DA SINALIZAÇÃO STAT-3 NAS LESÕES RENAISS ASSOCIADAS À
NEFROPATIA INDUZIDA POR ADRIAMICINA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em fisiologia, no Curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Luiz Pereira

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Santos, Thabata Caroline de Oliveira

O papel da sinalização STAT-3 nas lesões renais associadas à nefropatia induzida por adriamicina em camundongos heterogêneos. / Thabata Caroline de Oliveira Santos. – Curitiba, 2018.

65 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Rafael Luiz Pereira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Glomérulos renais - fisiopatologia. 2. Glomerulonefrite. 3. Doença renal. I. Título. II. Pereira, Rafael Luiz. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 616.61



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



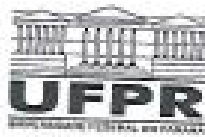
PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **THABATA CAROLINE DE OLIVEIRA SANTOS** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 29 de junho de dois mil e dezoito.

Parecer (Aprovada/Reprovada)	Nome	Assinatura
APROVADA	Professor Doutor Danilo Cândido de Almeida UNIFESP- Membro Titular	<i>Danilo Cândido de Almeida</i>
Aprovada	Professor Doutor Tarciso Teodoro Braga UFPR - Membro Titular	<i>Tarciso Teodoro Braga</i>
APROVADA	Professor Doutor Rafael Luiz Pereira UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora	<i>Rafael Luiz Pereira</i>



Ata da Defesa de Dissertação de Mestrado de Thabata Caroline de Oliveira Santos

Aos vinte e nove dias do mês de junho do ano de dois mil e dezoito, foi realizada no auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestranda THABATA CAROLINE DE OLIVEIRA SANTOS, intitulada "O PAPEL DA SINALIZAÇÃO STAT-3 NAS LESÕES RENAIAS ASSOCIADAS À NEFROPATIA INDUZIDA POR ADRIAMICINA EM CAMUNDONGOS HETEROGÊNEOS". A abertura teve início às 09h00min pelo Presidente da Banca Examinadora e Orientador da candidata, Professor Doutor Rafael Luiz Pereira. O Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou à palavra a aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, o Professor Doutor Rafael Luiz Pereira passou à palavra ao primeiro examinador, Professor Doutor Danilo Cândido de Almeida do Departamento de Nefrologia da UNIFESP. Na sequência, passou à palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Tarcio Teodoro Braga do Departamento de Patologia Básica da UFPR. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, o Presidente, Professor Doutor Rafael Luiz Pereira fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela " APROVAÇÃO ", habilitando-a ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Professor Doutor Rafael Luiz Pereira, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, da qual assino juntamente com os senhores examinadores.

Curitiba, 29 de junho de dois mil e dezoito.

Professor Doutor Danilo Cândido de Almeida
UNIFESP- Membro Titular

Professor Doutor Tarcio Teodoro Braga
UFPR - Membro Titular

Professor Doutor Rafael Luiz Pereira
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

À minha família, amigos e orientador que sempre me apoiaram e me ajudaram.

AGRADECIMENTOS

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que estiveram comigo no decorrer do mestrado, apoiando as minhas escolhas e me ajudando quando precisei.

Em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Luiz Pereira, por ter aceitado me orientar e ter sido o melhor e mais presente orientador que eu poderia ter tido.

A minha mãe, Mari Oleni de Oliveira, que sempre me incentivou a seguir meus sonhos e nunca desistir por mais difícil que o caminho se mostrasse.

Ao Bruno Decontti, por todo seu apoio ao longo dos 10 anos de relacionamento.

Para que esse trabalho de mestrado se tornasse realidade, eu contei com o auxílio de pessoas muito importantes. Portanto, gostaria de agradecer especialmente à minha querida colega de laboratório, Anna Gabrielle Gomes Coutinho, por sua ajuda e paciência em me ensinar.

Aos professores Dr. Fernando Augusto Lavezzo Dias e Dr. Marcelo M. Santos Lima, pela grande ajuda, ao dispor materiais, reagentes e aparelhos durante os meus experimentos.

À professora Dra. Debora Tavares Resende e Silva, pela colaboração na análise histológica.

Aos meus estagiários, Ana Cláudia Marra, Gabriel Pereira e Raphaella Calgaro pela dedicação, responsabilidade e empenho na realização dos experimentos.

À CAPES pela bolsa cedida.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

À minha família, amigos e colegas de departamento

“Não é no silêncio que os homens se fazem, mas na palavra, no trabalho, na ação-reflexão. Dizer a palavra não é privilégio de alguns homens, mas direito de todos os homens”.

(FREIRE, P. 1970, p.158)

RESUMO

Dentre as glomerulopatias que conduzem à doença renal crônica (DRC) e consequente necessidade de terapia renal substitutiva (TRS), a glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) representa cerca de 30% dos casos. A GESF possui caráter heterogêneo, sendo caracterizada por lesão podocitária primária e perda da seletividade da barreira de filtração glomerular com consequente proteinúria, lesão tubular de caráter fibrótico e infiltrado de células inflamatórias. Além da alta morbidade e mortalidade, a doença apresenta uma taxa de recorrência pós transplante de 40%, sendo que os gastos com as TRS geram custos em torno de R\$ 2 bilhões por ano. A via de sinalização STAT-3 está envolvida, dentre outras funções, na proliferação celular e inflamação e tem sido investigada como tendo papel importante na progressão de DRCs. Há alguns modelos experimentais para o estudo da GESF, no entanto, todos os modelos utilizam animais geneticamente homogêneos, o que não condiz com a realidade dos pacientes em relação à variabilidade genética. Tendo em vista a importância de estudos sobre GESF em modelos experimentais heterogêneos e a carência de dados sobre o papel da STAT-3 no desenvolvimento da patologia, este trabalho teve como objetivo avaliar o papel da via de sinalização pela STAT-3 nas lesões renais presentes na GESF e sua interferência na progressão da doença em modelo geneticamente heterogêneo. Para tanto, foram utilizados camundongos machos *Swiss*, os quais tiveram GESF induzida pelo quimioterápico adriamicina (ADM) em dois protocolos distintos, sendo um utilizando a dose de 10 mg/kg e outro com dose de 25 mg/kg de ADM. Os resultados obtidos apontaram que a indução de nefropatia por ADM em animais heterogêneos é eficaz em ambas as doses estudadas, sendo que na dose de 10 mg/kg a lesão renal demora mais tempo para se estabelecer (14 dias), em relação a dose de 25 mg/kg, na qual a albuminúria já aparece nos 5 primeiros dias após a administração da droga. Também concluímos a administração de STATIC diminui a expressão gênica e proteica de STAT-3, interferindo na via de sinalização-IL-6-STAT-3, o que tem papel importante na progressão da GESF, uma vez que a sua inibição leva à diminuição da albuminúria, fibrose tubulointersticial e necrose tubular, marcadores importantes na glomeruloesclerose segmentar e focal e intimamente ligados a progressão da doença.

Palavras-chave: Glomeruloesclerose segmentar e focal. STATIC. Proteinúria.

ABSTRACT

Among the glomerulopathies that lead to chronic kidney disease (CKD) and consequent need for renal replacement therapy (RRT), the focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) represents about 30% of cases. FSGS has a heterogeneous character and is characterized by primary podocyte lesions associated with loss glomerular filtration barrier selectivity with consequent proteinuria, tubular lesions and infiltration of inflammatory cells. In addition to high morbidity and mortality, this disease has a post-transplant recurrence rate of 40%. The STAT-3 signaling pathway is involved, among other functions, in cell proliferation and inflammation and has been investigated in the progression of CKD. There are some experimental models for the study of FSGS, however, all these models use genetically homogeneous animals. There are some experimental models for the study of FSGS, however, all these models use genetically homogeneous animals, which does not fit the reality of the patients, which present different responses to treatments and disease progression. Considering the importance of studies on FSGS in heterogeneous experimental models and the lack of data on the role of STAT-3 in the development of pathology, this study aimed to evaluate the role of the STAT-3 signaling pathway in the present renal lesions in the FSGS and its interference in the progression of the disease in a genetically heterogeneous model. For this, Swiss male mice were used, which had FSGS induced by chemotherapeutic adriamycin (ADM) in two different protocols, one using the dose of 10 mg / kg and the other with a dose of 25 mg / kg of ADM. The results obtained indicate that the induction of ADR nephropathy in heterogeneous animals is effective in both doses studied but at a dose of 10 mg/kg renal injury takes longer to establish (14 days) than the 25 mg / kg in which albuminuria appears within the first 5 days after drug administration. We also concluded that the administration of STATTIC decreases STAT-3 gene and protein expression, interfering with the IL-6-STAT-3 signaling pathway, which plays an important role in FSGS progression, since its inhibition leads to a decrease in albuminuria, tubulointerstitial fibrosis and tubular necrosis, which are markers of this disease.

Key-words: Focal segmental glomerulosclerosis. STATTIC. Proteinuria.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Desenho esquemático do néfron, indicando suas estruturas principais.....	18
FIGURA 2: A barreira de filtração glomerular.....	19
FIGURA 3: Ativação de vias inflamatórias e fibrogênicas nas células epiteliais tubulares proximais em decorrência da proteinúria.....	23
FIGURA 4: Complexo receptor de IL-6.....	24
FIGURA 5: Modelo de sinalização da via STAT-3.....	25
FIGURA 6: Mecanismo de ação da SOCS-3 na inativação da via de sinalização STAT-3	26
FIGURA 7: A inibição da via STAT-3 pela STATTIC.....	30
FIGURA 8: Desenho experimental do modelo de indução de nefropatia por ADM na dose de 25 mg/kg.....	34
FIGURA 9: Modelo experimental de nefropatia induzida por ADM na dose de 10 mg/kg.....	34
FIGURA 10: A administração de ADM na dose de 10mg/kg induz albuminúria em camundongos <i>swiss</i>	41
FIGURA 11: A administração de ADM na dose de 10 mg/kg causa perda de peso nos camundongos <i>swiss</i> 7 dias após o tratamento.....	42
FIGURA 12: A administração de ADM na dose de 10 mg/kg induz aumento de fibrose e necrose tubular.....	43
FIGURA 13: A administração de 25 mg/kg de ADM induz albuminúria intensa nos camundongos <i>swiss</i> 5 dias após o tratamento.....	44
FIGURA 14: A administração de ADM na dose de 25 mg/kg causa perda de peso dos animais 5 dias após o tratamento.....	44
FIGURA 15: A inativação da STAT-3 causa diminuição da albuminúria no modelo de nefropatia induzido por ADM na dose de 10 mg/kg, 14 dias após o tratamento.....	46
FIGURA 16: A inibição da STAT-3 causa diminuição da albuminúria no modelo de indução de nefropatia na dose de 25 mg/kg de ADM.....	47
FIGURA 17: A administração de 10 mg/kg de ADM leva ao aumento da proteinúria em camundongos <i>swiss</i> 7 dias após o tratamento.....	49
FIGURA 18 A administração de 10 mg/kg de ADM leva ao aumento da proteinúria em camundongos <i>swiss</i> 14 dias após o tratamento.....	50

FIGURA 19: A administração de 25 mg/kg de ADM leva ao aumento da glicosúria e proteinúria em camundongos <i>swiss</i>	51
FIGURA 20: A inibição da STAT-3 causa diminuição da expressão de mRNA de STAT-3 e IL-6R, bem como, o aumento da expressão gênica de IL-6 e SOCS-3, no MNIA com dose de 25 mg/kg.....	53
FIGURA 21: A ação do STATTIC, inibindo a fosforilação da STAT-3, leva ao acúmulo da proteína no citosol.....	54
FIGURA 22: Análise histológica dos rins dos quatro grupos estudados no modelo com dose de 25 mg/kg de ADM.....	56
FIGURA 23: A inibição da via de sinalização STAT-3 causa diminuição da expressão proteica da STAT-3.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classificação etiológica da GESF	14
TABELA 2: Classificação de padrões histológicos de GESF	15
TABELA 3: Primers utilizados na PCR em tempo real.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DRC	- Doença Renal Crônica
SBN	- Sociedade Brasileira de Nefrologia
TRS	- Terapia Renal Substitutiva
GESF	- Glomeruloesclerose Segmentar e Focal
ADM	- Adriamicina
STAT	- <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
IL-6R	- Glicoproteína Transmembrana do Tipo I de Ligação à IL-6
JAK	- Janus quinases
IL-6	- Interleucina 6
SOCS	- Supressores da sinalização de citocinas
STAT3IC	- <i>Stat three inhibitory compound</i>
MNIA	- Modelo de Nefropatia Induzida por Adriamicina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	A doença renal crônica.....	13
1.2.	A GESF.....	13
1.3.	O néfron.....	17
1.4.	Efeitos da proteinúria sobre o túbulo renal.....	21
1.5.	A via de sinalização da STAT 3.....	23
1.6.	O modelo experimental.....	27
1.7.	A inativação da via de sinalização STAT-3.....	29
1.8.	Justificativas.....	30
2.	OBJETIVOS.....	31
2.1.	Objetivos gerais.....	31
2.2.	Objetivos específicos.....	32
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1.	Animais.....	32
3.2.	Drogas.....	33
3.3.	Desenho experimental.....	33
3.4.	Eutanásia e coleta dos materiais.....	35
3.5.	Estimativa de albuminúria.....	35
3.6.	Uroanálise com tiras reagentes.....	36
3.7.	Análise histológica.....	36
3.8.	PCR em tempo real	37
3.9.	Western Blot.....	38
3.10.	Análises estatísticas.....	38
4.	RESULTADOS.....	39
4.1.	Nefropatia induzida por adriamicina na dose de 10 mg/kg.....	39
4.1.1.	Albuminúria.....	39
4.1.2.	Perda de peso.....	41
4.1.3.	Análise histológica.....	42

4.2. Nefropatia induzida por ADM na dose de 25 mg/kg.....	44
4.2.1. Albuminúria.....	44
4.1.2. Perda de peso.....	45
4.3. Participação da via de sinalização STAT-3	46
4.3.1. Quantificação de albuminúria no MNIA na dose de 10 mg/kg.....	46
4.3.2. Albuminúria no MNIA na dose de 25 mg/kg.....	48
4.3.3. Uroanálises.....	49
4.3.4. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real MNIA com dose de 25 mg/kg de ADM.....	52
4.3.5. Análise histológica no MNIA com dose de 25 mg/kg de ADM.....	55
4.3.6. Expressão proteica de STAT-3.....	57
5. CONCLUSÃO.....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. A doença renal crônica

Atualmente, as doenças crônicas são as principais causas de mortes no mundo (LI & MA, 2017), provocando 29 milhões de óbitos anuais. Estima-se que em 2020, esse número chegue a 50 milhões de mortes (YACH *et al.*, 2004). Dentre as doenças crônicas, destaca-se, a doença renal crônica (DRC), a qual é a 17^a maior causa de mortes no mundo (YACH *et al.*, 2004).

A prevalência da DRC tem aumentado globalmente de forma considerável. Em 1990 a taxa de mortes por DRC era de 11.6 por 100.000 habitantes, passando para 15.8 em 2013 (MATHERS & LONCAR, 2002). No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), a taxa de DRC cresceu 6,3% nos últimos cinco anos, passando para um valor estimado de 122.825 pacientes no país em 2016.

Dentre as patologias que podem acometer a função renal dos pacientes levando à DRC encontram-se as glomerulopatias (SHIMIZU *et al.*, 2011).

Glomerulopatias são anomalias urinárias diagnosticadas macro e microscopicamente, somado a quantificação de proteinúria e o diagnóstico clínico de doenças renais (TRIMARCHI, 2015). As glomerulopatias causam proteinúria massiva por ocasionar a perda da seletividade da barreira de filtração glomerular (ABBATE *et al.*, 2006).

A glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) é umas das glomerulopatias mais frequentes no Brasil e no mundo (POLITO & KIRSZTAJN, 2010), acometendo 29.7% dos pacientes renais.

1.2. A GESF

O termo glomeruloesclerose segmentar e focal é usado para descrever tanto a doença caracterizada por lesão podocitária primária, quanto a lesão secundária observada nas doenças renais progressivas crônicas. Dessa forma, o termo não se refere a uma doença glomerular específica, mas sim a um padrão morfológico e histológico de lesão reconhecido na biópsia renal, caracterizada por lesões escleróticas (fibróticas) em glomérulos (JEFFERSON & SHANKLAND, 2014). A

esclerose é causada pela obliteração do capilar por fibras de colágeno da matriz, sendo que sua distribuição é focal, pois atinge alguns, mas não todos os glomérulos, e segmentar, uma vez que afeta uma porção do tufo glomerular (FOGO, 2014).

A GESF possui diversas etiologias, o que contribui com os diferentes quadros clínicos que a doença pode apresentar, podendo ser caracterizada em primária ou secundária (FOGO, 2003). A prevalência de GESF primária entre pacientes com proteinúria submetidos à biópsia varia entre 7-12%, sendo que no Brasil, alguns estudos demonstram prevalência de GESF em torno de 25-30% (ABRANTES *et al.*, 2005).

No Brasil, a GESF é a principal causa de síndrome nefrótica em adultos quando são considerados apenas os diagnósticos histológicos, como demonstrado por Polito *et al.*, (2010), o qual observou que a GESF corresponde a 24,6% das glomerulopatias primárias, ocupando o primeiro lugar nesse grupo.

A GESF primária é, na maioria dos casos, idiopática, enquanto a secundária ocorre em associação com outras doenças renais, obesidade, infecções por HIV, doenças autoimunes, diabetes, uso de drogas, fatores circulantes, fatores genéticos, dentre outras causas (DASKALAKIS, 2006; FOGO, 2014). Na tabela 1 está apresentada a classificação etiológica da GESF segundo D'agati *et al.*, (2004).

Tabela 1: Classificação etiológica da GESF

Primária

A. Idiopática

Secundária

1. Familiar/genética

A. Mutações na α -actina 4

B. Mutações na podocina C

C. Mutações nas integrinas

2. Associação com vírus

A. HIV-1

B. Parvovírus-B19

3. Induzida por drogas

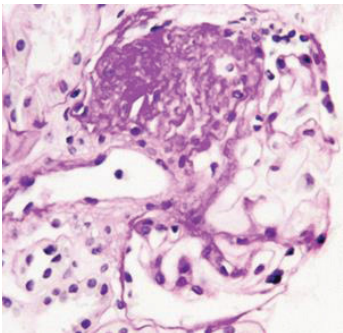
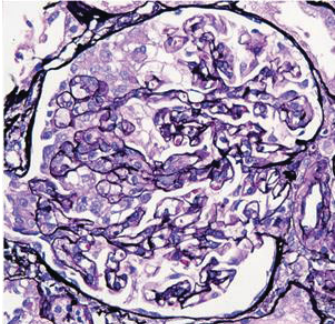
A. Heroína

- B. Interferon- α
 - C. Lítio
 - D. Pamidronato
4. Mediado por respostas estruturais/funcionais adaptativas
- A. Redução da massa renal
 - B. Hipertensão
 - C. Obesidade
 - D. Doença cardíaca congênita cianótica
 - F. Anemia Falciforme

Adaptado de D'agati *et al.* (2004)

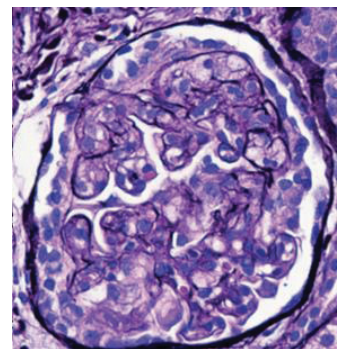
A tabela 2 apresenta cinco padrões histológicos presentes na GESF.

Tabela 2: Classificação de padrões histológicos de GESF

Tipos	Características histológicas
1. FSGS não especificado de outra forma	Esclerose Segmentar 
2. GESF Colapsante	Colapso de tufo e hiperplasia de podócitos 

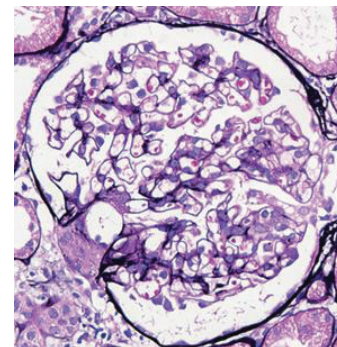
3. GESF celular

Proliferação endocapilar, geralmente, hiperplasia de podócitos. Esclerose



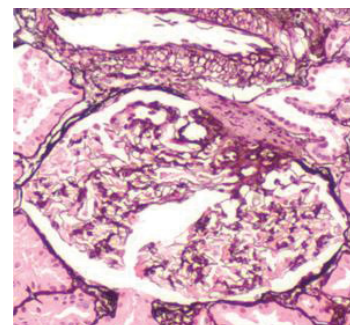
4. Lesões do tipo TIP

Esclerose de tufo no polo tubular proximal.



5. Variante Perihilar

Esclerose e hialinose no polo vascular.



Adaptado de Fogo (2014)

A variabilidade de padrões histológicos da GESF resulta em diferentes abordagens terapêuticas, uma vez que, como afirma Moura, *et al.*, (2015) existem diferenças nos procedimentos farmacológicos empregados por ocasião do diagnóstico, pelo menos no que se refere à duração da fase de ataque no caso da corticoterapia, assim como na taxa de resposta ao tratamento e no prognóstico.

É largamente aceito que a lesão primária da GESF é podocitária, entretanto, como apontado por Meyer (2003), a lesão tubular acompanha a lesão glomerular, não se podendo excluir a possibilidade do surgimento da glomeruloesclerose devido a uma lesão tubular ou intersticial anterior. Todavia, trabalhos apontam a

proteinúria, consequente à perda de seletividade da barreira de filtração glomerular, como causa da lesão tubular (BERTANI; REMUZZI, 1983; BERTANI *et al.*, 1986; BECKER & REWITSON, 2000).

1.3. O néfron

O néfron, a unidade funcional do rim, é formado pelo corpúsculo renal (representado pelo glomérulo e pela cápsula de Bowman); túbulo proximal; alça de Henle (formada pelo ramo descendente fino, ramo ascendente fino e ramo ascendente espesso); túbulo distal e ducto coletor (FIGURA 1, modificada a partir de Berne & Levy, Fisiologia, 6ª edição, Editora Elsevier, 2009). O glomérulo é formado por uma rede de capilares especializados (tufo glomerular), que são nutridos pela arteríola aferente e drenados pela arteríola eferente. O tufo glomerular se encontra dentro de uma câmara delimitada pela cápsula de Bowman, que por sua vez, possui uma abertura que se comunica diretamente com o túbulo proximal (RIELA, 2010).

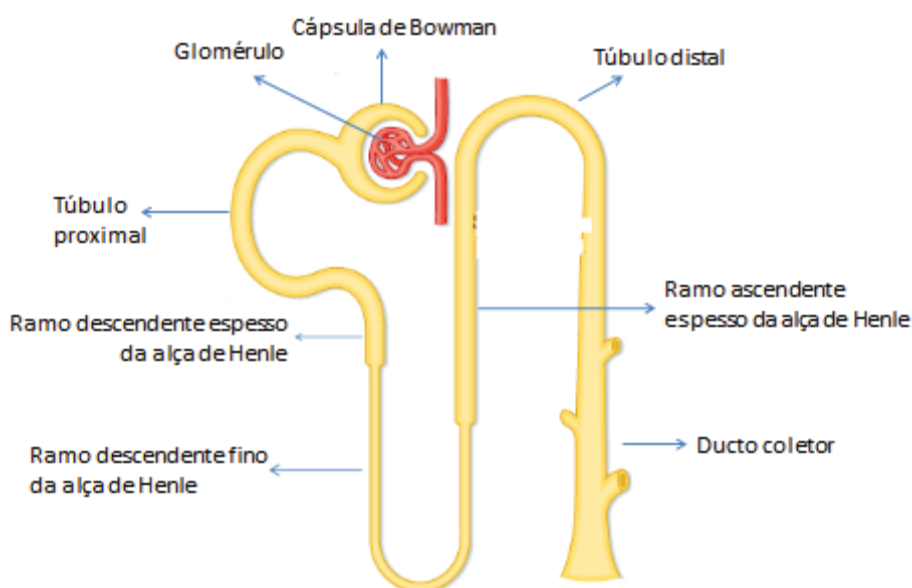


Figura 1: **Desenho esquemático do néfron, indicando suas estruturas principais.** Modificado a partir de Berne & Levy. Fisiologia. 6ª edição, Editora Elsevier, 2009.

O glomérulo é responsável pela formação do ultrafiltrado plasmático, que ocorre pela passagem do sangue através da barreira de filtração glomerular. A barreira é composta por três camadas (FIGURA 2, modificada a partir de Robbins e Cotran, As bases patológicas das doenças, Editora Elsevier, 2005), sendo elas o endotélio fenestrado, a membrana basal glomerular e uma camada de células epiteliais viscerais da cápsula de Bowman, chamadas de podócitos, devido às suas projeções em forma de “pés” que envolvem intimamente o exterior do capilar glomerular (TAAL, *et al.*, 2012).

As fenestras do endotélio variam de 70 a 100 nm de diâmetro, sendo que as superfícies das células endoteliais são negativamente carregadas devido à presença de glicosaminoglicanos e glicoproteínas, que formam o glicocálix das células (TAAL, *et al.*, 2012). Os poros e as cargas negativas do endotélio formam uma barreira inicial que impede que células sanguíneas sejam filtradas para a cápsula de Bowman, bem como, retém proteínas de alto peso molecular e carregadas negativamente, como a albumina (SCOTT & QUAGGIN, 2015). Além disso, a camada de superfície endotelial glomerular também representa uma barreira seletiva às macromoléculas significativamente importante (VINK & DULING, 2000).

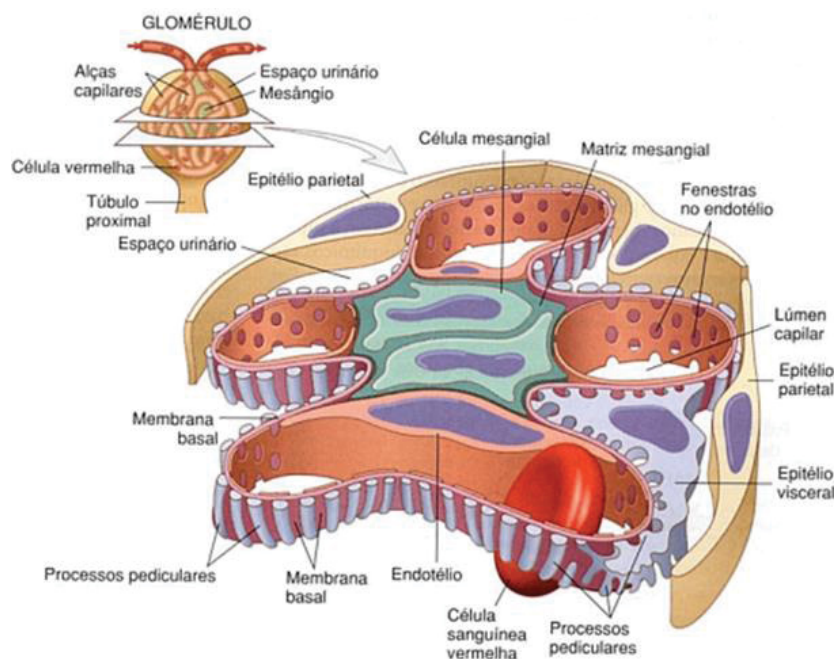


Figura 2: **A barreira de Filtração glomerular.** A barreira de filtração glomerular é composta por três camadas que retêm as células e macromoléculas sanguíneas, selecionando-as por tamanho e carga. As camadas são o endotélio fenestrado, a membrana basal glomerular e os podócitos que envolvem a membrana basal com os seus processos pediculares. Modificado a partir de Robbins e Cotran. As bases patológicas das doenças. Editora Elsevier, 2005.

Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas, terminalmente diferenciadas, com um fenótipo quiescente. Eles derivam embrionariamente das células mesenquimais, sendo que cada podócito maduro possui componentes anatômicos e, portanto, funcionais distintos (SHANKLAND, 2006). Tais células são de extrema importância na manutenção da estrutura da barreira de filtração glomerular, porém a mesma localização que permite a sua função crucial no processo de filtração, também os coloca sob diversas situações de estresse mecânico, oxidativo e imunológico, podendo acarretar em lesões (NAGATA, 2016). Tais lesões podem levar ao quadro de podocitúria (perda de podócitos na urina) típica das doenças renais crônicas (como a GESF) como apresentado por Hara (2001), o qual demonstrou que a excreção urinária dos podócitos é significativamente maior em pacientes com GESF em comparação com aqueles que apresentam nefropatia membranosa ou doença de lesão mínima.

Os processos pediculares dos podócitos formam poros que variam de 25 a 60 nm (RIELA, 2010), os quais são cobertos por um fino diafragma (RODEWALD & KARNOSKY, 1974; KERJASCHKI, 2001), formado por proteínas, tais como a

nefrina, podocina e sinaptopodina, tendo papel fundamental na retenção de proteínas circulantes do sangue (YAMASHITA *et al.*, 2016). Devido à alta seletividade da barreira de filtração glomerular às proteínas a proteinúria é intimamente correlacionada com doenças progressivas renais, sendo a albumina a principal proteína perdida no filtrado glomerular. Por isso, a proteinúria tem sido extensivamente pesquisada como um marcador de doenças renais (BAINES & BRUNSKILL, 2008).

Os túbulos renais são formados por células epiteliais polarizadas, devido às diferenças entre as características de transporte de suas membranas apical e basolateral. A membrana basolateral é rica em Na^+/K^+ ATPase, a qual fornece a força motriz para a extrusão de sódio intracelular para os capilares peritubulares, mantendo o gradiente eletroquímico de sódio. Tal gradiente será responsável pela entrada de sódio na célula tubular através dos transportadores presentes na membrana apical (ZHUO & XIAO, 2013).

A primeira parte do túbulo renal é chamada de túbulo proximal, sendo constituído de três segmentos: S1 e S2 conhecidos por parte convoluta e S3 conhecida como parte retificada. As células da parte convoluta são colunares e ricas em microvilosidades que formam uma borda em escova (RIELA, 2010). Além das microvilosidades, o segmento S1 apresenta diversos compartimentos endocíticos e um sistema vacuolar lisossomal bem desenvolvido, e, portanto, uma maior área de superfície luminal para o transporte e a função de endocitose. Além disso, tal segmento possui numerosos processos interdigitais em sua membrana basolateral, os quais são ricos em mitocôndrias e complexo de Golgi. Tais características resultam na capacidade altamente absorviva do segmento S1, responsável, por reabsorver boa parte do sódio, bem como aminoácidos, glicose e outros solutos filtrados pelo glomérulo (ZHUO & XIAO, 2013).

Ao todo, 60 a 70% da carga filtrada de água, sódio e cloro são reabsorvidas pelo túbulo proximal. A reabsorção de sódio é dependente do cotransporte com glicose, aminoácidos, hidrogênio e outros solutos e ocorre de maneira passiva, a favor do gradiente eletroquímico de sódio. A reabsorção de sódio ocorre de maneira isosmótica, ou seja, sem alteração de concentração e osmolaridade entre o ultrafiltrado plasmático e o plasma, uma vez que todo sódio reabsorvido é acompanhado pela mesma quantidade de água. A reabsorção de cloro ocorre tanto pela via paracelular quanto pela transcelular, em especial na porção

reticulada do túbulo. O túbulo distal constitui-se do segmento ascendente espesso da alça de Henle (*pars recta*), mácula densa e do túbulo contornado distal (*pars convoluta*), formados por células epiteliais de aparência cuboide com função principal no transporte de cloreto de sódio através de transporte ativo de sódio pela Na⁺/K⁺ ATPase e passivo de cloro, além do cotransporte de sódio, potássio e cloro (RIELA, 2010).

1.4. Efeitos da proteinúria sobre o túbulo renal

A maioria das doenças renais que, em última instância, conduzem à insuficiência renal em estágio final está associada à proteinúria (REISER *et al.*, 2010). A perda de proteínas na urina acelera a progressão da DRC através de várias vias, incluindo a indução da expressão de quimiocinas tubulares e a ativação do sistema complemento o que acarreta na infiltração de células inflamatórias como macrófagos no interstício e em fibrose (ABATTE *et al.*, 2006).

As proteínas filtradas para o túbulo podem formar aglomerados que o obstruem fisicamente, como demonstrado pelo trabalho de Bertani *et al.*, (1986), o qual evidenciou que a entrada maciça de proteínas circulantes no túbulo conduz à formação de aglomerados proteicos no lúmen dos túbulos distais que aumentam progressivamente de tamanho, causando obstrução seguida de rompimento da membrana tubular. Os túbulos proximais obstruídos por aglomerados proteicos sofrem necrose seguida de atrofia, ocorrendo, posteriormente, o encolhimento e colapso do glomérulo ligado àquele túbulo (TANNER & EVAN, 1989).

Além da lesão devido à obstrução física que os aglomerados proteicos causam, a proteinúria tem papel fundamental na lesão tubular por reação inflamatória acompanhada de fibrose intersticial (MEYER, 2003). Como apontado por Zoja *et al.*, (1989), a albumina, bem como outras proteínas circulantes do plasma sanguíneo, induz a síntese e liberação de endotelina 1 (ET-1) pela membrana basolateral das células do túbulo proximal, favorecendo a reação inflamatória intersticial. O ET-1 possui ação vasoconstritora, além de estimular a infiltração de monócitos, a proliferação celular renal e produção de matriz extracelular agindo como mediador da lesão progressiva renal. Na GESF experimental, foi verificado que além do aumento da produção de ET-1, ocorre a superexpressão de outros

fatores com ação fibroblástica, os quais estimulam a produção de matriz extracelular, atuando na formação da lesão fibrótica do túbulo renal, tais como o PDGF e o TGF- β (MEZZANO, 2000), sendo que a fibrose intersticial pode levar à obstrução do túbulo (MEYER, 2003).

A albumina também atua na ativação e síntese de sinais quimiotáticos pelas células do túbulo proximal, os quais atraem leucócitos para o interstício (MEZZANO, 2000), tais como MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos tipo 1) (WANG *et al.*, 1997), RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*), um potente quimiotático de macrófagos e linfócitos T (ZOJA *et al.*, 1997) e interleucina-8 (IL-8), a qual atua no recrutamento de linfócitos e neutrófilos (TANG *et al.*, 2003). O recrutamento de macrófagos pelas células tubulares contribui para o surgimento de fibrose, uma vez que, como apontado no trabalho de Abbate *et al.*, (2002), o aumento da infiltração de macrófagos é seguido de um aumento da expressão de TGF- β , o qual induz à expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) e a produção de matriz extracelular pelos miofibroblastos presentes no túbulo proximal (FIGURA 3, modificada a partir de Abbate *et al.*, 2006).

Outro mecanismo que pode levar à lesão tubular inflamatória é ativação do sistema complemento, o qual pode ocorrer quando proteínas circulantes envolvidas na ativação do sistema complemento como a C3, são filtradas para o túbulo (ABBATE *et al.*, 2006). Além disso, as células epiteliais do túbulo renal também são capazes de sintetizar proteínas do sistema complemento pela via alternativa, como evidenciado por Biancone *et al.*, (1994).

Nakajima *et al.*, (2004), após tratamento de culturas de células tubulares com albumina, evidenciou que a albumina, assim como algumas citocinas, induz a ativação de proteínas STAT (signal transducer and activator of transcription), mediante a via de sinalização da Jak-2 pelas células do túbulo proximal, sendo que a STAT 1 e 5 são ativadas logo após o contato das células com albumina (cerca de 15 minutos), enquanto a STAT 3 tem ativação tardia, cerca de 4 horas após o tratamento.

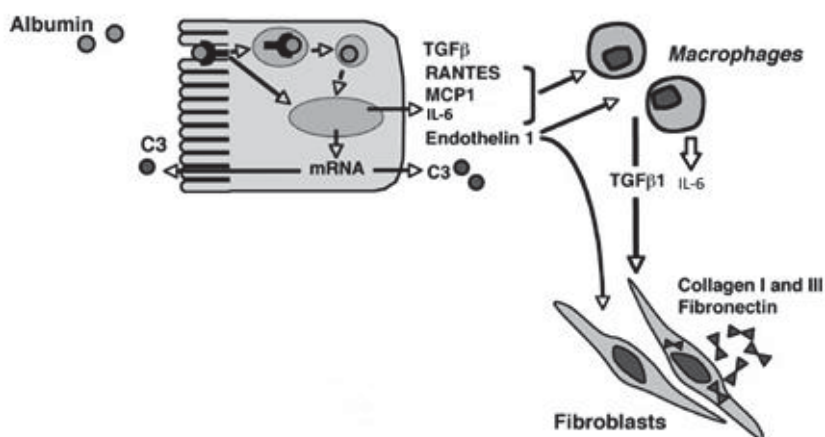


Figura 3: **Ativação de vias inflamatórias e fibrogênicas nas células epiteliais tubulares proximais em decorrência da proteinúria.** A ativação do complemento pode promover lesão através da formação de complexos de ataque à membrana e produtos biologicamente ativos, como C3a, que interagem com receptores específicos. Os monócitos / macrófagos contribuem para a fibrose pela liberação de TGF-β, o que estimula a formação de miofibroblastos e deposição de colágeno e transformação mesenquimal epitelial. Modificado de Abbate *et al.*, (2006).

1.5. A via de sinalização da STAT-3

A STAT-3 é um fator de transcrição envolvido, dentre outras funções, na diferenciação, migração e proliferação celular, sendo que sua ativação ocorre em resposta a vários fatores de crescimento e citocinas. A ligação da IL-6, por exemplo, ao seu complexo receptor, leva à ativação da via STAT-3 (RAWLINGS *et al.*, 2004).

O complexo receptor mediador das atividades biológicas da IL-6 consiste na glicoproteína transmembrana do tipo I de ligação à IL-6 denominada IL-6R e na proteína transdutora de sinal transmembrana gp130 (SCHELLER *et al.*, 2011) (FIGURA 4, modificada a partir de CALABRESE & ROSE-JOHN, 2014).

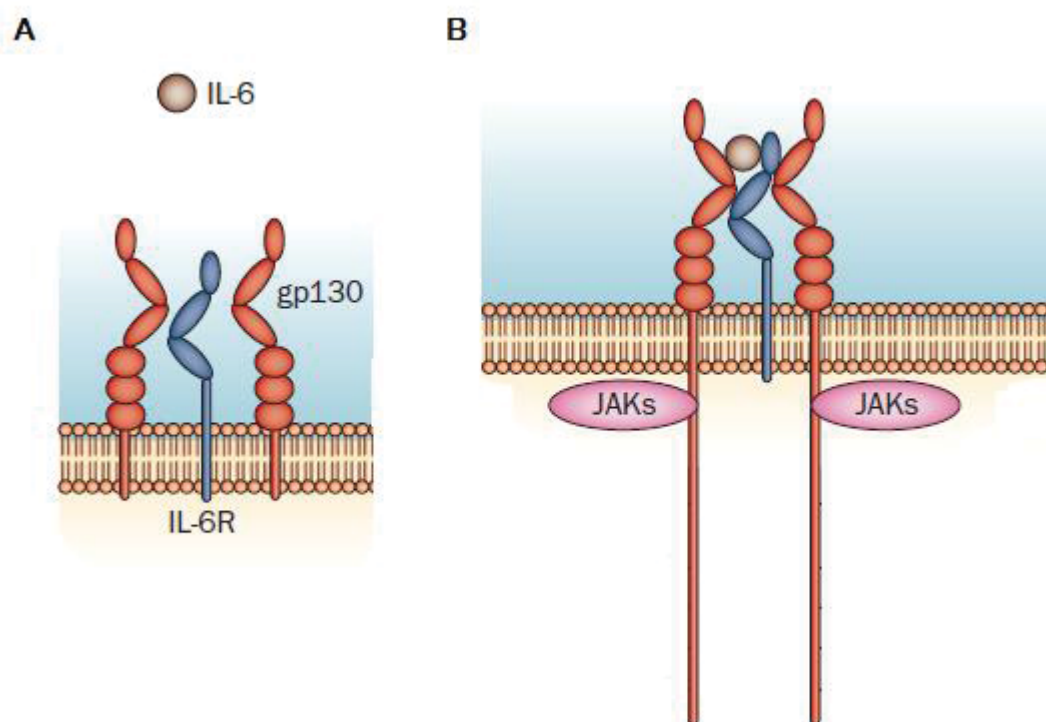


Figura 4: **Complexo receptor de IL-6.** A: O IL-6R é formado pela glicoproteína transmembrana IL-6R e pela proteína transdutora de sinal transmembrana gp130. B: O complexo IL-6-IL-6R se associa com a proteína gp130, iniciando a sinalização intracelular. Nem a IL-6 nem o IL-6R têm uma afinidade mensurável com a gp130; somente o complexo se liga a gp130. Figura modificada a partir de Calabrese & Rose-John (2014)

A proteína gp130 está associada de forma não covalente a uma tirosina quinase da família das Janus quinases (JAKs), as quais se tornam autofosforiladas após o envolvimento do receptor com a IL-6 e em seguida fosforilam resíduos de tirosina (HEINRICH *et al.*, 2003) como a tirosina 705, localizada próximo ao carbono terminal da STAT-3. A STAT-3 fosforilada forma dímeros que se translocam para o núcleo, onde regulam a transcrição de genes específicos (RAWLINGS *et al.*, 2004; PANG *et al.*, 2010) (FIGURA 5, modificado a partir de PEDRANZINI *et al.*, 2004).

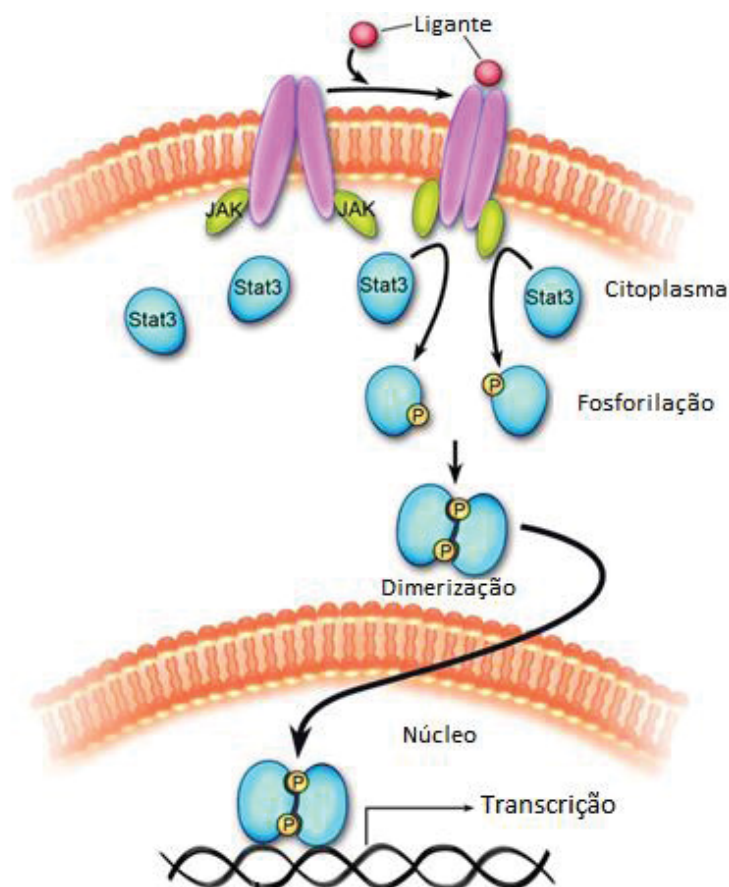


Figura 5: **Modelo de sinalização da via STAT-3.** O fator de transcrição é ativado em resposta a muitas citocinas e fatores de crescimento, como a IL-6, que se ligam aos receptores na membrana plasmática. Após a ligação, as moléculas de STAT-3 são recrutadas para a membrana plasmática, onde serão ativadas via fosforilação de um resíduo de tirosina. A ativação da STAT-3 induz a dimerização através da interação recíproca de fosfotirosina-SH2 entre duas moléculas de STAT-3. Os dímeros de STAT-3 então deslocam para o núcleo onde se ligam a sequências consenso no promotor de genes alvo, ativando sua transcrição. Modificado a partir de Pedranzini *et al.*, 2004.

Vários mecanismos de regulação negativa das vias JAK/STAT já foram identificados, tais como as fosfotirosinas fosfatases (PTPs), as proteínas inibidoras da STAT ativada (PIAS) e os supressores da sinalização de citocinas (SOCS) (SHUAI & LIU, 2003).

As proteínas SOCS formam uma família de oito membros (SHUAI & LIU, 2003) que apresentam um domínio SH2 flanquado por um domínio amino terminal variável e uma sequência de 40 aminoácidos em uma região C-terminal, denominada SOCS box (KILE, *et al.*, 2002). São expressas, geralmente, em níveis baixos nas células não estimuladas, sendo rapidamente induzidas por citocinas e inibindo assim a sinalização JAK/STAT, através de mecanismos distintos, os quais

representam alças de retroalimentação negativa clássicas (GREENHALGH & HILTON, 2001).

A SOCS-3 inibe a ativação da STAT-3 por se ligar, simultaneamente, ao receptor de citocina gp 130 e à JAK, utilizando duas superfícies opostas. Enquanto, o sulco de ligação à fosfotirosina no domínio SH2 da SOCS-3 é ocupado pelo receptor gp 130, um subdomínio da proteína é também requerido para inativar a ação enzimática da JAK, bloqueando sua ligação com o substrato (CAROW & ROTTENBERG, 2014) (FIGURA 6, modificado a partir de CAROW & ROTTENBERG, 2014).

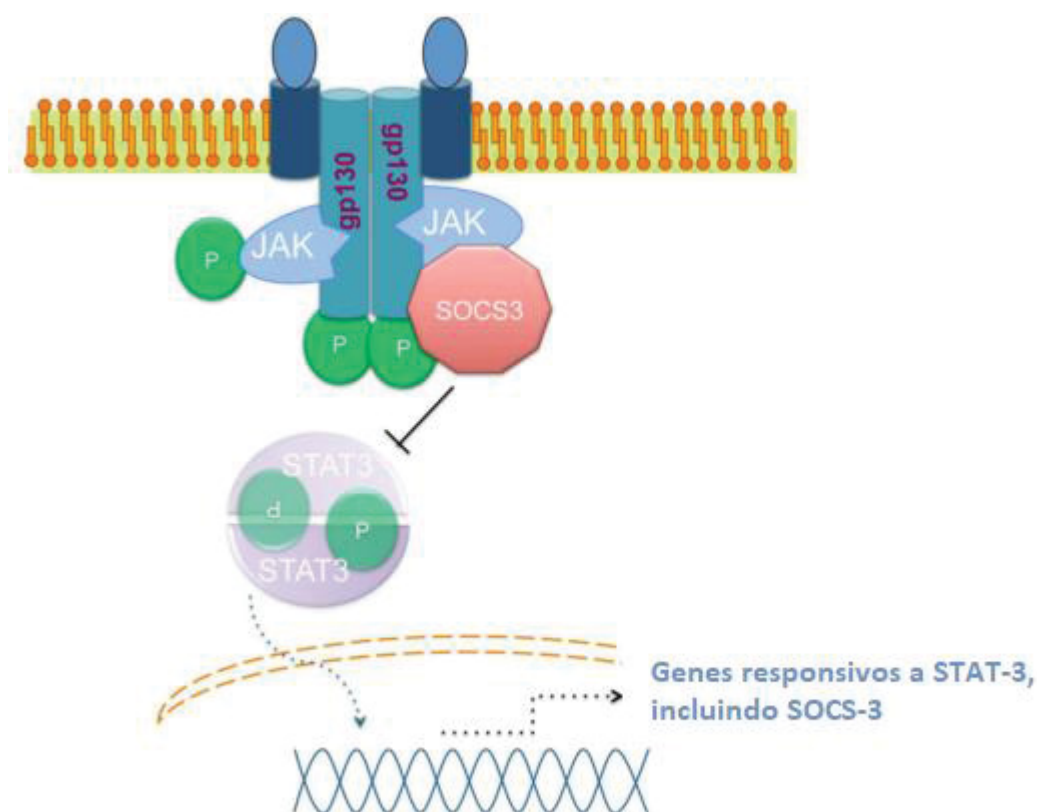


Figura 6: **Mecanismo de ação da SOCS-3 na inativação da via de sinalização STAT-3.** A proteína SOCS-3 se liga simultaneamente ao receptor de citocina gp 130 e à JAK, inibindo a fosforilação da STAT-3 e consequentemente a formação dos dímeros e translocação desses para o núcleo, resultando na diminuição da transcrição de genes respondivos à STAT-3, incluindo os que codificam para SOCS-3, caracterizando assim, uma alça de retroalimentação negativa. Modificado a partir de Carow & Rottenberg (2014).

Nas células renais, a sinalização através da via STAT-3 é importante para a resposta às lesões e a progressão de certas doenças renais (CHUANG & HE, 2010).

Tal fato tem sido explicitado por vários trabalhos, que demonstraram o relevante papel da STAT-3 na progressão da DRC, através da modulação da fibrose intersticial. Pang *et al.*, (2010), evidenciou, através de análise *in vivo* que há elevada fosforilação e ativação de STAT-3 em túbulos renais obstruídos com fibrose, corroborando com os achados de Kuratsune *et al.*, (2007), o qual observou o aumento de STAT-3 fosforilada em fibroblastos intersticiais do tecido fibrótico renal, bem como o aumento da expressão de miofibroblastos em túbulos renais com fibrose induzida por obstrução ureteral unilateral (UUO).

A ativação da STAT-3 leva ao aumento da expressão α -SMA e fibronectina, tanto nas células tubulares quanto nas células intersticiais renais (KURATSUNE *et al.*, 2007; PANG *et al.*, 2010)

Mais recentemente Bienaimé *et al.*, (2016) apresentou o importante papel que a via STAT-3 tem no estímulo da ativação de fibroblastos intersticiais, orquestrando a comunicação das células tubulares e intersticiais, e como a inativação da STAT-3 reduz a expressão de genes que promovem a acumulação de matriz extracelular e a lesão tubulointersticial.

Sendo assim, a STAT-3 é apontada como um relevante fator na progressão à doença renal crônica, podendo ter papel importante na glomeruloesclerose segmentar e focal.

1.6. O modelo experimental

O modelo experimental de nefropatia utilizado nesse trabalho foi a GESF primária induzida pelo quimioterápico adriamicina (doxorubicina) (ADM), um antibiótico antraciclínico citotóxico isolado de culturas de *Streptomyces peucetius var. caesius*, utilizado no tratamento de neoplasias, o qual, em roedores mimetiza a lesão estrutural e funcional, causando lesão muito semelhante a da doença renal proteinúrica crônica de humanos (LEE & HARRIS, 2011), nos quais, essa nefrotoxicidade é rara (ZHENG *et al.*, 2005).

A ação da ADM ocorre em decorrência da lesão dos podócitos devido aos danos oxidativos na estrutura da célula através da redução direta a um radical semiquinona ou através da produção de espécies reativas de oxigênio (FOGO, 2003). Além disso, a droga leva à diminuição da espessura da camada de superfície

endotelial glomerular, como demonstrado no trabalho de Jeansson *et al.*, (2009), o qual verificou que ratos que desenvolveram proteinúria a partir do tratamento com adriamicina apresentavam a camada de superfície endotelial glomerular com apenas 20% da espessura normal. Tais alterações são resultado na regulação para baixo de certos proteoglicanos e enzimas necessárias na produção do glicocálix e consequente diminuição da seletividade da barreira de filtração e albuminúria (JEANSSON *et al.*, 2009). Outra característica da ação da adriamicina nos glomérulos é a retração ou perda dos processos pediculares dos podócitos (KERJASCHKI, 1994).

O modelo de nefropatia induzida por adriamicina (MNIA) é largamente utilizado devido às suas vantagens, tais como a facilidade de sua reprodução em laboratório, o elevado grau de lesão tecidual associado a uma taxa de mortalidade aceitável (<5%), morbidade (perda de peso), e o fato do tempo de lesão ser consistente e previsível, uma vez que o modelo é caracterizado pela indução de lesão renal dentro de alguns dias da administração do fármaco (LEE & HARRIS, 2011). Outro fato interessante no uso da ADM é que este quimioterápico causa, tanto lesões glomerulares, quanto lesões tubulares, como demonstrado por Okuda *et al.*, (1986), o qual verificou que ratos tratados com a droga apresentam esclerose glomerular, obstrução e dilatação tubular por aglomerados proteicos e fibrose intersticial com infiltração de monócitos característicos da GESF.

O modelo de indução de nefropatia por adriamicina foi descrito por Okuda *et al.*, (1986) em ratos, o qual utilizou duas doses de 2 mg/kg de ADM, injetadas com intervalo de 20 dias, em um protocolo de 28 semanas. Wang *et al.*, (2000) observou que em camundongos da linhagem BALB/c, a mesma dose induz proteinúria evidente a partir do quinto dia, a qual permanece elevada durante todo as 6 semanas de estudo. Também observou vacuolização glomerular e glomeruloesclerose focal discreta na quarta semana, a qual é exacerbada na sexta semana passando para uma glomeruloesclerose focal extensa e até mesmo global associada à expansão intersticial moderada e inflamação grave.

No trabalho de Jeansson *et al.*, (2009), o modelo clássico foi adaptado, sendo utilizado uma dose de 25 mg/kg de adriamicina, uma vez que foi observado que na linhagem de camundongos C57BL/6, comumente utilizada, a dose de 10 mg/kg não induz a lesão renal e proteinúria, contudo, tal linhagem se mostrou responsiva a doses maiores.

1.7. A inativação da via de sinalização STAT-3

Bienaimé *et al.*, (2016), demonstrou que o depósito de matriz extracelular no interstício renal desempenha um papel central na progressão da DRC, sendo a ativação tubular de STAT-3 responsável por tal depósito. Em seu trabalho, o autor evidenciou que a inativação túbulo específica da via reduz a expressão de genes que promovem o acúmulo de matriz extracelular e consequente diminuição da progressão da DRC.

Pang *et al.*, (2010), também demonstrou que a inativação da STAT-3 diminui a expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA), colágeno do tipo I e da fibronectina característica de tecido fibrótico, bem como atenua a deposição dos componentes da matriz extracelular. Neste trabalho, a inativação da STAT-3 foi realizada utilizando o inibidor seletivo *Stat Three Inhibitory Compound* (STATTIC), o qual inibe a dimerização da STAT-3 e consequente translocação para o núcleo, pela interação com o domínio SH2 da proteína (SCHUST *et al.*, 2006; McMURRAY, 2006) (FIGURA 7, modificado a partir de SCHUST *et al.*, 2006).

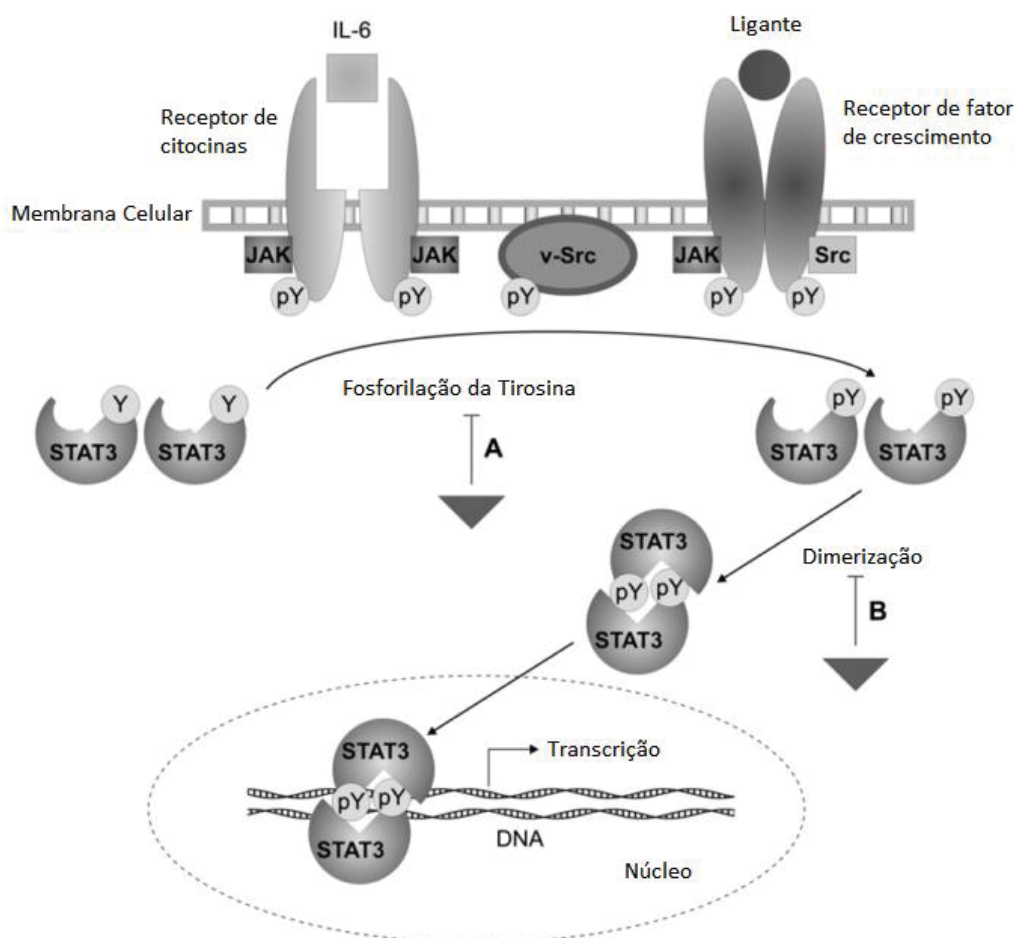


Figura 7: **A inibição da via STAT-3 pela STAT3IC.** A: a molécula inibidora STAT3IC impede a fosforilação da STAT-3, por se ligar ao domínio SH2 da proteína. B: STAT3IC também inibe a dimerização de moléculas de STAT-3 que escaparam à inibição da fosforilação. Modificado a partir de Schust *et al.*, (2006).

1.8. Justificativas

Segundo Malafronte *et al.*, (2006) a GESF é a glomerulopatia primária mais comum no Brasil, acometendo 29.7% dos pacientes. As TRS geram custos em torno de R\$ 2 bilhões por ano de acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia, causando grande preocupação ao Ministério da Saúde, pois este subsidia por volta de 95% do tratamento (MALAFRONT, *et al.*, 2006). Fato que agrava ainda mais o quadro é que 30% dos pacientes com GESF desenvolvem recorrência da doença após o transplante renal, levando a perda do rim transplantado, sendo que o risco de perda de segundo rim transplantado em pacientes que já perderam o primeiro pode chegar a 100% (PONTICELLI & GLASSOCK, 2010).

O modelo de indução de nefropatia por adriamicina é bem estabelecido na literatura, tanto em ratos quanto em camundongos. No entanto, são comumente utilizados animais de linhagem geneticamente homogênea como os BALB/c e os C57bl/6. A GESF, contudo, apresenta caráter heterogêneo, possuindo diferentes subtipos com etiologias distintas, padrões de lesão, forma de progressão e resposta à terapia o que dificulta o tratamento e a remissão da doença.

A fim de desenvolver um modelo experimental condizente com a realidade dos pacientes com GESF, no que diz respeito à variabilidade genética, neste trabalho foi utilizado uma linhagem geneticamente heterogênea de camundongos, a *swiss*, bem como duas doses únicas de adriamicina, sendo a dose de 10 mg/kg, comumente utilizada e a dose utilizado no modelo adaptado de 25 mg/kg.

Estudos recentes têm demonstrado o importante papel da via STAT-3 na progressão da DRC e como sua inativação leva a diminuição da lesão renal e fibrose tubulointersticial (Bienaimé *et al.*, 2016), porém, ainda não há trabalhos explicando o papel desse fator de transcrição na progressão da GESF, especificamente.

Os modelos experimentais de GESF, como o induzido pela adriamicina, não explicam os mecanismos pelos quais a droga desencadeia os danos tubulares e como esses danos podem contribuir com as lesões glomerulares. Por isso, uma investigação mais aprofundada é necessária, para elucidar não somente os mecanismos que levam às lesões, mas também possíveis alvos terapêuticos.

Tendo em vista a dificuldade no tratamento da GESF, uma vez que muitos pacientes não respondem à corticoterapia, associada à alta taxa de mortalidade e morbidade presentes na GESF, a STAT-3 se mostra um alvo terapêutico em potencial. Sendo assim, é de extrema importância o estudo aprofundado sobre o papel dessa via de sinalização na progressão da GESF.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo avaliar o papel da via de sinalização pela STAT-3 nas lesões renais presentes na glomeruloesclerose segmentar e focal e sua interferência na progressão da doença.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a albuminúria no modelo de nefropatia induzida por adriamicina em camundongos heterogêneos.
- Avaliar a albuminúria após a inativação da via de sinalização STAT-3 em camundongos heterogêneos.
- Avaliar a expressão proteica de STAT-3 no tecido renal de animais submetidos a nefropatia induzida por ADM.
- Avaliar a expressão de mRNA de STAT-3, IL-6, receptor de IL-6 e SOCS-3 no tecido renal no modelo de nefropatia induzida por adriamicina em camundongos heterogêneos.
- Avaliar a expressão proteica de STAT-3 no tecido renal após a inativação da via de sinalização STAT-3 em camundongos heterogêneos.
- Avaliar a expressão de mRNA de STAT-3, IL-6, receptor de IL-6 e SOCS-3 no tecido renal após a inativação da via de sinalização STAT-3 em camundongos heterogêneos .

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem *Swiss* com oito semanas de idade originados do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos no biotério, acondicionados em caixas coletivas, contendo cinco animais por caixa, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de cerca de 20°C e com suprimentos de água e alimento autoclavados disponíveis durante todo o tempo.

Os procedimentos foram realizados de acordo com a lei federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, com a regulamentação do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal e aprovação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais

do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), sob o número 957.

3.2. Drogas

Para a indução da lesão renal foi utilizada adriamicina (Adriblastina®) da marca Pfizer (Pfizer™, Inc. Nova Iorque, USA). Para a inibição da via de sinalização STAT-3 foi utilizada STATTIC da marca Abcam (Abcam™, Inc., Cambridge, MA).

3.3. Desenho experimental

Os experimentos foram realizados utilizando dois protocolos distintos de nefropatia induzida por adriamicina. A droga foi injetada em dose única por via intravenosa através da veia caudal. Foram utilizadas as doses de 10 mg/kg e 25 mg/kg.

Os experimentos com dose de 10 mg/kg de ADM tiveram duração de 7 e 14 dias (Figura 8), enquanto os com dose de 25 mg/kg duraram 5 dias (Figura 9). Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo: 1) grupo controle; 2) grupo ADM, tratados apenas com adriamicina; 3) grupo ADM+ STATTIC, tratados com adriamicina e STATTIC; 4) grupo STATTIC, tratado apenas com STATTIC.

Anteriormente à injeção da ADM, os animais foram pesados e tiveram sua urina basal coletada. O grupo controle recebeu, por via intravenosa, solução fisiológica 0,9%.

Nos experimentos com a menor dose, os grupos ADM+STATTIC e STATTIC, receberam o inibidor de STAT-3 por via intravenosa na concentração de 2 mg/kg em dias alternados, enquanto isso, para os animais que receberam 25 mg/kg, a STATTIC foi administrada uma vez ao dia durante os 5 dias de experimento também na concentração de 2 mg/kg e através da via intravenosa. Além disso, os animais foram suplementados com 2 mL de soro glicosado (5%) duas vezes ao dia por via intraperitoneal, a fim de evitar desidratação, como citado por Jeansson, *et al.*, (2009).

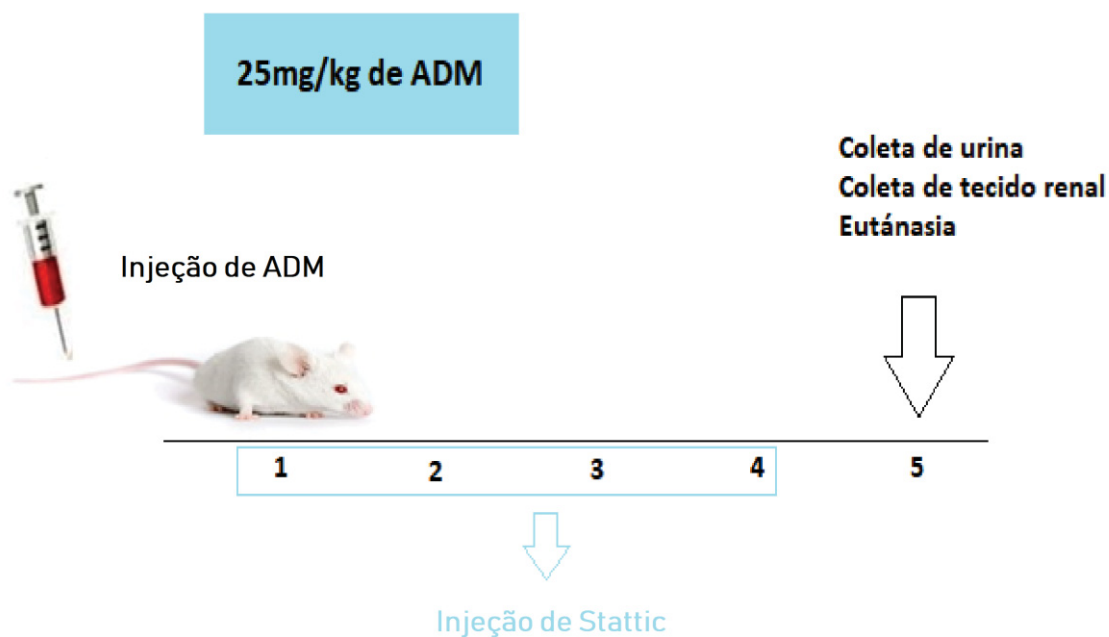


Figura 8: **Desenho experimental do modelo de indução de nefropatia por ADM na dose de 25 mg/kg.** O modelo teve duração de 5 dias, sendo que o STATTIC foi injetado diariamente.

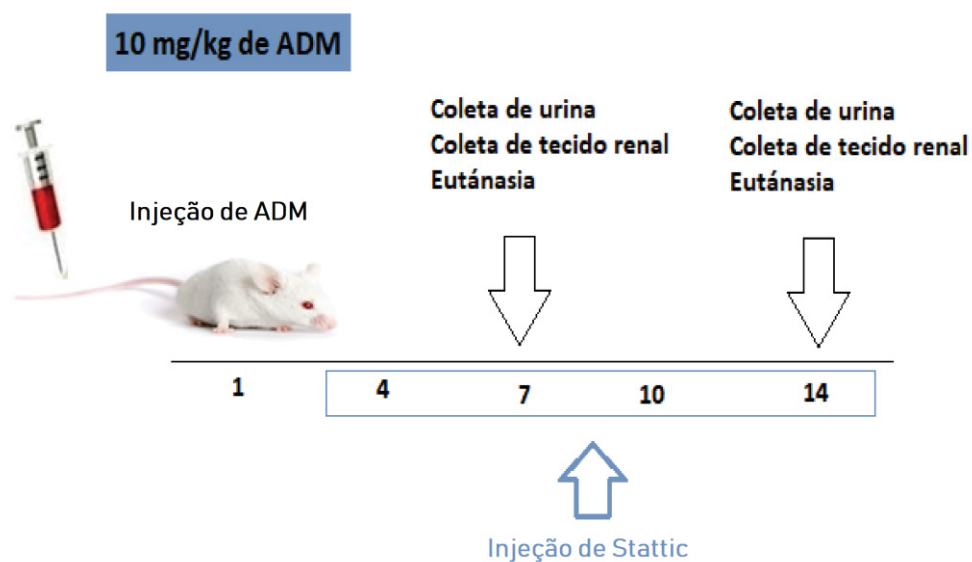


Figura 9: **Modelo experimental de nefropatia induzida por ADM na dose de 10 mg/kg.** Os experimentos com a dose clássica de 10 mg/kg tiveram duração de 7 e 14 dias, sendo que a STATTIC foi injetada em dias alternados.

3.4. Eutanásia e coleta dos materiais

Ao final dos experimentos, foi coletado a urina, sangue e os rins dos animais para as análises posteriores e realizado a eutanásia dos mesmos.

A eutanásia dos animais ocorreu mediante anestesia prévia com solução de xilasina e cetamina (16 mg/kg e 150 mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal. O sangue foi coletado por punção cardíaca, centrifugado e o plasma sanguíneo congelado. A urina foi coletada diretamente da bexiga urinária e congelada. O rim esquerdo foi coletado, descapsulado e um corte longitudinal realizado a fim de dividi-lo em duas metades, as quais foram armazenadas em solução de formol 10%. O rim direito foi coletado, descapsulado e cortado transversalmente em pedaços que foram armazenados, durante a coleta, em nitrogênio líquido e posteriormente em freezer à -80°C .

3.5. Estimativa da albuminúria

Para estimar a proteinúria, foi usada como parâmetro a quantidade de albumina na urina, uma vez que essa é a proteína plasmática mais abundante. A estimativa da albuminúria foi realizada através de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%, método que consiste na migração de partículas carregadas sob a influência de um campo elétrico em uma matriz viscosa, sendo que a mobilidade eletroforética das partículas é diretamente proporcional à carga e inversamente proporcional à viscosidade do meio.

Para tanto, a urina foi diluída numa concentração 1:20 e misturada a uma solução tampão contendo o agente redutor β -mercaptoetanol, que quebra as ligações dissulfeto (S-S) dos resíduos de cisteína, mantendo assim, as proteínas separadas e linearizadas. O gel foi corado com azul de Coomassie e a quantificação da albuminúria foi realizada no fotodocumentador modelo Amersham Imager 600 da General Electric®.

3.6. Uroanálise com tiras reagentes

Foi utilizado o kit de uroanálise UriAction 10® da Labtest (Labtest Diagnóstica S.A. MG, Brasil), que consiste em fitas reagentes para a determinação semiquantitativa rápida de glicose, bilirrubina, corpos cetônicos (ácido cetoacético), densidade, sangue, pH, proteína, urobilinogênio, nitrito e leucócitos na urina, através de método colorimétrico.

3.7. Análise histológica

As análises histológicas foram realizadas a partir de testes do tipo duplo cego. Para tanto, fragmentos dos rins dos animais foram corados com hematoxilina e eosina, e as lesões glomerulares, tubulares e a fibrose intersticial analisadas em microscópio óptico.

Foram analisados 12 campos aleatórios de cada lâmina contendo o corte do fragmento renal. Este corte foi dividido em quatro regiões e três campos de cada região foi representado. Foi utilizada câmera fotográfica acoplada ao microcomputador contendo o programa AxionVision da Zeiss® (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha)

Os campos foram analisados e foi considerado: ausente (quando não havia alterações no campo analisado), leve (alteração presente, porém, em até no máximo 10% do campo), moderada (alteração de 10% a 50% do campo) e intensa (alteração em mais de 50% do campo).

Os parâmetros para a descrição de lesão tubular incluíram vacuolização celular e intracelular, colapso e distensão tubular. A fibrose intersticial foi caracterizada pela expansão da matriz celular com distorção, colapso e espessamento da membrana basal e a extensão da lesão tubular nos túbulos foi quantificada. Foram analisadas: necrose tubular aguda (NTA), fibrose tubulo-intersticial (FTI) e presença de células inflamatórias (mais de cinco células por campo analisado foi considerado presença de inflamação).

3.8. PCR em tempo real

Os rins coletados para PCR em tempo real (qPCR) foram armazenados durante a coleta em nitrogênio líquido e depois guardados a uma temperatura de -80°C até a realização do procedimento. O RNA total foi extraído utilizando PureZOL® (Bio Rad, Califórnia, USA). Após a extração, o RNA total foi purificado e sua concentração determinada através do espectrofotômetro NanoDrop® (NanoDrop Technologies, Inc., DE, EUA) a 260 nm. Cada amostra de RNA total teve sua integridade conferida através de eletroforese em gel de 1% de agarose. Após isso, foram armazenadas novamente para serem utilizadas na preparação do cDNA e na análise dos marcadores escolhidos por qPCR posteriormente.

O cDNA foi sintetizado utilizando a enzima transcriptase reversa da marca Bio-Rad® (Bio Rad, Califórnia, USA). A qPCR foi realizada utilizando SYBR Green® (Bio Rad, Califórnia, USA) para quantificar os mRNAs para STAT-3, IL-6, IL-6R e SOCS-3. Como normalizador foi utilizado o mRNA do gene HPRT e os resultados foram analisados pelo método de quantificação relativa de acordo com a fórmula $10,000/2^{\Delta Ct}$. Os primers foram sintetizados baseando-se na seqüência conhecida de bases nitrogenadas descritas no GenBank, e o programa Primer Express da Applied Biosystems. As seqüências dos primers utilizados são descrito na tabela 3.

Tabela 3: Primers utilizados na PCR em tempo real.

Nome da Sequência	Sequência 5' - 3'
HPRT sense	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC
HPRT anti-sense	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC
SOCS-3 sense	GGGTGGCAAAGAAAAGGAG
SOCS-3 anti-sense	GTTGAGCGTCAAGACCCAGT
STAT-3 sense	GGATCGCTGAGGTACAACCC
STAT-3 anti-sense	GTCAGGGGTCTCGACTGTCT
IL-6 sense	CCTCTGGTCTTCTGGAGTACC
IL-6 anti-sense	ACTCCTTCTGTGACTCCAGC
IL-6 R sense	AAGAGTGACTTCCAGGTGCC
IL-6 R anti-sense	GGTATCGAAGCTGGAAGTGC

3.9. Western Blot

A expressão proteica de STAT-3 foi quantificada através da técnica de western blot, a qual consiste na detecção de proteínas específicas em um tecido através de anticorpos.

Para tanto, os rins coletados foram armazenados durante a coleta em nitrogênio líquido e depois guardados a uma temperatura de -80°C até a realização do procedimento. A extração das proteínas se deu através da maceração do tecido em tampão RIPA, uma solução desnaturante contendo inibidor de protease. A quantificação das proteínas foi realizada através do método de Bradford que se baseia na mudança de cor do corante Coomassie Blue G-250 em solução ácida (cor avermelhada) para cor azulada na presença de proteínas. Para quantificar a concentração de proteínas na amostra foi realizada uma curva de padronização com concentrações conhecidas de albumina *versus* absorvância em 595 nm (comprimento de onda que o complexo proteína-corante absorve). A partir dessa curva, obteve-se a equação de ajuste linear pela qual foi possível substituir os valores médios de absorvâncias das amostras e obter assim, os valores da concentração das proteínas.

Após a quantificação foi realizado o fracionamento das proteínas das amostras em gel de SDS-poliacrilamida a 10% e a transferências dessas proteínas para uma membrana, a qual foi incubada com o anticorpo anti-STAT-3 da marca ABcam® (Abcam, Inc., Cambridge, MA). A revelação da membrana para análise dos dados foi realizado em fotodocumentador Amersham Imager 600 da General Electric®. Como controle foi utilizado o anticorpo anti β - actina da Sigma-Aldrich® (Sigma-Aldrich. St. Louis, Missouri, EUA).

3.10. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism® 6 (GraphPad Software, San Diego, California - EUA). As diferenças entre 2 grupos foi avaliada pelo teste t-student não pareado para variáveis paramétricas e o teste Mann-Whitney para variáveis não paramétricas e no caso de mais de dois grupos foi feito o teste de análise de variância ANOVA unicaudal. Quando as

amostras não apresentaram distribuição normal, foram submetidas à análise de variância ANOVA unicaudal de postos, pelo teste de Kruskal-Wallis. E no caso de diferença, os grupos foram comparados entre si com correção de Student-Newman-Keuls para variáveis paramétricas e correção de Dunn para variáveis não paramétricas. As diferenças foram consideradas significantes quando o valor de p foi menor que 0,05.

4. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Nefropatia induzida por adriamicina na dose de 10 mg/kg

4.1.1. Albuminúria

A proteinúria, em especial a albuminúria, é um dos principais sinais encontrados no modelo de nefropatia induzido por ADM (MNIA). Vários trabalhos já observaram proteinúria significativa em animais tratados com ADM na dose de 10 mg/kg (PEREIRA *et al*, 2012; OKUDA *et al*, 1986; GROND, *et al*, 1988), sendo que a perda de proteínas na urina se deve às alterações sofridas na barreira de filtração glomerular e também pelos danos oxidativos nos podócitos ocasionados pela ADM (HARRIS & LEE, 2011).

Corroborando os dados da literatura anteriormente citados, observamos aumento significativo da excreção de albumina nos animais tratados com ADM (10mg/kg) em relação ao grupo controle 14 dias após a administração da droga, como verificado na figura 10, por outro lado, não observamos diferença significativa na albuminúria desses animais 7 dias após a administração da droga.

Os resultados demonstram que o tratamento com ADM leva ao aumento da albuminúria nesses animais, indicando o desenvolvimento da nefropatia, porém o aparecimento da albuminúria acontece após a primeira semana depois do tratamento, mostrando resistência parcial do desenvolvimento da doença nestes camundongos em comparação com outras linhagens, como os BALB/c utilizados em modelos clássicos (PEREIRA *et al*, 2014). Desta maneira observamos que a nefropatia tem uma progressão mais lenta em camundongos swiss.

Os diferentes subtipos de GESF podem apresentar diferentes padrões de lesões glomérulo escleróticas, bem como diferentes respostas ao tratamento e tempo de progressão da doença. Com base na resposta ao tratamento com esteróides, por exemplo, há dois tipos, sendo àquela que responde ao tratamento com corticóides, na qual a proteinúria se resolve, e a síndrome nefrótica resistente a corticosteróides, na qual a proteinúria não diminui (HAN & KIM, 2016). A maior parte dos pacientes com GESF são córticoresistentes (ABRANTES *et al.*, 2005; HAN & KIM, 2016), o que dificulta ainda mais o tratamento e a remissão da doença, pois, como aponta Moura *et al.*, (2015), responder a corticosteroide representa uma redução de risco de 83% quando se avalia a tendência à progressão para DRC.

A utilização de camundongos geneticamente variáveis, como é o caso da linhagem *Swiss* utilizada nesse trabalho, é importante, pois fornece resultados que são condizentes com a realidade dos pacientes com GESF, no que diz respeito à variabilidade genética, uma vez que a doença não é uniforme na população humana, desta maneira podemos observar que esses camundongos apresentam lenta progressão, porém presente, o que pode vir a contribuir para um maior conhecimento da doença e pode representar um novo modelo na literatura, visto que o MNIA ainda não foi desenvolvido nesta linhagem.

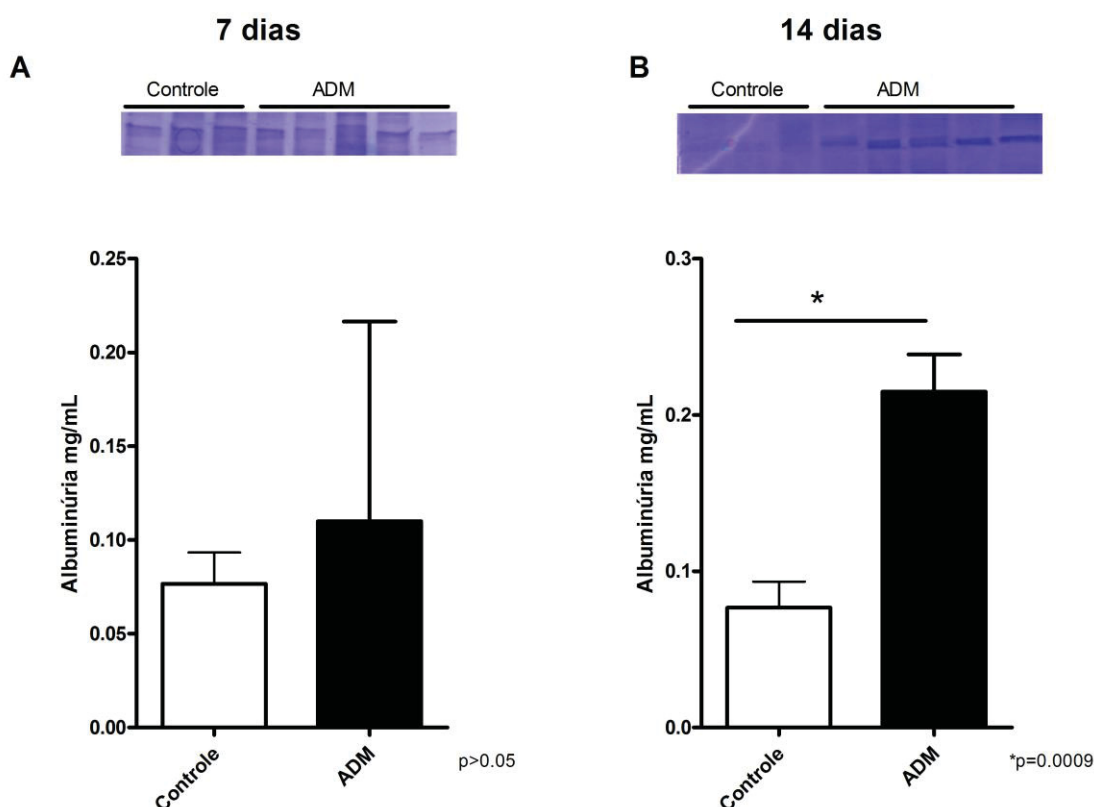


Figura 10: **A administração de ADM na dose de 10mg/kg induz albuminúria em camundongos swiss 14 dias após o tratamento.** A: Não há diferença significativa na albuminúria 7 dias após a administração de ADM na dose de 10 mg/kg ($p > 0.05$). B: Por outro lado, a administração da droga induz significativamente albuminúria nos animais tratados 14 dias após o tratamento ($p = 0.0009$). $n = 10$ animais por grupo de estudo.

4.1.2. Perda de peso.

Outra alteração encontrada nos animais e utilizada para avaliar as características do MNIA foi a perda de peso dos animais durante o desenvolvimento do protocolo.

Observa-se na figura 11 que os animais perderam peso significativamente ($p = 0.0003$), em relação ao grupo controle, 7 dias após a administração de ADM. Esse resultado indica que, apesar de não ter sido encontrado diferença significativa na albuminúria destes animais, a administração da ADM os afetou levando-os a perda de peso corporal.

Por outro lado, 14 dias após a administração da droga não houve diferença na variação de peso corporal dos animais do grupo ADM em relação ao grupo controle ($p > 0.05$). Desta maneira, observamos que a droga debilita os animais nos

primeiros dias após a administração da mesma (verificado pela perda de peso), porém, sistemicamente, os animais se recuperam com o passar do tempo, apesar da doença renal estar progredindo (visto pela albuminúria). Esses dados corroboram o trabalho publicado por Pereira *et al.*, (2011).

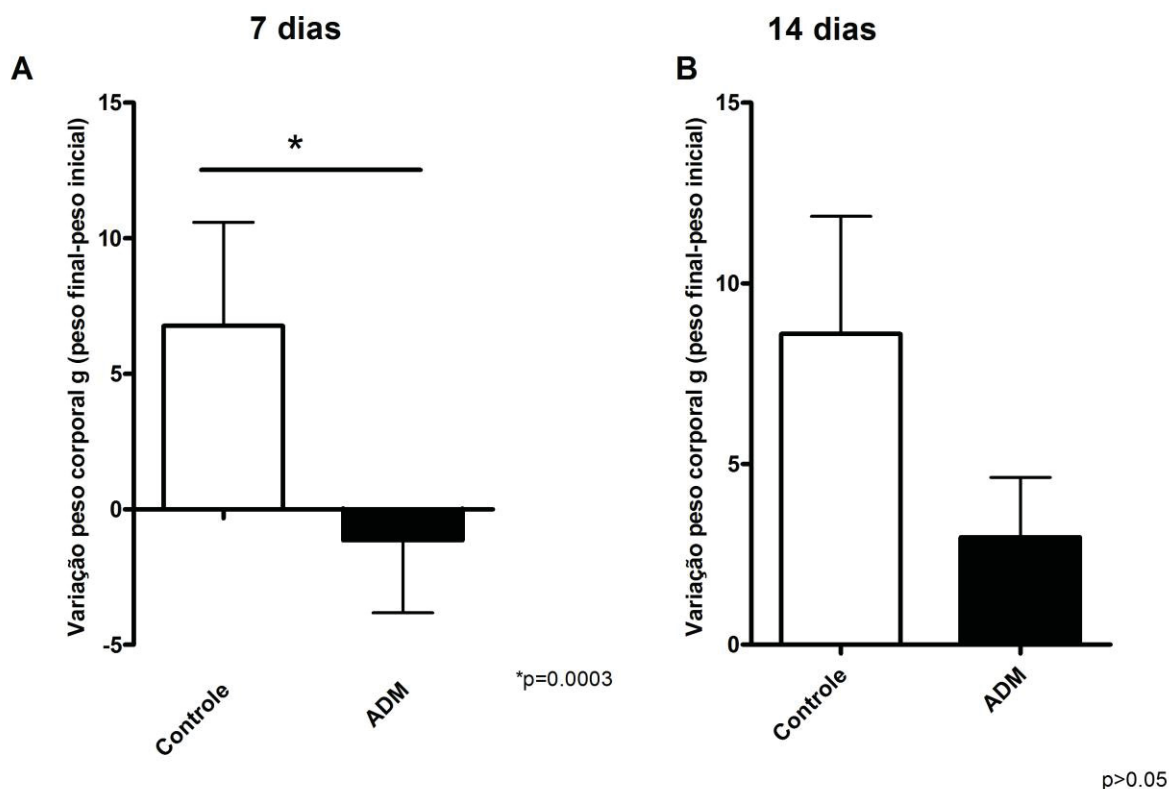


Figura 11: **A administração de ADM na dose de 10 mg/kg causa perda de peso nos camundongos swiss 7 dias após o tratamento.** A: Os animais tratados com 10 mg/kg de ADM perderam peso significativamente 7 dias após a administração da droga ($p=0.0003$). B: não foram observadas diferenças significativas na perda de peso dos animais 14 dias após o tratamento com ADM ($p>0.005$). $n=10$ animais por grupo de estudo.

4.1.3. Análise histológica

As doenças renais progressivas são caracterizadas por apresentarem infiltração intersticial de células mononucleares associadas a lesão gradual da arquitetura tubulointersticial devido, principalmente, ao acúmulo de proteínas de matriz extracelular dentro do espaço intersticial (EDDIE & GIACHELLI, 1995). As respostas inflamatórias com recrutamento de leucócitos mononucleares, através da

ativação via da ciclooxygenase e o estresse oxidativo, têm sido implicadas no desenvolvimento e progressão da GESF (YANG, *et al.*, 2014). Sendo assim, a fibrose, a necrose tubular e o infiltrado de células inflamatórias são marcadores histológicos das DRCs.

Nossos resultados mostraram que a administração de ADM induz aumento de fibrose e necrose tubular, em especial, 14 dias após o tratamento com a droga, e que houve uma tendência, porém não significativa, de aumento no infiltrado celular (FIGURA 12).

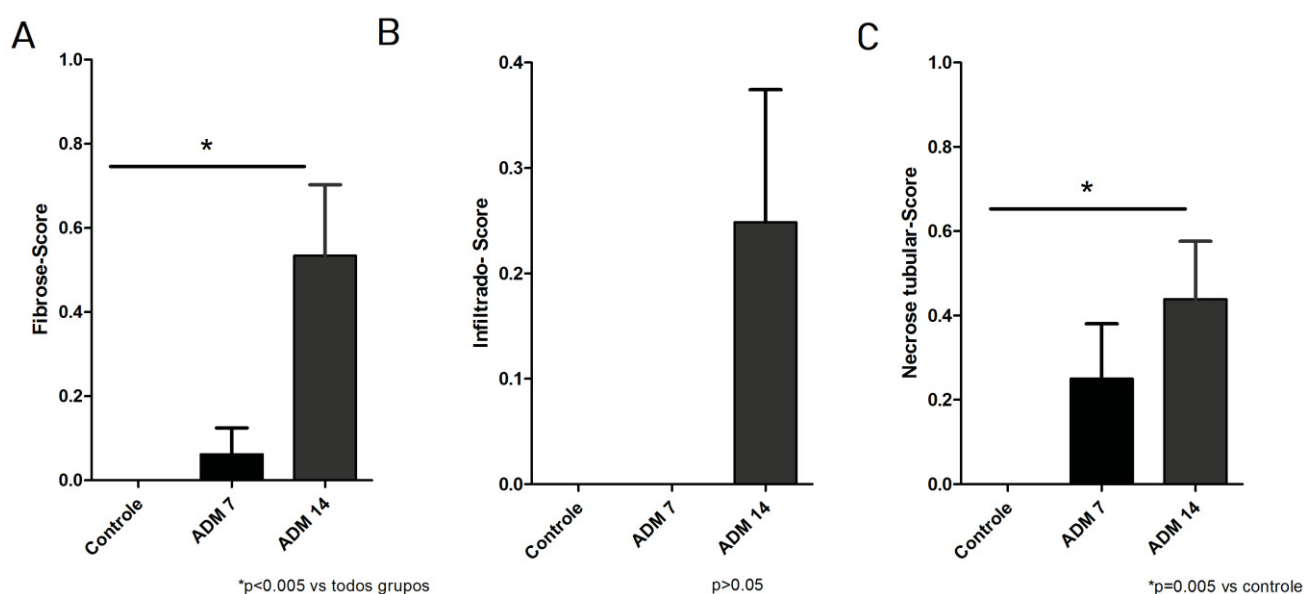


Figura 12: **A administração de ADM na dose de 10 mg/kg induz aumento de fibrose e necrose tubular.** A: A fibrose tubulointersticial é induzida pelo tratamento com ADM, em especial 14 dias após a administração da droga ($p<0.05$). B: Há tendência de infiltrado de células inflamatórias 14 dias após o tratamento com ADM, porém sem diferenças significativas ($p<0.05$). C: A Necrose tubular é induzida pelo tratamento com ADM ($p<0.005$). $n=10$ animais por grupo de estudo.

Esses dados, somados aos resultados de albuminúria e perda de peso, demonstram que em animais heterogêneos da linhagem *swiss*, a nefropatia induzida na dose de 10 mg/kg de ADM se estabelece com sucesso, entretanto, leva mais tempo para se instaurar, se comparada com outras linhagem geneticamente homogêneas como o caso dos BALb/C, comumente utilizados nesse modelo experimental.

4.2. Nefropatia induzida por ADM na dose de 25 mg/kg.

A partir dos resultados obtidos na dose de 10mg/kg de ADM, procuramos avaliar uma variação mais robusta do modelo. Desta maneira, utilizamos a dose de 25mg/kg já utilizada em animais totalmente resistentes como a linhagem black/6 estudada por Jeansson *et al.*, (2009). Este modelo experimental é caracterizado por proteinúria intensa dos animais 5 dias após a administração da droga.

4.2.1. Albuminúria

Foi observado que os animais tratados com 25 mg/kg de ADM desenvolveram albuminúria intensa em relação ao grupo controle ($p=0.009$), como observado na figura 13.

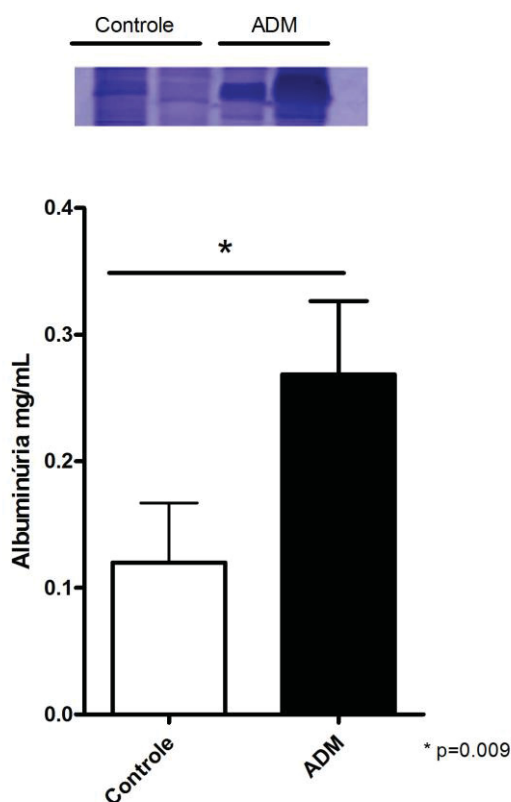


Figura 13: **A administração de 25 mg/kg de ADM induz albuminúria intensa nos camundongos *swiss* 5 dias após o tratamento.** O grupo tratamento apresenta albuminúria significativamente maior em relação ao controle ($p=0.009$). $n=10$ animais por grupo de estudo.

Através dos resultados é possível observar que o grupo tratado com ADM desenvolveu albuminúria de forma significativa em relação ao grupo controle, demonstrando que a dose de 25 mg/kg causa nefropatia nos animais já nos 5 primeiros dias após a administração da mesma.

A dose estudada se mostra eficiente no desenvolvimento de um modelo de nefropatia mais robusto em comparação com o modelo que utiliza a dose de 10 mg/kg, desta maneira os animais desenvolvem a lesão renal mais rapidamente.

4.2.2. Perda de peso

Os animais tratados com ADM apresentaram significativa perda de peso em relação ao grupo controle ($p=0.0001$), como observado na figura 14.

Os resultados mais uma vez apontam para a maior eficácia do modelo de indução de nefropatia na dose de 25 mg/kg de ADM em relação ao modelo anterior.

Nesse modelo há alta taxa de mortalidade, motivo pelo qual não foi possível realizar experimentos com duração maior do que 5 dias.

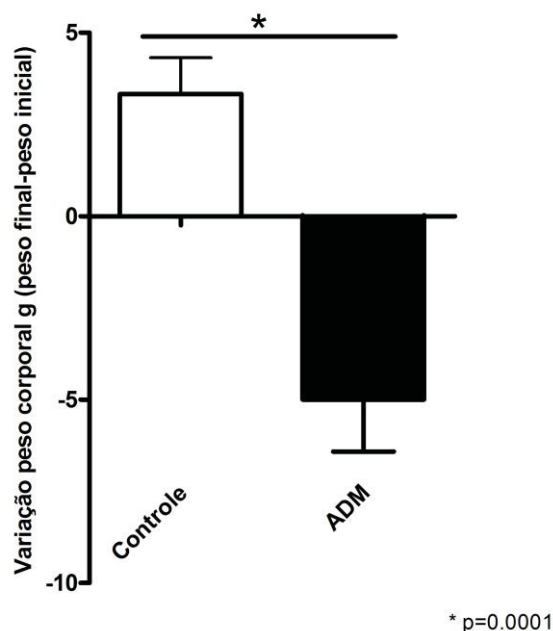


Figura 14: **A administração de ADM na dose de 25 mg/kg causa perda de peso dos animais 5 dias após o tratamento.** Os animais tratados com ADM apresentaram significativa perda de peso em relação ao grupo controle ($p=0.0001$). $n=10$ animais por grupo de estudo.

4.3. Participação da via de sinalização STAT-3

Com intuito de avaliar o papel da via de sinalização STAT-3 no MNIA em camundongos heterogêneos, inibimos a via utilizando um inibidor de STAT-3, *STATTIC*. Tal inibição foi realizada nos dois modelos testados anteriormente. O modelo de nefropatia induzida por 10 mg/kg de ADM e no modelo induzido na dose 25 mg/kg de ADM.

4.3.1. Estimativa de albuminúria no MNIA na dose de 10 mg/kg.

Através dos resultados é possível observar que não há diferenças significativas entre os grupos estudados no experimento com duração de 7 dias,

apontando mais uma vez que a dose de 10 mg/kg de ADM não induz significativa albuminúria nos animais neste ponto do estudo.

Por outro lado, 14 dias após a administração de ADM observamos significativa albuminúria.

Também observamos que o tratamento com STATTIC diminuiu significativamente a albuminúria, e sendo esse um importante marcador de lesão renal, é possível apontar a via STAT-3 como tendo um relevante papel da progressão da doença, sendo que sua inativação atenua a lesão.

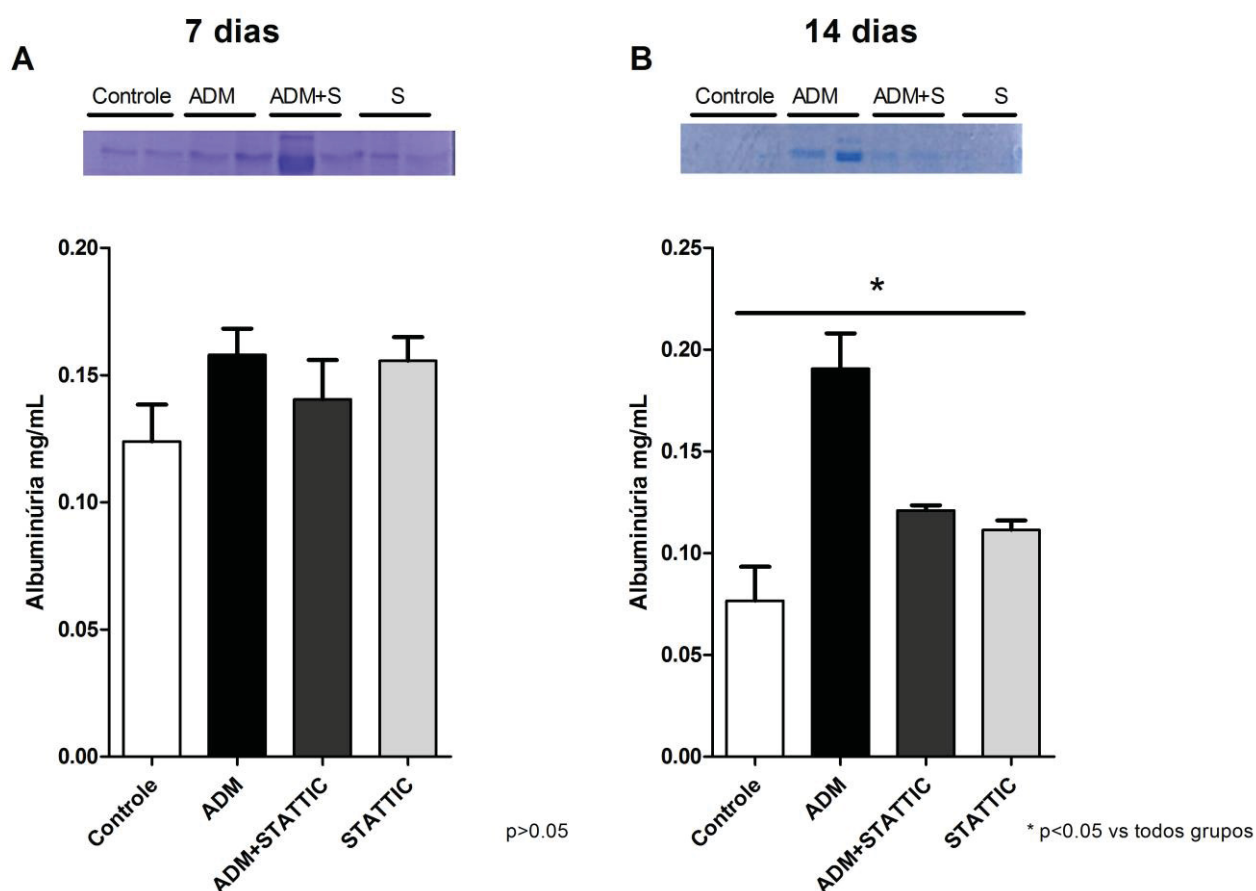


Figura 15: **A inativação da STAT-3 causa diminuição da albuminúria no modelo de nefropatia induzido por ADM na dose de 10 mg/kg, 14 dias após o tratamento.** A: Experimento com duração de 7 dias. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0.05$). B: No entanto, no experimento com duração de 14 dias o grupo tratado com ADM teve albuminúria significativamente maior em relação aos outros grupos analisados ($p < 0.05$). $n = 10$ animais por grupo de estudo.

4.3.2. Albuminúria no MNIA na dose de 25 mg/kg

Observamos que a administração de ADM (25mg/kg) induz significativa albuminúria (FIGURA 16) nos animais tratados em relação ao grupo controle, e

assim como no experimento anterior o tratamento com STATTC atenuou significativamente a albuminúria induzida.

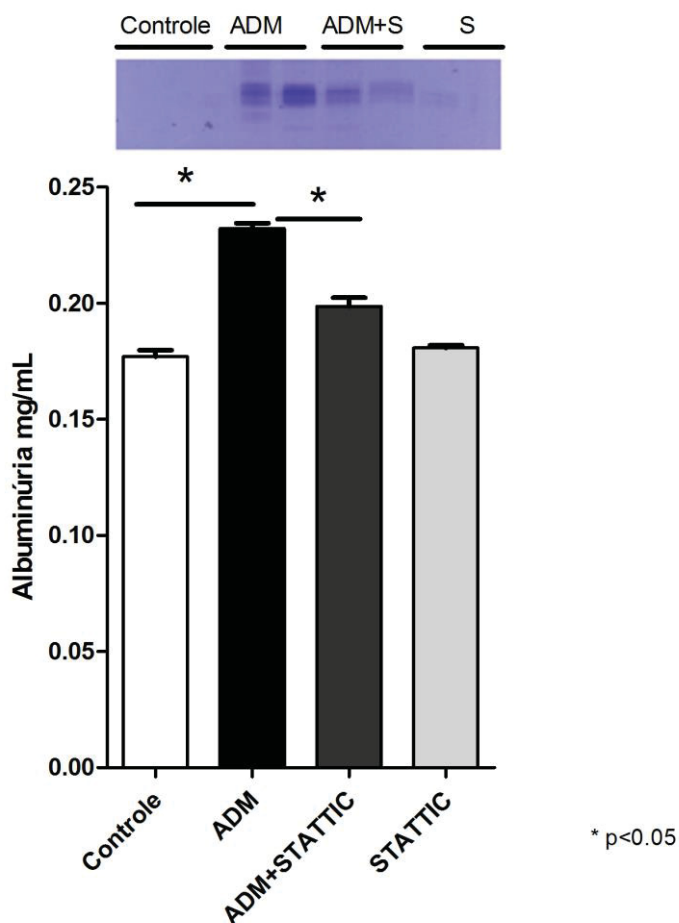


Figura 16: A inibição da STAT-3 causa diminuição da albuminúria no modelo de indução de nefropatia na dose de 25 mg/kg de ADM. Foram observadas diferenças significativas entre o grupo ADM e o grupo controle e entre o grupo ADM e ADM+STATTC ($p<0.05$). $n=10$ animais por grupo de estudo.

4.3.3. Uroanálises

Através das análises da urina com as tiras reagentes avaliamos que a proteinúria foi significativamente menor nos animais tratados com ADM+STATTC

em relação ao grupo que recebeu somente ADM, em ambas as doses do quimioterápico, (FIGURAS 17B e 18B), indicando que a administração de STATTIC e a inibição da via STAT-3 atenua a proteinúria típica do MNIA.

Na Figura 19 é possível observar que os animais tratados com 25 mg/kg de ADM desenvolveram glicosúria e proteinúria significativamente maior em relação aos outros grupos analisados, e que a administração de STATTIC leva a diminuição da concentração de glicose e proteínas na urina.

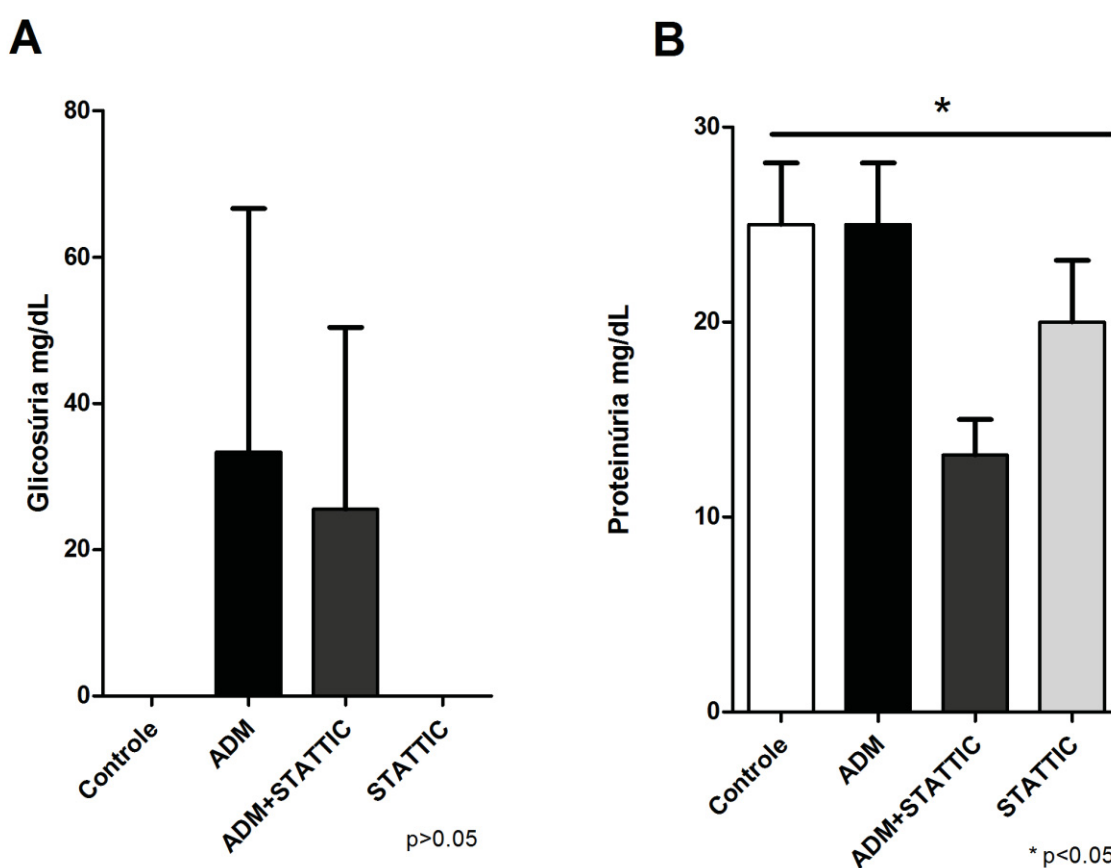


Figura 17: **A administração de STATTIC atenua a proteinúria no MNIA em camundongos swiss 7 dias após o tratamento.** A: Não foram observadas diferenças significativas na glicosúria entre os grupos estudados ($p > 0.05$). B: O grupo ADM+STATTIC apresentou concentração de proteínas na urina significativamente menor do que os outros grupos ($p < 0.05$). $n = 10$ animais por grupo de estudo.

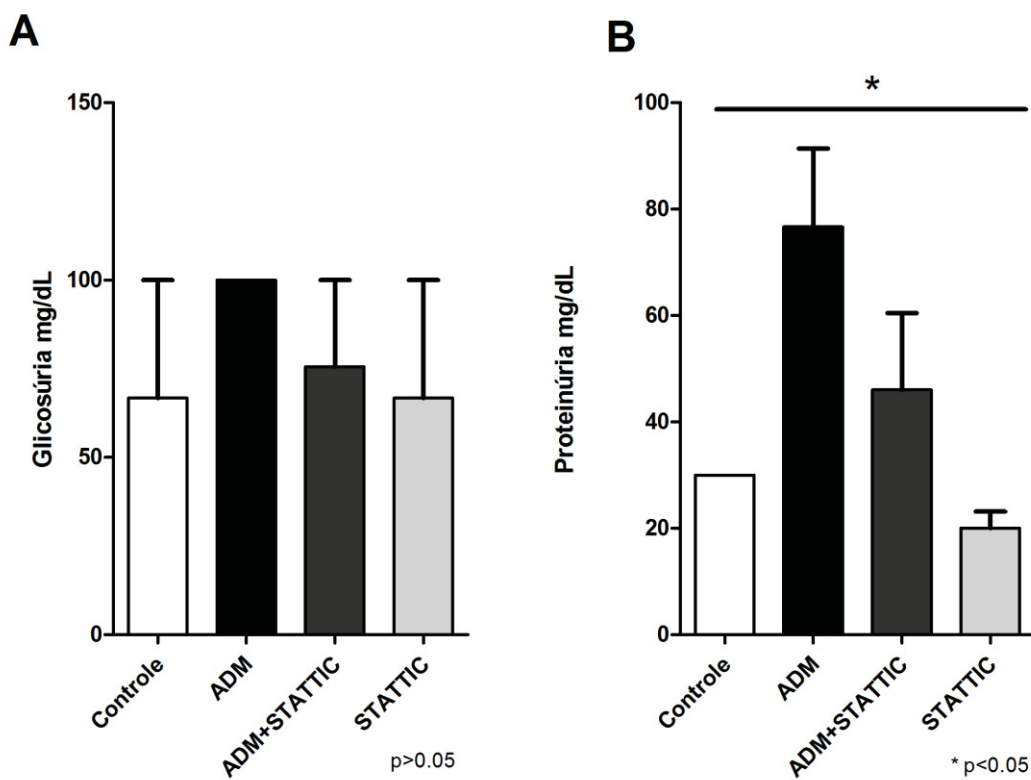


Figura 18: **A administração de 10 mg/kg de ADM leva ao aumento da proteinúria em camundongos swiss 14 dias após o tratamento.** A: Não foram observadas diferenças significativas na glicosúria entre os grupos estudados ($p > 0.05$). B: O grupo ADM apresentou concentração de proteínas na urina significativamente maior do que os outros grupos ($p < 0.05$). $n = 10$ animais por grupo de estudo.

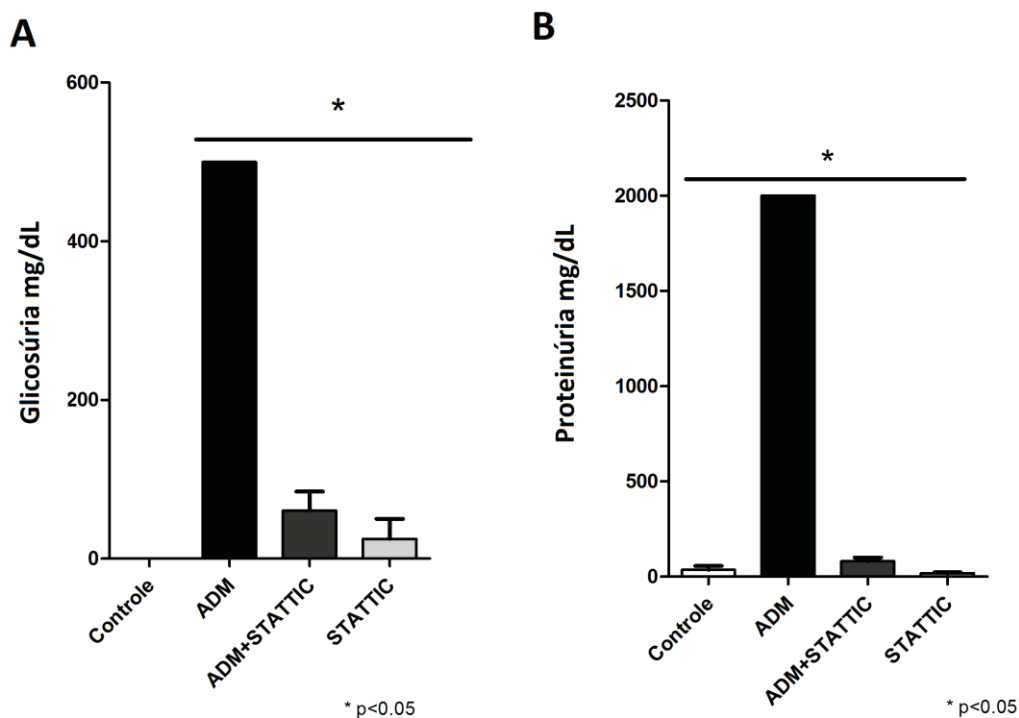


Figura 19: **A administração de 25 mg/kg de ADM leva ao aumento da glicosúria e proteinúria em camundongos swiss.** A: Foram observadas diferenças significativas na glicosúria entre os grupos estudados ($p<0.05$). B: O grupo ADM apresentou também, concentração de proteínas na urina significativamente maior do que os outros grupos ($p<0.05$). $n=10$ animais por grupo de estudo.

Os resultados mais uma vez apontam para a eficácia do modelo de indução de nefropatia por ADM em animais heterogêneos, uma vez que o aumento da concentração de proteínas e glicose na urina é característico de lesão na barreira de filtração glomerular, sendo que essas substâncias não são observadas, em concentrações significativas, em animais saudáveis (SCOTT & QUAGGIN, 2015).

Através dos resultados podemos inferir que ambas as doses levam ao quadro de proteinúria, porém na dose de 10 mg/kg a mesma leva mais tempo para se instaurar do que na dose de 25 mg/kg.

Os resultados também indicam que a administração de STATTIC e a inativação da via de sinalização STAT-3 leva à atenuação de importantes marcadores da nefropatia induzida por ADM.

4.3.4. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real no MNIA com dose de 25 mg/kg de ADM

A expressão de mRNA de STAT-3, IL-6, IL-6R e SOCS-3 foi quantificada através de PCR em tempo real, sendo os resultados representados na figura 20.

Através das análises de qPCR foi possível observar que os animais com nefropatia induzida adriamicina não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na expressão de mRNA de STAT-3 em relação ao grupo controle. Em contrapartida, os animais com nefropatia e tratados com STATTIC, e os animais do grupo tratado apenas com STATTIC tiveram a expressão de mRNA de STAT-3 diminuída em relação ao grupo controle e ao grupo tratado apenas com ADM. Esses resultados mostram que o tratamento com STATTIC diminuiu a expressão de mRNA de STAT-3. Intrigantemente, o STATTIC é conhecido por inibir a fosforilação da STAT-3, de modo a bloquear a formação dos dímeros e consequente ativação da STAT-3. No entanto, tais resultados demonstram que a expressão gênica de STAT-3 também é afetada.

Uma possível resposta para a diminuição da expressão gênica de STAT-3 seria o fato que a inibição da fosforilação do STAT-3 pelo STATTIC causaria o acúmulo da proteína não fosforilada no citosol da célula. Esse aumento da concentração citosólica de STAT-3 levaria a célula a diminuir a síntese de novas proteínas, resultando na diminuição do mRNA de STAT-3 (FIGURA 21).

Os resultados também apontam que a expressão gênica de IL-6 é significativamente maior nos animais tratados com ADM em relação aos que não foram tratados com a droga, como o grupo controle e o grupo STATTIC. Tal fato demonstra que a lesão renal causada pela ADM, leva a maior produção desta citocina no tecido renal.

A interleucina 6 é uma citocina com ação pleiotrópica, atuando em diversas funções do organismo, podendo ser secretada por muitos tipos celulares através de estímulos como infecção, inflamação ou câncer (GARBERS & ROSE-JOHN, 2018). A secreção de IL-6 por monócitos e macrófagos após a ativação de receptores Toll-like é especialmente importante em casos de inflamação (CALABRESE & ROSE-JOHN, 2014). Sendo que, como enfatiza Hunter & Jones (2015), existe extensa literatura mostrando que a IL-6 modula vários aspectos do sistema imune inato,

incluindo a hematopoiese e o acúmulo de neutrófilos nos locais de infecção ou trauma através do controle da granulopoiese.

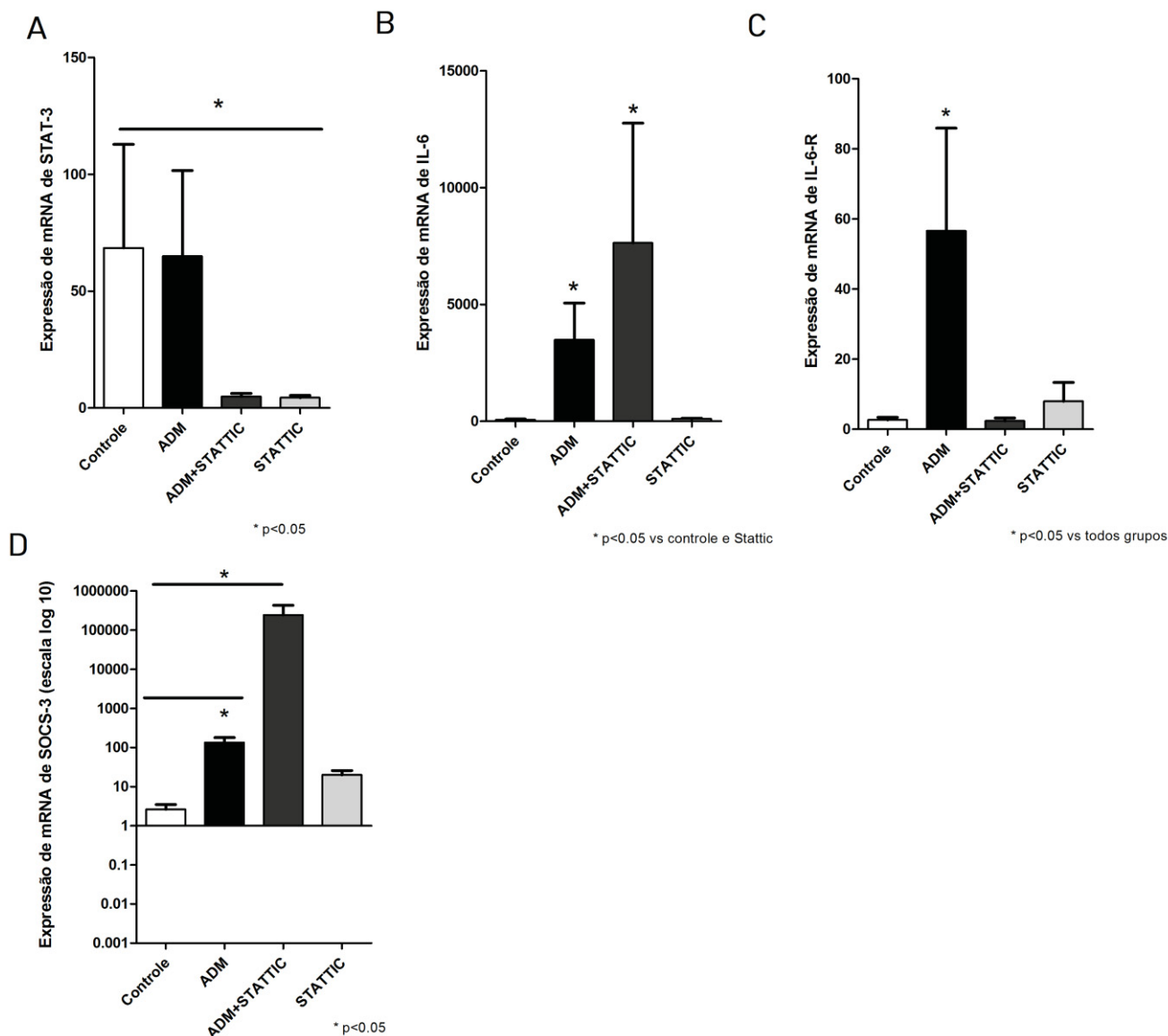


Figura 20: **A inibição da STAT-3 causa diminuição da expressão de mRNA de STAT-3 e IL-6R, bem como, o aumento da expressão gênica de IL-6 e SOCS-3, no MNIA com dose de 25 mg/kg.** A: Os grupos tratados com STATTIC apresentaram a expressão de mRNA de STAT-3 significativamente menor em relação aos outros grupos. B: Os grupos tratados com a ADM apresentaram expressão de mRNA de IL-6 significativamente maior do que os outros grupos. C: A expressão de mRNA de IL-6R é significativamente maior no grupo ADM em relação aos outros grupos. D: A expressão de mRNA de SOCS-3 é significativamente maior no grupo ADM em relação ao controle e significativamente maior no grupo ADM+STATTIC em relação ao grupo ADM.

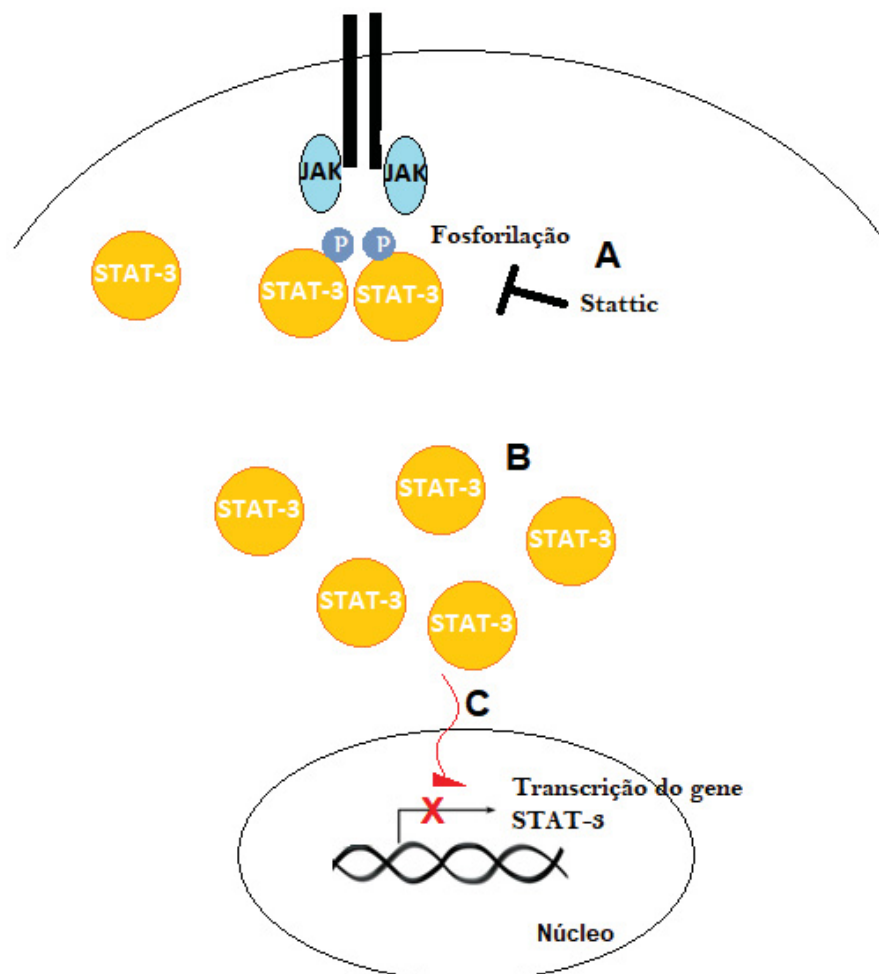


Figura 21: **A ação do STAT3, inibindo a fosforilação da STAT-3, leva ao acúmulo da proteína no citosol.** A: o STAT3 inibe a fosforilação da STAT-3, não permitindo a formação dos dímeros. B: A STAT-3 não fosforilada se acumula no citosol da célula. C: O aumento da concentração citosólica de STAT-3 levaria a célula a diminuir a síntese de mRNA de STAT-3.

Sabendo o papel da IL-6 na inflamação e os resultados da análise da expressão dessa citocina após o tratamento com ADM é possível observar que a nefropatia induzida por adriamicina leva a um quadro de inflamação, com possível infiltração de macrófagos, sendo esses os responsáveis pelo aumento da expressão de IL-6. Os grupos que não receberam ADM (controle e STAT3) não apresentaram tal aumento de expressão da citocina.

Esses resultados corroboram com os dados da literatura, os quais descrevem que há aumento da expressão de IL-6 em pacientes com GESF primária (WANG, *et al.*, 2013), GESF associada á plasmocitose cutânea e sistêmica (ISOBE, *et al.*, 2017) e outras nefropatias, como a nefropatia por IgA (YOSHIOKA, *et al.*, 1993).

A IL-6 se liga ao receptor de IL-6 (IL-6R), um receptor de 80 kDa desprovido de capacidade de sinalização, formando um complexo IL-6 e IL-6R, o qual, por sua vez, se liga a uma segunda proteína de membrana, a glicoproteína 130 (gp130), iniciando, assim, a sinalização intracelular (GARBERS & ROSE-JOHN, 2018). Embora a gp130 seja expressa em todas as células, o IL-6R é encontrado apenas em algumas células, como hepatócitos, alguns leucócitos e células epiteliais (SCHELLER *et al.*, 2011). A ativação da gp 130 leva a ativação da via de sinalização JAK/STAT-3 como já citado nesse trabalho.

Os resultados da expressão de mRNA de IL-6R, quantificada através da qPCR, demonstram que há diferenças significativas na expressão gênica de IL-6R entre o grupo de animais que desenvolveram a nefropatia induzida por adriamicina em relação ao grupo controle. Tais diferenças condizem com o resultado da expressão de mRNA de IL-6. O grupo tratado com ADM apresenta maior expressão tanto da IL-6 quanto de seu receptor, indicando uma possível inflamação no tecido renal.

4.3.5. Expressão proteica de STAT-3

A expressão proteica renal de STAT-3 nos quatro grupos estudados no modelo de indução de nefropatia por 25 mg/kg de ADM foi quantificada através da técnica de western blot. Os resultados estão representados na figura 21.

Através da análise dos resultados é possível observar que o tratamento com a STATTIC levou a diminuição da expressão proteica de STAT-3, corroborando com os resultados obtidos na análise da expressão gênica de STAT-3. Tais resultados indicam que o tratamento com o inibidor causa a diminuição da expressão da proteína, o que acarretaria na diminuição da ativação da via de sinalização e consequente ativação de genes envolvidos na inflamação e fibrose, atenuando a lesão típica da GESF.

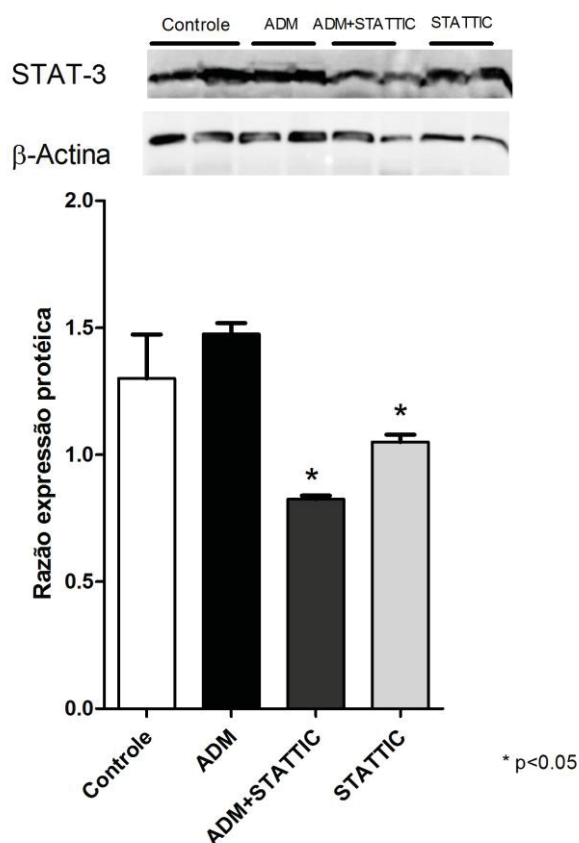


Figura 22: **A inibição da via de sinalização STAT-3 causa diminuição da expressão proteica da STAT-3.** Foi observada diferença significativa na expressão proteica de STAT-3 nos grupos que receberam STATTIC em relação aos grupos que não receberam ($p<0.05$).

4.3.6. Análise histológica no MNIA com dose de 25 mg/kg de ADM

Foram realizadas as análises histológicas dos rins dos animais dos quatro grupos estudados e os resultados apresentados na figura 20.

No grupo tratado com ADM foi observado aumento significativo da fibrose tubulointersticial e necrose tubular em relação aos outros grupos. Tais resultados apontam que o tratamento com adriamicina é eficaz na indução de nefropatia na linhagem de animais utilizada.

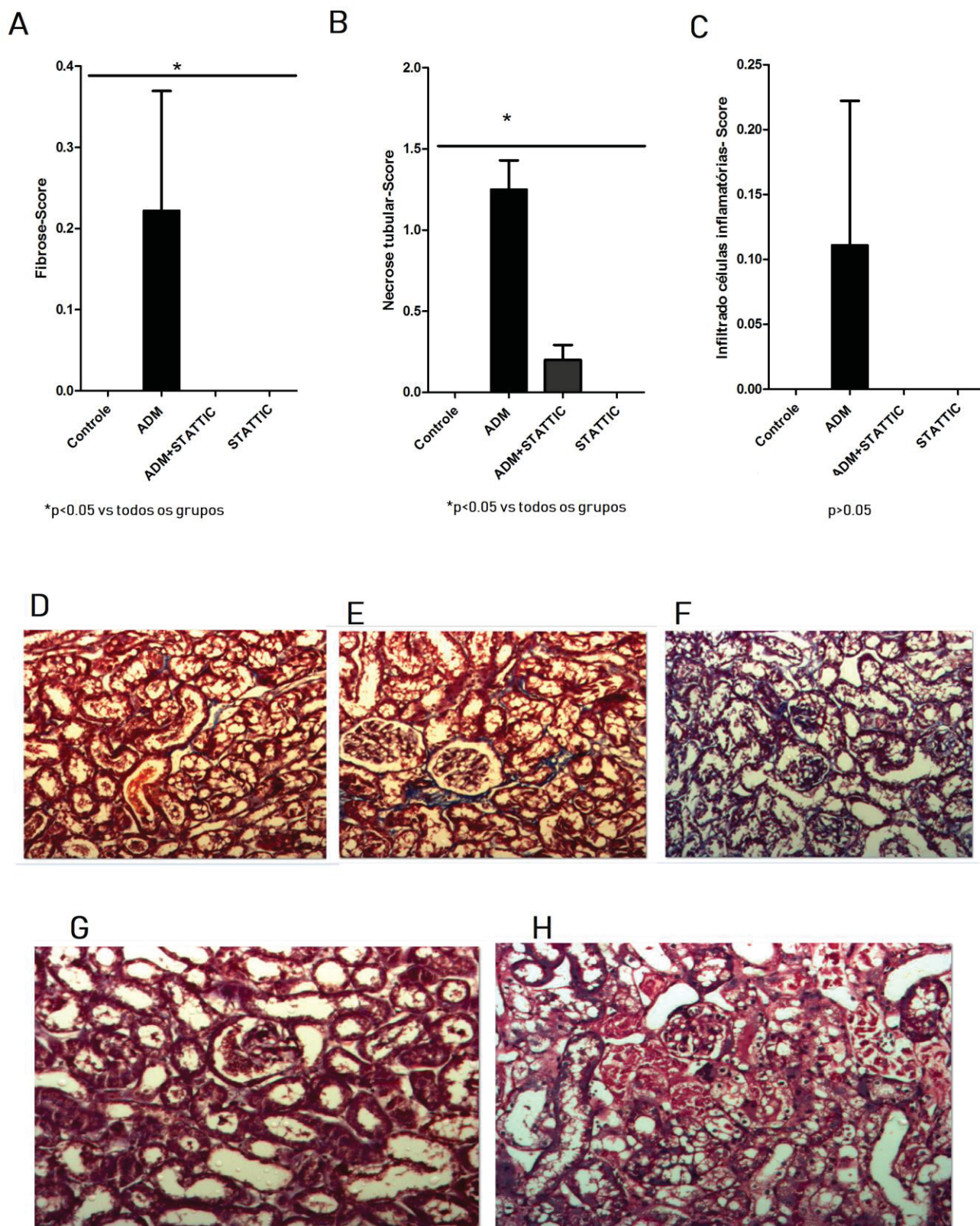


Figura 23: **Análise histológica dos rins dos quatro grupos estudados no modelo com dose de 25 mg/kg de ADM.** A: Quantificação da fibrose no tecido renal. B: Quantificação da necrose tubular. C: quantificação do infiltrado de células inflamatórias. D: Fibrose túbulo intersticial leve. E: Fibrose túbulo intersticial moderada. F: Fibrose túbulo intersticial intensa. G: Ausência de necrose tubular aguda. H: Presença de necrose tubular aguda.

Os animais do grupo ADM+STAT3IC apresentaram diminuição significativa da fibrose tubulointersticial e necrose tubular. Sendo esses parâmetros histológicos importantes na progressão da nefropatia induzida por ADM, os resultados obtidos indicam que a inibição da STAT-3 atenua lesão renal presente no modelo experimental.

Os resultados obtidos corroboram com os resultados do trabalho de Bienaimè *et al.*; (2016), o qual demonstrou o importante papel da STAT-3 na comunicação tubulointersticial durante a doença renal crônica, uma vez que a ativação da STAT-3 promove acúmulo de matriz intersticial e de fibroblastos, levando ao aumento da fibrose tubulointersticial. Os autores também demonstraram que a inativação da via de sinalização causa a diminuição de fibrose tubulointersticial.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, foi possível concluir que a indução de nefropatia por adriamicina em animais heterogêneos é eficaz em ambas as doses estudadas, sendo que na dose de 10 mg/kg de ADM a lesão renal demora mais tempo para se estabelecer (14 dias), em relação a dose de 25 mg/kg, na qual a albuminúria já aparece nos 5 primeiros dias após a administração da droga.

Concluimos também que a administração de STATTIC diminui a expressão gênica e proteica de STAT-3, o que possivelmente interfere na via de sinalização IL-6-STAT-3, a qual tem papel importante na lesão renal causada pela nefropatia induzida por ADM, pois a inibição da via diminuiu significativamente os marcadores da doença.

Sendo assim, observamos que a via STAT-3 tem importante papel na progressão da GESF, uma vez que a sua inibição leva à diminuição da albuminúria, fibrose tubulointersticial e necrose tubular, marcadores importantes na glomeruloesclerose segmentar e focal e intimamente ligados a progressão da doença.

Logo, através desses resultados, podemos indicar que a via STAT-3 pode ser um alvo terapêutico de grande potencial no tratamento da GESF, o que é de grande importância, uma vez que a doença apresenta diferentes repostas medicamentosas, devido aos diversos padrões de lesões histológicas, formas de progressão e repostas aos tratamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBATE, M.; ZOJA, C.; ROTTOLI, D.; CORNA, D.; TOMASONI, S.; REMUZZI, G. **Proximal tubular cells promote fibrogenesis by TGF-beta-1 mediated induction of peritubular myofibroblasts**. *Kidney International*. v. 61, p. 2066-2077. 2002.

ABBATE, M.; ZOJA, C. & REMUZZI, G. **How Does Proteinuria Cause Progressive Renal Damage?** *Journal of the American Society of Nephrology*. v 17, p. 2974–2984. 2006.

ABRANTES, M.M.; DE OLIVEIRA, E.A.; DINIZ, J.S.S.; CARDOSO, L.S.B.; PAIXÃO, A.R.M.; P. R. D.; CAIXETA, R.D; LAMOUNIER, J.A. **Avanços, Controvérsias e Consenso no Tratamento da Glomeruloesclerose Segmental e Focal Primária**. *J Bras Nefrol*, v. 27(1), p. 22-33. 2005.

BAINES, R.J. & BRUNSKILL, R.J. **The Molecular Interactions between Filtered Proteins and Proximal Tubular Cells in Proteinuria**. *Nephron Experimental Nephrology*. v. 110, p. 67-71. 2008.

BECKER, G. J.; REWITSON, T. D. **The role of tubulointerstitial injury in chronic renal failure**. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. v. 8, p. 133-138. 2000.

BERTANI, T.; REMUZZI, G. **Epithelial cell damage, in Glomerular Injury: 300 years after Morgagni**. Milano: Wichtig p. 163- 177. 1983

BERTANI, T.; ROCCHI, G.; MECCA, G.; REMUZZI, G. **Adriamycin—induced glomerulosclerosis in the rat**. *Am J Kidney Disease*. v. 7, p. 12-19. 1986.

BERTANI, T.; CUTILLO, F.; ZOJA, C.; BROGGINI, M.; REMUZZI, G. **Tubulointerstitial lesions mediate renal damage in Adriamycin glomerulopathy**. *Kidney International*, v. 30, p. 488-496. 1986.

BIANCONE, L.; DAVID, S.; DELLA, P. V.; MONTRUCCHIO, G.; CAMBI, V.; CAMUSSI, G. **Alternative pathway activation of complement by cultured human proximal tubular epithelial cells**. *Kidney Int* v. 45, p. 451–460, 1994.

BIENAIMÉ, F.; MUORAH, M.; YAMMINE, L.; BURTIN, M.; NGUYEN, C.; BARON, W.; GARBAY, S.; VIAU, A.; BROUEILH, M.; BLANC, T.; PETERS, D.; POLI, V.; ANGLICHEAU, D.; FRIEDLANDER, G.; PONTOGLIO, M.; GALAZZINI, M.; TERZI, F. **Stat3 controls tubulointerstitial communication during CDK**. *J Am Soc Nephrol*. 2016.

CALABRESE, L.H.; ROSE-JOHN, S. **IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease**. *Nat. Rev. Rheumatol*. August 2014.

CAROW, B. & ROTTENBERG, M.E. **SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation**. v. 5 , February 2014

COTRAN, Ramzi S.; ABBAS, Abul K.; FAUSTO, Nelson; ROBBINS, Stanley L.; KUMAR, Vinay: **Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592 p.

CHUANG, P. Y. & HE, J. C. **JAK / STAT signaling in renal diseases**. *Kidney International*, v. 78, p. 231-234, 2010.

D'AGATI, V. D., FOGO, A. B., BRUIJN, J. A. & JENNETTE, J. C. **Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal**. *Am. J. Kidney Dis.* v. 43. p. 368–382. 2004.

D'AGATI, V.V. **Podocyte injury in focal segmental glomerulosclerosis: Lessons from animal models (a play in five acts)**. *Kidney International*. v.73, p.399–406. 2008.

DASKALAKIS, N.; WINN, M. P. **Focal and segmental glomerulosclerosis**. *Cell. Mol. Life Sci.* v. 63, p. 2506–2511. 2006.

EDDY, A. A. & GIACHE, C.C. **Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria**. *Kidney International*, v. 47. p.1546-1557. 1995.

FOGO, A.B. **Animal Models of FSGS: Lessons for Pathogenesis and Treatment**. *Seminars in Nephrology*, v. 23, No. 2, p. 161-171. 2003.

FOGO, A. B. **Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis**. *Nature Reviews. Nephrology*. 2014.

GARBERS, C.; ROSE-JOHN, S.; HEINK, S.; KORN, T. **Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine**. *Nature Reviews*, 2018.

GREENHALGH, C.J.; HILTON, D.J. **Negative regulation of cytokine signaling**. *Journal of Leukocyte Biology* Volume 70, September 2001.

GROND, J.; MULLER, E. W.; VAN GOOR, H.; WEENING, J. J.; ELEMA, J.D. **Differences in puromycin aminonucleoside nephrosis in two rat strains**. *Kidney International*, v. 33. p.524-529. 1988.

HAN, K. H. & KIM, S. H. **Recent Advances in Treatments of Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis in Children**. *BioMed Research International*, 2016.

HARA, M. A.; YANAGIHARA, T. A.; KIHARA, I. **Urinary Podocytes in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis**. *Nephron*, v. 89, p. 342-347, 2001.

HEINRICH, P.C.; BEHRMANN, I.; HAAN, S.; HERMANN, H.M., MULLER-NEUEN, G.; SCHAPER, F. **Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation**. *Biochem. Journal*. v. 374, p. 1-20. 2003.

HUNTER, C. A. & JONES, S. A. **IL-6 as a keystone cytokine in health and disease.** Nat Immunol. May; v. 16 (5) p. 448-457, 2015.

ISOBE, S.; OHASHI, N.; KATAHASHI, N.; ISHIGAKI, S.; TSUJ, N.; TSUJI, T.; KATO, A.; FUJIGAKI, Y.; SHIMIZU, A.; YASUDA, H. **Focal segmental glomerulosclerosis associated with cutaneous and systemic plasmacytosis.** CEN Case Rep v. 6, p. 206–209, 2017.

JEANSSON, M.; BJÖRCK, K.; HARALDSSON, B. **Adriamycin Alters Glomerular Endothelium to Induce Proteinuria.** J Am Soc Nephrol 20: p.114-122, 2009.

JEFFERSON, J.A.; . SHANKLAND, S.J. **The Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis.** Focal Advances in Chronic Kidney Disease, v. 21, No 5 (September), p. 408-416. 2014.

KERJASCHKI, D. **Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis.** J. Clin. Invest. v.108, p. 1583–1587. 2001.

KILE, B.T.; SCHULMAN, B.A.; ALEXANDER, W.S.; NICOLA, N.A.; HELENE, M.E. **The SOCS box: a tale of destruction and degradation.** Biochem. Sci. 27, 235–241. 2002.

KOEPPEN, B.M. & STANTON, B.A. **Berne & Levy, fisiologia.** 6^a ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2009.

KURATSUNE, M.; MASAKI, T.; HIRAI, T.; KIRIBAYASHI, K.; YOKOYAMA, Y.; ARAKAWA, T.; YORIOKA N.; KOHNO, N. **Signal transducer and activator of transcription 3 involvement in the development of renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction.** NEPHROLOGY. v. 12, p. 565-571. 2007.

LEE, V. W. S. & HARRIS, D. C. H. **Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis.** Nephrology 16, 30-38. 2011.

LI, P. K. T. & MA, T. W. **Global impact of nephropathies.** Nephrology ,22, Suppl. 4 9–13. 2017.

McMURRAY, J. S. **A New Small-Molecule Stat3 Inhibitor.** Chemistry & Biology, v. 13, Issue 11, p. 1123-1124, 2006.

MALAFRONTÉ, P.; MASTROIANNI-KIRSZTAJN, G.; BETÔNICO, G. N.; ROMÃO, J. E.; CARVALHO, M. F.; NETO, O. M. V.; CADAVAL, R. A. M.; BÉRGAMO, R. R.; WORONIK, V.; SENS, Y. A. S.; MARROCOS, M. S. M.; BARROS, R. T. **Paulista registry of glomerulonephritis: 5-year data report.** Nephrol Dial Transplant. v. 21, p. 3098–3105. 2006.

MATHERS, C.D.; LONCAR, D. **Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030.** PLoS Med.; 3: e442. 2006.

MEYER, T. W. **A Tubular injury in glomerular disease Principal.** Kidney International. v. 63, p 774-787. 2003.

MEZZANO, S. A.; DROGUETT, M. A.; BURGOS, M. E.; ARDILES, L. G.; AROS, C. A.; CAORSI, I.; EGIDO, J. **Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy.** *Kidney International*, v. 57, p. 147–158. 2000.

MOURA, L. R. R.; FRANCO, M. F.; KIRSZTAJN, G. M. **Doença de lesões mínimas e glomeruloesclerose segmentar e focal em adultos: resposta a corticoide e risco de insuficiência renal.** *J Bras Nefrol*; v. 37(4), p. 475-480. 2015.

NAGATA, M. **Podocyte injury and its consequences.** *Kidney International*, v. 89, Issue 6, p. 1221–1230, 2016.

NAKAJIMA, H.; TAKENAKA, M.; KAIMORI, J. Y.; NAGASAWA, Y.; KOSUGI, A.; KAWAMOTO, S.; IMAI, E.; HORI, M.; OKUBO, K. **Gene expression profile of renal proximal tubules regulated by proteinuria.** *Kidney International*, v. 61, p. 1577–1587. 2002.

NIELSEN, S.; KWON, T.H.; FENTON, R.A.; PRAETORIOUS, J. *Anatomy of the Kidney.* In: BRENNER, B.M. **The Kidney.** 9. Ed. Philadelphia: Elsevier. 2012.

OKUDA, S.; OH, Y.; TSURUDA, H.; ONOYAMA, K.; FUJIMI, S.; FUJISHIMA, M. **Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease.** *Kidney International*, v. 29, p. 502-510. 1986.

PANG, M.; MA, L.; GONG, R.; TOLBERT, E.; MAO, H.; PONNUSAMY, M. Y.; CHIN, E.; YAN, H.; DWORKIN, L.D.; ZHUANG, S. **A novel STAT3 inhibitor, S3I-201, attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy.** *International Society of Nephrology.* 2010.

PEDRANZINI, L.; LEITCH, A.; BROMBERG, J. **Stat3 is required for the development of skin cancer.** *J Clin Invest.* v. 114(5), p. 619-22, 2004.

PEREIRA, R. L.; REIS, V. O.; SEMEDO, P.; BUSCARIOLLO, B. N., DONIZETTI-OLIVEIRA, C.; CENEDEZE, M. A., SOARES, M. F., PACHECO-SILVA, A., SAVAGE, P. B., CÂMARA, N. O. **Invariant Natural Killer T Cell Agonist Modulates Experimental Focal and Segmental Glomerulosclerosis.** *PLOS ONE* 7, E32454. 2012.

PEREIRA, R.L.; FELIZARDO, R. J. F.; CENEDEZE, M. A.; HIYANE, M.I.; BASSI, Ê. J.; AMANO, M. T ORIGASSA, C. S. T.; SILVA, R.C.; AGUIAR, C.F.; CARNEIRO, S.M.C.; PESQUERO, J.B.; ARAÚJO, R.C.; KELLER, A.C.; MONTEIRO, R.C.; MOURA, I.C.; PACHECO-SILVA, A.; CÂMARA, N.O.S. **Balance between the two kinin receptors in the progression of experimental focal and segmental glomerulosclerosis in mice.** *Disease Models & Mechanisms*, 2014.

POLITO, M.G.; DE MOURA, L.A.; KIRSZTAJN, G.M. **An overview on frequency of renal biopsy diagnosis in Brazil: Clinical and pathological patterns based on 9,617 native kidney biopsies.** *Nephrol. Dial. Transplant.*; v. 25, p.490–96. 2010.

PONTICELLI, C.; GLASSOCK, R. **Posttransplant Recurrence of Primary Glomerulonephritis**. Clin J Am Soc Nephrol. v. 5, p. 2363–2372. 2010.

RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A. **The JAK/STAT signaling pathway**. Journal of Cell Science. v. 117. p. 1281-1283. 2004.

REISER, J.; GUPTA, V.; KISTLER, A.D. **Toward the development of podocyte-specific drugs**. Kidney International. 77, 662–668. 2010.

RIELLA, L.V.; RIELLA, C.V & RIELLA, M.C. Anatomia Renal. In:**Princípios da Nefrologia e Distúrbios Eletrolíticos**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

RODEWALD, R.; KARNOVSKY, M.J. **Porous structure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse**. J Cell Biol v.60, p.423-433, 1974.

SCOTT, R.P. & QUAGGIN, S.E.**The cell of Renal Filtration**. J. Cell. Biology. v. 209. n 2. p. 199-210. 2015.

SHANKLAND, S.J. **The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis**. Kidney Int; v. 69, p. 2131–2147. 2006.

SHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. **The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6**. Biochimica et Biophysica Acta 1813, p. 878–888. 2011.

SCHUST, J.; SPERL, B.; HOLLIS, A.; MAYER, T. U.; BERG, T. **Stattic: A small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization**. Chem. Biol. v. 13, p. 1235-1242, 2006.

SHIMIZU, A., HIGO, S.; FUJITA, E.; MII, A.; KANEKO, T. **Focal Segmental Glomerulosclerosis After Renal Transplantation**. Clin Transplant. v. 23, p. 6-14. 2011.

SHUAI, K.; LIU, B. **Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system**. Nat Rev Immunol. v. 3, p. 900-1110, 2003.

TANNER, G. A.; EVAN, A. P. **Glomerular and proximal tubular morphology after single nephron obstruction**. Kidney International. v. 36, p. 1050-1060. 1989.

TAAL, M. W. et al. **Brenner & Rector's the kidney**. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2012. 2 v.

TANG, S.; LEUNG, J. C. K.; ABE, K.; CHAN, K. W.; CHAN, L. Y. Y.; CHAN, T. M.; LAI, K. N. **Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo**. Clin. Invest. v. 111, p. 515–527. 2003.

TRIMARCH, H. **Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: Why Are Pieces Of This Puzzle Still Missing?** European Medical Journal Nephrol. v. 3, No 1, p. 104-110. 2015.

VINK, H.; DULING, B.R. **Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume** . Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. v. 278, p.285–289, 2000.

ZOJA, C.; MORIGI, M.; FIGLIUUI, M.; BRUUI, I.; OLDROYD, S.; BENIGNI, A.; RONCO, P.; REMUZZI, G. **Proximal Tubular Cell Synthesis and Secretion of Endothelin-1 on Challenge With Albumin and Other Proteins**. Kidney International, v. 36, p. 1050-1060. 1989.

ZOJA, C.; DONADELLI, R.; COLLEONI, S.; FIGLIUZZI, M.; BONAZZOLA, S.; MORIGI, M.; REMUZZI, G. **Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF- κ B activation**. Kidney International, v. 53, p. 1608–1615. 1998.

ZHUO, J. L.; LI, C.L. **Proximal Nephron**. Compr Physiol. v. 3, No.3, p. 1079–1123. 2013.

WANG, Y.; CHEN, J.; CHEN, L.; TAY, Y.C.; RANGAN, G. K.; HARRIS, D. C. H. **Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein**. J. Am. Soc. Nephrol. v. 8, p. 1537–1545. 1997.

WANG, L.; LI, Q.; WANG, L.; LI, C.; YANG, H.; WANG, X.; TAO, H. **The Role of Th17/IL-17 in the Pathogenesis of Primary Nephrotic Syndrome in Children**. Kidney Blood Press Res, v. 37, p.332-345. 2013.

WANG, Y.; WANG, Y.P.; TAY, Y.C.; HARRIS, D.C.H. **Progressive adriamycin nephropathy in mice: Sequence of histologic and immunohistochemical events**. Kidney International, Vol. 58, pp. 1797–1804. 2000.

YACH, D.; HAWKES, C.; GOULD, C.L.; HOFMAN, K.J. **The global burden of chronic diseases: Overcoming impediments to prevention and control**. JAMA; v. 291, p. 2616–22. 2004.

YAMASHITA, M.; YOSHIDA, T.; SUZUKI, S.; HOMMA, K.; HAYASHI, M. **Podocyte-specific NF- κ B inhibition ameliorates proteinuria in adriamycin-induced nephropathy in mice**. Clin Exp Nephrol. 2016.

YANG, S.M.; CHAN, Y.L.; HUA, K.F.; CHANG, J.M.; CHEN, H.L.; TSAI, Y.J.; HSU, Y.J.; CHAO, L.K.; FENG-LING, Y.; TSAI, Y.L.; WU, S.H.; WANG, Y.F.; TSAI, C.L.; CHEN, A.; KA, S.M. **Osthole improves an accelerated focal segmental glomerulosclerosis model in the early stage by activating the Nrf2 antioxidant pathway and subsequently inhibiting NF- κ B-mediated COX-2 expression and apoptosis**. . Free Radic. Biol. Med. 2014.

YOSHIOKA, K.; TAKEMURA, T.; MURAKAMI, K.; OKADA, M.; YAGI, K.; HIROFUMI, M.; MATSUSHIMA, K.; MAKI, S. **In situ expression of cytokines in IgA nephritis**. Kidney international, v. 44, p. 825-833, 1993.