

Produção aumentada de superóxido e fibrose renal: novo modelo animal

Superoxide overproduction and kidney fibrosis: a new animal model

Nadia Karina Guimarães-Souza¹, Liliya Marsova Yamaleyeva², Baisong Lu²,
Ana Claudia Mallet de Souza Ramos¹, Colin Edward Bishop², Karl Erik Andersson²

RESUMO

Objetivo: Estabelecer se a mutação no gene *Immp2L* induz à fibrose renal e se o envelhecimento exacerba a morfologia renal em camundongos. **Métodos:** Foram usadas fêmeas de camundongos mutantes para proteína semelhante à peptidase 2 da camada interna da mitocôndria, com 3 e 18 meses de idade. Para analisar a fibrose renal, foram usados o escore clássico de fibrose, a coloração com tricrômio de Masson, e a análise de marcadores profibróticos, por meio da reação em cadeia de polimerase em tempo real (superóxido dismutase 1, metalonoproteinase-9, eritropoietina e fator transformador de crescimento beta), e a imunocoloração (fibroblastos e colágeno IV). Marcadores de estresse oxidativo foram determinados por imunohistoquímica. O número de células apoptóticas renais foi analisado. A função renal foi estimada por creatinina sérica. **Resultados:** Camundongos mutantes jovens apresentaram glomerulosclerose em quantidade significativamente maior que animais da mesma idade ($p=0,034$). Os mutantes mostraram maior formação de cilindros tubulares ($p=0,025$), deposição de colágeno ($p=0,019$) e maior expressão de colágeno do tipo IV ($p<0,001$). A expressão de superóxido dismutase 1 foi maior em mutantes jovens ($p=0,038$). Mutantes idosas exibiram maior expressão dos marcadores de fibroblastos e macrófagos ($p=0,007$ e $p=0,012$, respectivamente). As reações da cadeia de polimerase em tempo real da metalonoproteinase-9 e da eritropoietina estavam aumentadas em 2,5 e 6 vezes, respectivamente, em mutantes idosas. A creatinina sérica foi significativamente maior em animais idosos mutantes ($p<0,001$). **Conclusão:** Essa mutação alterou a arquitetura renal pelo aumento da deposição de matriz extracelular, estresse oxidativo e inflamação, sugerindo papel de proteção de *Immp2L* contra a fibrose renal.

Descritores: Insuficiência renal crônica; Inflamação; Camundongos transgênicos; Modelos animais; Estresse oxidativo

ABSTRACT

Objective: To establish whether the mutation in the *Immp2L* gene induces renal fibrosis and whether aging exacerbates renal morphology in mice. **Methods:** Female mutant mice with mutation in the inner mitochondrial membrane peptidase 2-like protein at 3 and 18 months of age were used. Renal fibrosis was analyzed using classic fibrosis score, Masson's trichrome staining, and analysis of profibrotic markers using real time polymerase chain reaction (superoxide dismutase 1, metalloproteinase-9, erythropoietin, transforming growth factor beta), and immunostaining (fibroblasts and Type IV collagen). Oxidative stress markers were determined by immunohistochemistry. The number of renal apoptotic cells was determined. Renal function was estimated by serum creatinine. **Results:** Young mutant mice had significantly more glomerulosclerosis than age-matched mice ($p=0.034$). Mutant mice had more tubular casts ($p=0.025$), collagen deposition ($p=0.019$), and collagen type IV expression ($p<0.001$). Superoxide dismutase 1 expression was significantly higher in young mutants ($p=0.038$). Old mutants exhibited significantly higher expression of the fibroblast marker and macrophage marker ($p=0.007$ and $p=0.012$, respectively). The real time polymerase chain reaction of metalloproteinase-9 and erythropoietin were enhanced 2.5- and 6-fold, respectively, in old mutants. Serum creatinine was significantly higher in old mutants ($p<0.001$). **Conclusion:** This mutation altered renal architecture by increasing the deposition of extracellular matrix, oxidative stress, and inflammation, suggesting a protective role of *Immp2L* against renal fibrosis.

Keywords: Renal insufficiency, chronic; Inflammation; Mice, transgenic; Models, animal; Oxidative stress

¹Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

²Wake Forest Institute for Regenerative Medicine, Winston-Salem, Carolina do Norte, USA.

Autor correspondente: Nádia Karina Guimarães-Souza – Instituto de Ensino e Pesquisa, Centro de Diálise – Avenida Albert Einstein, 627/701, 2ª subsolo – Morumbi – CEP: 05651-901 – São Paulo, SP, Brasil – Tel.: (11) 2151-3090 – E-mail: nadiakgs@einstein.br

Data de submissão: 16/5/2014 – Data de aceite: 6/1/2015

Conflito de interesse: não há.

DOI: 10.1590/S1679-45082015AO3179

INTRODUÇÃO

A fibrose renal é o maior determinante da evolução crônica da doença renal e resulta de inflamação crônica característica. Apesar das diferentes etiologias e manifestações clínicas, a maioria dos distúrbios fibróticos crônicos tem em comum uma produção persistente de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores de angiogênese, citocinas fibrinogênicas e espécies reativas de oxigênio (EROS). Essas condições estimulam a deposição de matriz extracelular que, progressivamente, destrói a arquitetura do órgão e deteriora sua função.⁽¹⁾ Recentemente, as EROS foram associadas à fibrose do rim em diferentes doenças, incluindo nefropatia crônica do aloenxertos após transplante⁽²⁾ e nefropatia diabética.⁽³⁾ Além disso, sabe-se que as EROS são importantes mediadoras dos efeitos adversos do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) nos tecidos renal e vascular.⁽⁴⁾

As EROS são produtos normais do metabolismo aeróbico e incluem, por exemplo, o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$), e o radical hidroxila ($-OH$). A superóxido dismutase (SOD) é a principal enzima antioxidante para remoção do superóxido. Em mamíferos, três isoformas de SOD foram descritas: CuZnSOD citoplasmático (SOD-1), MnSOD mitocondrial (SOD-2), e CuZnSOD extracelular (SOD-3). Quando a produção de EROS supera os mecanismos de defesa antioxidantes, o resultado é o estresse oxidativo. As EROS podem reagir com DNA, proteínas e lipídios, levando respectivamente à quebra dos filamentos de DNA, à oxidação de proteína e à peroxidação lipídica.⁽⁵⁾ Pela modificação covalente de proteínas associadas às membranas, o produto de peroxidação lipídica da membrana 4-hidroxinonenal (4-HNE) pode desempenhar um papel no dano do estresse oxidativo.⁽⁶⁾

As mitocôndrias são a principal fonte de EROS e sabe-se bem que alterações na função mitocondrial podem levar a uma produção excessiva de superóxido. Desse modo, camundongos com mutação de *Imp2L*, que têm deficiência da proteína semelhante à peptidase 2 da membrana interna da mitocôndria (*Imp2L*, sigla do inglês *inner mitochondrial membrane peptidase 2-like protein*), e que apresentam um processamento anormal na sequência de peptídeos de sinal das proteínas mitocondriais citocromo c1 (CYC1) e glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD2), exibem superprodução de íons de superóxido e níveis elevados de ATP, provavelmente em consequência de uma alta função mitocondrial. A proteína mitocondrial CYC1 no rim desses camundongos mutantes tem um peso molecular maior em comparação aos controles do tipo selvagem.⁽⁷⁾ O tamanho anormal desse peptídeo é compatível com uma perda

de atividade de *Imp2L*, que afeta a clivagem do espaço intermembrana.⁽⁸⁾ Esses camundongos mutantes podem ser um modelo interessante para estudar os efeitos renais induzidos por superóxido sem a interferência de comorbidades ou fatores secundários.

OBJETIVO

Determinar se uma mutação em *Imp2L* induz a fibrose renal, inflamação e estresse oxidativo em modelos de camundongo mutante *Imp2L*, e se o envelhecimento exacerba a morfologia renal nesses animais, considerando que o envelhecimento está associado a alterações em patologia renal e a um aumento no estresse oxidativo.

MÉTODOS

Animais

Os animais foram gerados e abrigados no biotério do *Wake Forest University Health Sciences*. Os experimentos foram aprovados pelo comitê local de cuidado e uso de animais, o *Animal Care and Use Committee (ACUC)*, e conduzidos segundo a publicação *Guide for Care and Use of Laboratory Animal* do *National Research Council (A08-071)*.

O camundongo mutante *Imp2L^{Tg (Tyr) 979 Ove}* foi produzido com uma estratégia mutagênica de inserção transgênica. Pela injeção de um minigene de tirosinase nos ovos fertilizados de camundongos albinos FVB e triagem para filhotes com fenótipos no sistema reprodutor, uma linhagem mutante com fertilidade prejudicada em ambos os sexos foi obtida. A lesão genômica da linha mutante foi mapeada para o cromossomo 12, que altera o gene *Imp2L*.⁽⁷⁾ As fêmeas mutantes foram pareadas por idade com fêmeas do tipo selvagem. Para os fins deste estudo, os animais com 3 meses de idade foram considerados jovens, e aqueles com 18 meses, idosos (n=4 em cada grupo).

O estudo foi realizado de setembro de 2009 a dezembro 2012. Todos os procedimentos nos animais, como exames de sangue, urina e histologia, foram realizados no *Wake Forest Institute for Regenerative Medicine*.

Análise morfolométrica

Os espécimes de rim foram fixados em formol tamponado neutro 10%, incluídos em parafina e cortados com espessura de 4 μ m. A lesão glomerular foi avaliada segundo Raji em cortes corados com hematoxilina e eosina,⁽⁹⁾ em 20 campos escolhidos aleatoriamente do córtex e medula, usando 4 animais por grupo com aumento de 200x. Em suma, a gravidade da lesão foi graduada de zero a 4+, segundo a porcentagem de comprometimen-

to glomerular. Assim, uma lesão 1+ representava um comprometimento de 25% do glomérulo individual, enquanto uma lesão 4+ indicava que 100% do glomérulo estava envolvido. Um escore de lesão foi, então, obtido ao multiplicar o grau de dano (zero a 4+) pela porcentagem dos glomérulos com o mesmo grau de injúria, isto é, aumento no material da matriz mesangial ou glomeruloesclerose. Os cilindros tubulares foram contados nos mesmos campos para todos os 20 campos escolhidos (n=4 por grupo). A atrofia tubular foi considerada como a dilatação dos túbulos e áreas em que o tecido normal foi substituído por fibrose nos mesmos campos escolhidos, sendo quantificada pelo programa computadorizado morfométrico (*AxioVision*).

Coloração com tricrômio de Masson

A deposição da matriz extracelular foi medida usando a coloração com tricrômio de Masson. Vinte campos de córtex e medula escolhidos aleatoriamente foram analisados (n=4 animais por grupo) com aumento de 200x. A proporção colágeno/parênquima foi calculada para comparar a fibrose renal intersticial nos quatro diferentes grupos.

Imunocoloração

Os cortes de parafina medindo 4 μ m foram tratados com um procedimento de recuperação do antígeno em micro-ondas, usando a solução *Antigen Retrieval Solution Ready-to-Use* (DAKO, Carpinteria, CA, Estados Unidos). Para proteínas do citoplasma, as células foram permeabilizadas com Triton 0,1% (Sigma, St. Louis, MA, Estados Unidos) em PBS, por 3 minutos, enxaguadas em PBS e bloqueadas com soro a 10% (FBS, Gibco® Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) por 30 minutos e em solução de bloqueador de proteína livre de soro por 1 hora. O tecido foi incubado com anticorpos primários (SOD-1 1:500; colágeno do tipo IV 1:500; S100A4 1:50 – todos da Abcam Inc., Cambridge, MA, Estados Unidos; CD68 1:200 Chemicon, CA; e 4-HNE 1:15.000 da Calbiochem, San Diego, CA, Estados Unidos), por 1 hora, em temperatura ambiente, e com anticorpos secundários biotinilados por 30 minutos.

Para avaliar SOD-1, S100A4 e colágeno do tipo IV, 20 campos aleatórios foram analisados nos rins de cada animal (n=4 por grupo) com aumento de 20x. As áreas positivas foram quantificadas por análise computadorizada morfométrica com o programa *AxioVision*. O escore final para cada animal representou a média dos 20 campos. Para avaliar o CD68, 20 campos aleatórios foram analisados para cada animal (4 por grupo) com aumento de 20x. As células positivas foram contadas e comparadas entre os grupos. Para avaliar o 4-HNE, 20

campos aleatórios foram analisados para cada animal (n=4 por grupo) com aumento de 20x. Os túbulos positivos foram considerados quando três ou mais células eram positivas no túbulo. A porcentagem de túbulos positivos relativos ao total de túbulos foi determinada e comparada dentro os grupos.

Identificação de células apoptóticas

Células apoptóticas em cortes incluídos em parafina foram visualizadas por desoxinucleotidil-transferase terminal (TdT), com o *kit* TACS TdT (R&D Systems, Mineápolis, MN, Estados Unidos), com visualização por imunoperoxidase, conforme protocolo do fabricante. Vinte campos aleatórios de cada animal foram analisados; as células positivas foram contadas e comparadas entre os grupos usando o número de células por campo como unidade.

Especificações de microscópio

Foi utilizado um microscópio Leica DM 4000B (Leica Mic Leica Microsystems, Bannockburn, IL, Estados Unidos). A temperatura da sala era de 22°C; o meio de imagem foi Immersol® 518F para microscopia fluorescente (Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha). As imagens foram feitas em 20x HC PL FLUOTAR (NA 0.5) e 40x HCX PL FLUOTAR (NA 0.75) seco. A câmera usada para todas as imagens foi *QImaging*, modelo Retiga-2000RV (Surrey, BC, Canadá), e o programa para aquisição foi o *Image Pro 6.3* (Media Cybernetics, Bethesda, MD, Estados Unidos).

Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real

O RNA foi isolado de tecidos renais (n=4 por grupo). O *kit* *RNeasy Mini Kit* da QIAGEN foi usado para extração de RNA. A integridade e a quantidade de RNA foram determinadas por espectrofotometria. Quantidades iguais de RNA total passaram por transcrição reversa com transcriptase reversa (Gibco® Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Reação em cadeia de polimerase (PCR) quantitativa para SOD-1, fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e metaloproteinase-9 (MMP-9), eritropoietina (EPO) foi realizada usando ensaios *TaqMan Gene Expression Assays* com conjuntos de *primer probes* da *Applied Biosystems*. As reações foram feitas em triplicata. A quantificação de RNA mensageiro (mRNA) foi realizada pelo método Delta-Delta CT. Os resultados foram normalizados para GAPDH e expressos como vezes de mudanças nos mutantes comparados a animais idosos do tipo selvagem.

Função renal

Para determinar a creatinina sérica, foram coletados 30 μ L de sangue por aspiração cardíaca quando os animais foram sacrificados (n=4 em cada grupo: mutantes idosas e animais idosos do tipo selvagem). A creatinina foi medida com o kit *QuantiChrom® Creatinine Assay Kit*, seguindo as instruções do fabricante.

Análise estatística

Os dados foram expressos como médias \pm desvio padrão. A análise estatística foi feita por meio do programa *SigmaStat*. Para comparação dos dois grupos, foram usados o teste *t* de Student ou o teste U de Mann-Whitney. As diferenças entre todos os grupos foram avaliadas pelo teste de análise de variância (one-way ANOVA). Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Camundongos fêmeas mutantes *Imp2L* com 3 e 18 meses de idade foram comparados aos respectivos pa-

res do tipo selvagem. Jovens mutantes foram também comparadas a mutantes mais idosas, a fim de avaliar os efeitos do envelhecimento sobre camundongos *Imp2L* idosos quanto à fibrose renal, estresse oxidativo e inflamação. Nenhuma diferença foi encontrada no peso corpóreo do animal (selvagem jovem: 31,77 \pm 7,92g; jovem mutante: 26,67 \pm 3,42g; selvagem idosa: 35,02 \pm 7,19g; e idosa mutante: 37,1 \pm 8,57g), ou nos pesos dos rins (jovens selvagem: 0,41 \pm 0,04; jovens mutantes: 0,34 \pm 0,06; idosas selvagens: 0,39 \pm 0,06; e idosas mutantes: 0,32 \pm 0,07). A proporção rim/peso corporal também foi similar entre os grupos.

As alterações na morfologia renal foram caracterizadas usando índices de fibrose renal e cortes de rins corados com hematoxilina e eosina. A glomerulosclerose foi classificada de zero a 4, e um escore total foi usado para comparar os grupos. Os jovens mutantes apresentavam glomerulosclerose aumentada de forma significativa em comparação aos animais jovens do tipo selvagem ($p=0,034$); entretanto, camundongos fêmeas idosas mutantes e idosas do tipo selvagem exibiram escores semelhantes (Figura 1A e Figuras 2A a 2D). Ci-

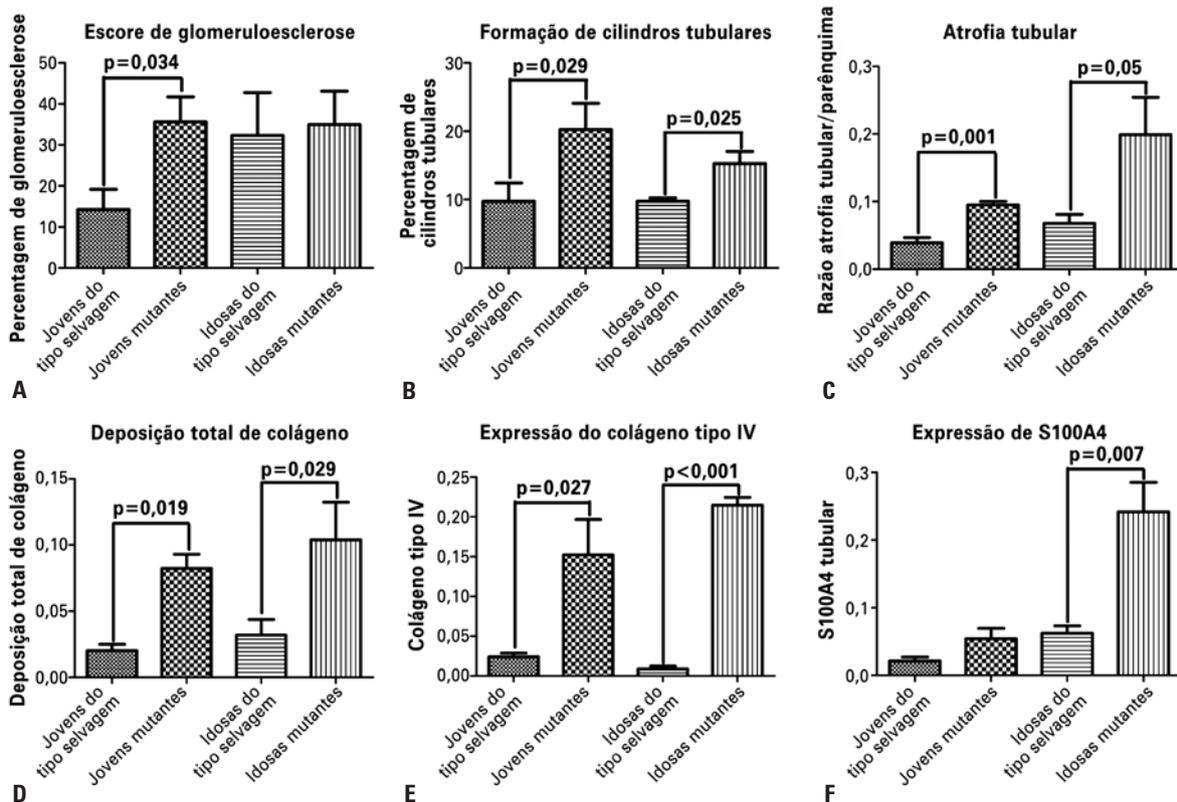


Figura 1. Análise de fibrose renal nos camundongos *Imp2L* mutantes e controles do tipo selvagem. Escore de glomerulosclerose (A), formação de cilindros tubulares (B) e atrofia tubular (C) foram avaliados usando coloração hematoxilina e eosina. Animais jovens mutantes apresentaram escores significativamente maiores que os controles da mesma idade em A, B e C, enquanto idosas mutantes tinham mais cilindros tubulares e atrofia tubular que os controles pareados para idade. A deposição de colágeno (D) foi avaliada usando a coloração com tricrômio de Masson. A deposição de colágeno foi significativamente maior nas mutantes, independentemente da idade. O colágeno do tipo IV (E) foi medido por imunocoloração e estava maior nas mutantes. A transição epitélio-mesenquimal foi analisada com coloração S100A4 (F). Camundongos fêmeas idosas mutantes exibiram expressão significativamente maior de marcador de fibroblastos em células epiteliais tubulares, representando a transição epitélio-mesenquimal

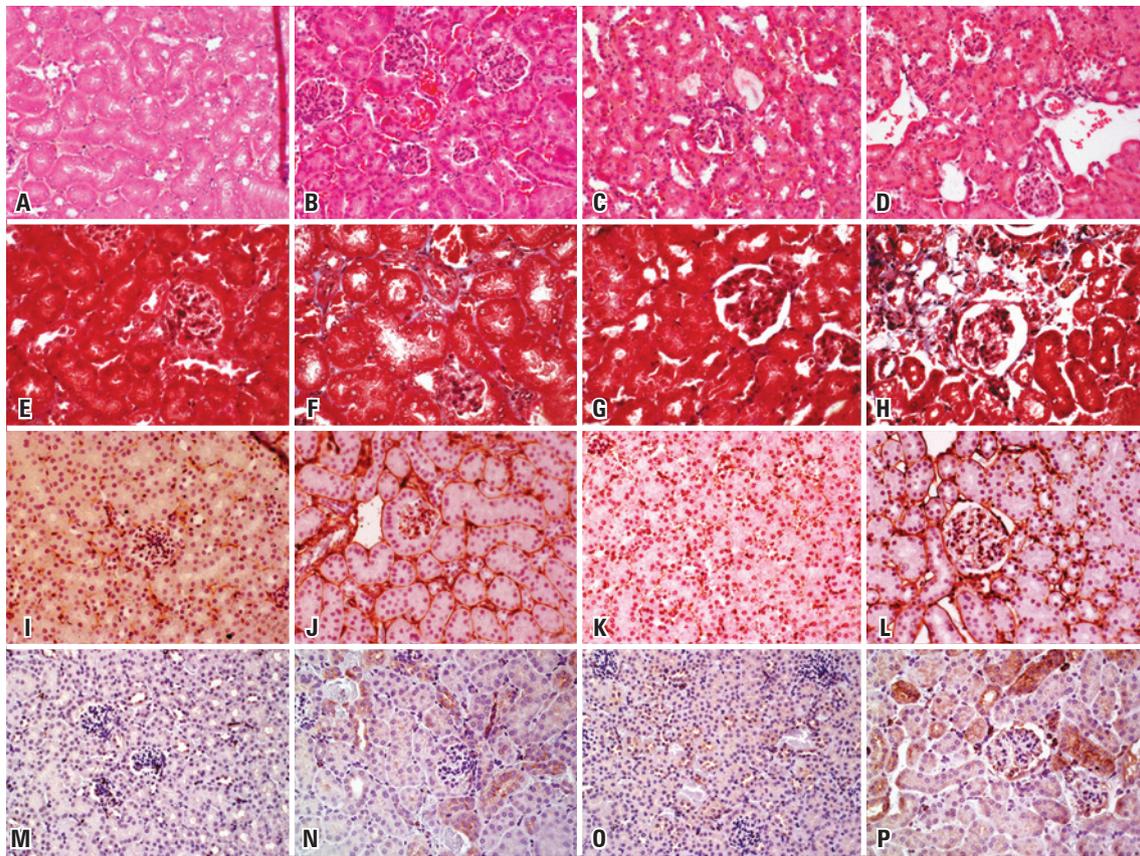


Figura 2. Fotos representativas com coloração hematoxilina e eosina, tricrômio de Masson e marcadores profibróticos (colágeno IV e S100A4) nos rins de camundongos *Immpl2* e controles do tipo selvagem. A coloração representativa com hematoxilina e eosina é mostrada na parte superior do quadro. (A) Animais jovens do tipo selvagem. Em jovens mutantes (B), observam-se glomerulos escleróticos e um pouco de atrofia tubular. Animais idosos do tipo selvagem (C) demonstraram um pouco de atrofia tubular e formação de cilindros tubulares. Idosas mutantes (D) exibiram atrofia tubular e glomeruloesclerose. E a H representam jovens do tipo selvagem, jovens mutantes, idosas do tipo selvagem e idosas mutantes, respectivamente. A coloração com tricrômio de Masson foi usada para medir a proporção colágeno/parênquima total. O azul representa a matriz extracelular, e o vermelho, o parênquima. A esclerose parcial de glomerulos é visível em G e H. Camundongos idosos mutantes apresentaram uma distorção da arquitetura do órgão, com substituição de estruturas tubulares pelo colágeno. As figuras I a L representam jovens do tipo selvagem, jovens mutantes, idosas do tipo selvagem e idosas mutantes, respectivamente. Colágeno do tipo IV é mostrado pela coloração castanha. Camundongos mutantes apresentaram maior deposição de colágeno do tipo IV que os controles da mesma idade. M a P representam jovens do tipo selvagem, jovens mutantes, idosas do tipo selvagem e idosas mutantes, respectivamente. A coloração castanha corresponde a células epiteliais positivas para S100A4, um marcador de fibroblastos. Todas as fotos foram obtidas com aumento de 20x

lindros tubulares foram mais prevalentes em animais mutantes, independente da idade, quando comparados a controles do tipo selvagem. Assim, mutantes jovens e idosas diferiram de forma significativa de fêmeas jovens e idosas do tipo selvagem ($p=0,029$ e $p=0,025$) (Figura 1B e Figuras 2A a 2D). A atrofia tubular, representada por membranas basais tubulares espessas irregulares com diâmetro diminuído nos túbulos e aumento do espaço intersticial, foi muito mais pronunciada em fêmeas mutantes do que nas selvagens, independente da idade ($p=0,001$ e $p=0,005$ para animais jovens e idosas mutantes, respectivamente). Idosas mutantes apresentaram muito mais atrofia tubular em relação às mutantes jovens ($p=0,019$) e às jovens de controle ($p=0,029$). Nenhuma diferença foi encontrada entre controles jovens e idosas do tipo selvagem (Figura 1C e Figuras 2A a 2D). Jovens camundongos mutantes apresentaram

uma proporção colágeno/parênquima significativamente maior que animais pareados por idade, conforme avaliação por coloração com tricrômio de Masson ($p=0,019$). Idosas mutantes apresentaram maior deposição de colágeno quando comparadas a animais idosos selvagens ($p=0,029$). Jovens mutantes exibiram maior deposição de colágeno que controles idosos do tipo selvagem ($p=0,009$) (Figura 1D e Figuras 2E a 2H). Além disso, a imunocoloração do colágeno do tipo IV foi marcadamente maior em jovens mutantes quando comparadas a animais do tipo selvagem, pareados por idade ($p=0,027$). Mutantes idosas e controles selvagens pareados para a idade foram também significativamente diferentes ($p<0,001$). Animais mutantes jovens mostraram maior expressão de colágeno do tipo IV que animais idosos do tipo selvagem ($p=0,004$) (Figura 1E e Figuras 2I a 2L).

A transição epitélio-mesenquimal foi determinada pela análise do marcador de fibroblastos, S100A4, apenas quando a coloração estava presente nas estruturas tubulares. A expressão de S100A4 em animais jovens mutantes não foi diferente daquela de camundongos fêmeas jovens do tipo selvagem ($p=0,377$). Todavia, animais mutantes idosas exibiram expressão significativamente maior de S100A4 quando comparadas a mutantes idosas do tipo selvagem ($p<0,001$), jovens mutantes ($p<0,001$), e animais jovens do tipo selvagem ($p=0,007$) (Figura 1F e Figuras 2M a 2P).

SOD-1 e 4-HNE foram analisados usando imunocoloração para determinar o efeito da mutação *Imp2L* sobre o estresse oxidativo no rim. A imunocoloração com SOD-1 foi considerada positiva quando dentro de células epiteliais tubulares. Camundongos jovens mutantes apresentaram uma expressão significativamente maior de SOD-1 que do tipo jovem selvagem

($p=0,037$). Jovens mutantes também mostraram maior expressão de SOD-1 em comparação com mutantes idosos ($p=0,039$) e controles idosos ($p=0,015$). A expressão de SOD-1 em idosas mutantes não foi diferente daquela de animais do tipo selvagem (Figura 3A e Figuras 4A a 4D). É interessante notar que o SOD-1 mRNA não sofreu alteração em camundongos jovens, o que sugere uma regulação após a transcrição da proteína SOD-1 em camundongos jovens mutantes (Figura 5). A imunocoloração de 4-HNE foi considerada positiva quando três ou mais células foram positivas no mesmo túbulo. Mutantes idosas apresentaram níveis significativamente maiores de 4-HNE que os tipos selvagens ($p=0,024$). A coloração para 4-HNE foi semelhante em jovens mutantes em comparação a controles jovens pareadas para idade (Figura 3B e Figuras 4E a 4H).

A infiltração por macrófagos e monócitos foi determinada pela contagem do número de células

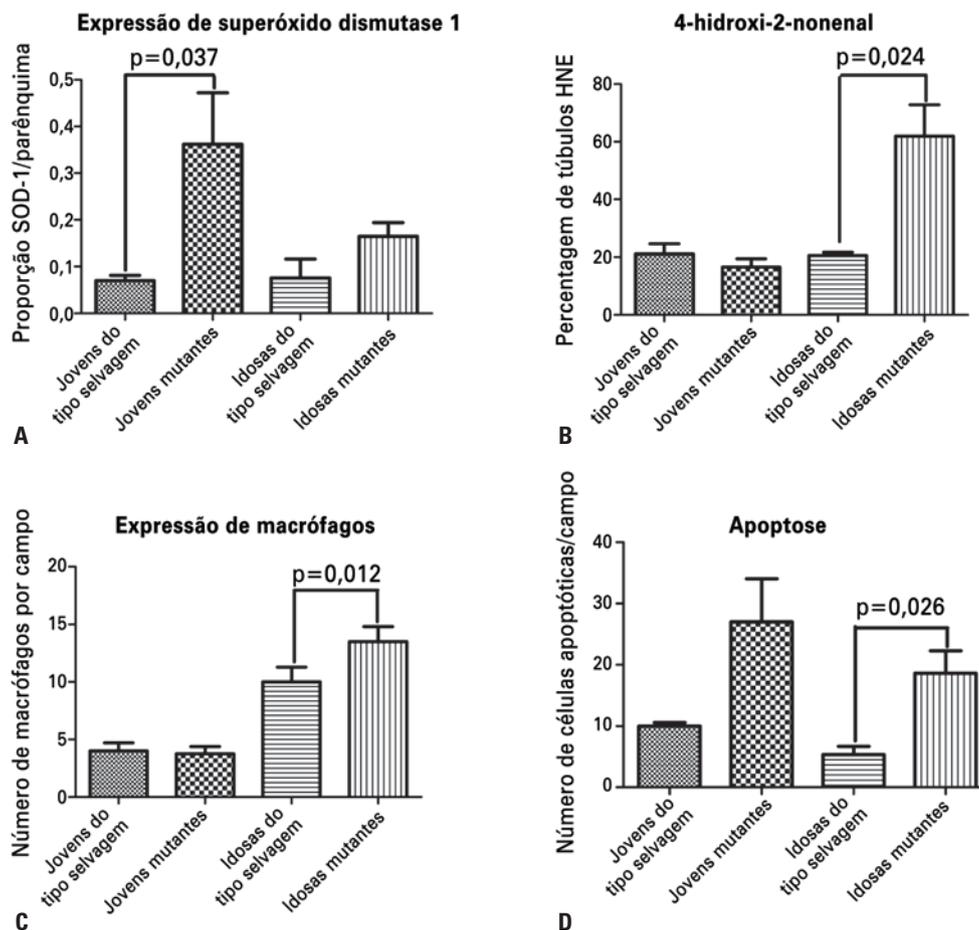


Figura 3. Análise de superóxido dismutase 1 (SOD-1), 4-hidroxinonenal (4-HNE), células CD68-positivas e células apoptóticas nos rins de camundongos *Imp2L* e controles do tipo selvagem. Em A, está demonstrada a expressão de SOD-1 no rim de camundongos *Imp2L*. Jovens mutantes tinham níveis significativamente maiores de SOD-1 do que os controles da mesma idade, e nenhuma diferença foi encontrada em animais idosos. 4-HNE mostrou maior expressão nos rins de idosas mutantes do que nos controles da mesma idade (B). A expressão de macrófagos (C) foi também maior em idosas mutantes quando comparada à de idosas controle. A apoptose foi significativamente maior em idosas mutantes do que nos controles

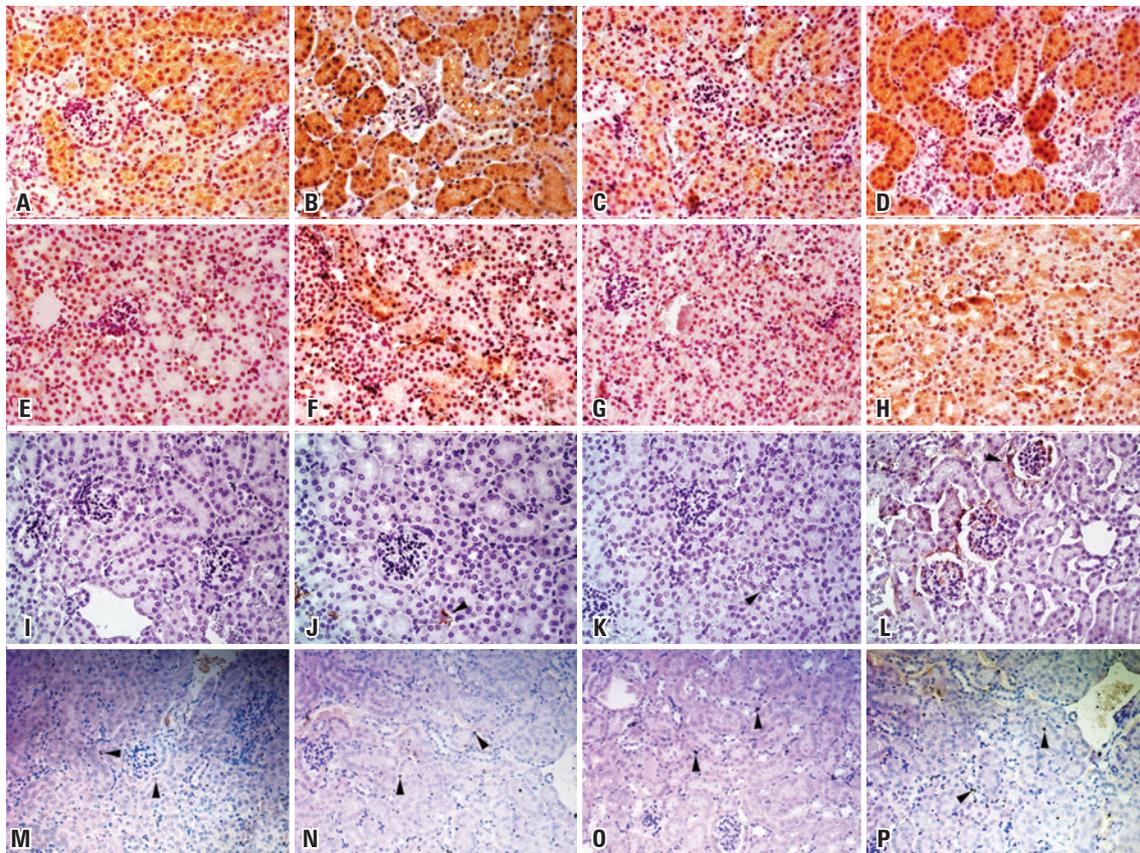


Figura 4. Fotos representativas de superóxido dismutase 1, 4-hidroxinonenal, células positivas para CD68 e células apoptóticas nos rins de camundongos *Immpl2*. Em A a D, é representada a expressão de superóxido dismutase 1 em jovens do tipo selvagem, jovens mutantes, idosos do tipo selvagem e idosos mutantes, respectivamente. Jovens mutantes exibiram uma maior expressão de superóxido dismutase 1 do que os controles pareados pela idade. E a H correspondem a 4-hidroxinonenal, mostrando a maior expressão em mutantes, especialmente nos mais idosos. I a L correspondem à infiltração de macrófagos/monócitos nos jovens do tipo selvagem, jovens mutantes, idosos do tipo selvagem e idosos mutantes, respectivamente. A coloração castanha indicada pelas setas representa os macrófagos. M a P demonstram as células apoptóticas de jovens do tipo selvagem, jovens mutantes, idosos do tipo selvagem e idosos mutantes, respectivamente. A coloração preta nos núcleos indicada pelas setas mostra as células positivas. As idosas mutantes apresentaram um número maior de núcleos pretos quando comparadas a idosas do tipo selvagem. Aumento de 20x

CD68-positivas nos rins. O número de macrófagos/monócitos foi semelhante em camundongos jovens (jovens do tipo selvagem: $4 \pm 1,4$ células por campo *versus* camundongos jovens mutantes: $3,75 \pm 1,25$ células por campo). Idosas mutantes apresentaram significativamente mais células inflamatórias que os controles pareados por idade (idosas do tipo selvagem: $10 \pm 2,5$; idosas mutantes: $13,5 \pm 2,65$; $p=0,012$) (Figura 3C e Figuras 4I a 4L).

As células apoptóticas foram determinadas usando a coloração TdT. Camundongos jovens mutantes apresentaram tendência de exibir um número maior de células apoptóticas que os controles da mesma idade (jovens mutantes: 27 ± 7 células por campo *versus* controles jovens: $10 \pm 0,57$ células por campo; $p=0,072$). Entretanto, idosas mutantes mostraram número significativamente maior de células apoptóticas quando comparadas a animais idosos do tipo selvagem (idosas mutantes: $18,67 \pm 3,66$ células por campo *versus* camundongos

fêmeas idosas do tipo selvagem: $5,33 \pm 1,33$ células por campo; $p=0,026$) (Figura 3D e Figuras 4M a 4P).

Os genes profibróticos foram avaliados por PCR em tempo real (RT-PCR) (Figura 5). Em animais mutantes, a MMP-9 mRNA estava 2,5 vezes maior que nas idosas do tipo selvagem e nos animais jovens. O gene da EPO também estava com regulação positiva (seis vezes maior). Porém TGF- β estava apenas 1,4 vez maior em camundongos mutantes do que em animais selvagens idosos (Figura 5).

Já que a maioria das anormalidades estruturais foi encontrada nas idosas mutantes, analisamos a creatinina plasmática nesses animais. Camundongos mutantes jovens mostraram níveis significativamente maiores de creatinina sérica que os animais jovens do tipo selvagem ($p<0,0001$). Jovens mutantes também tinham níveis séricos de creatinina mais elevados quando comparados a idosas mutantes ($p=0,008$) e controles idosos ($p=0,0001$).

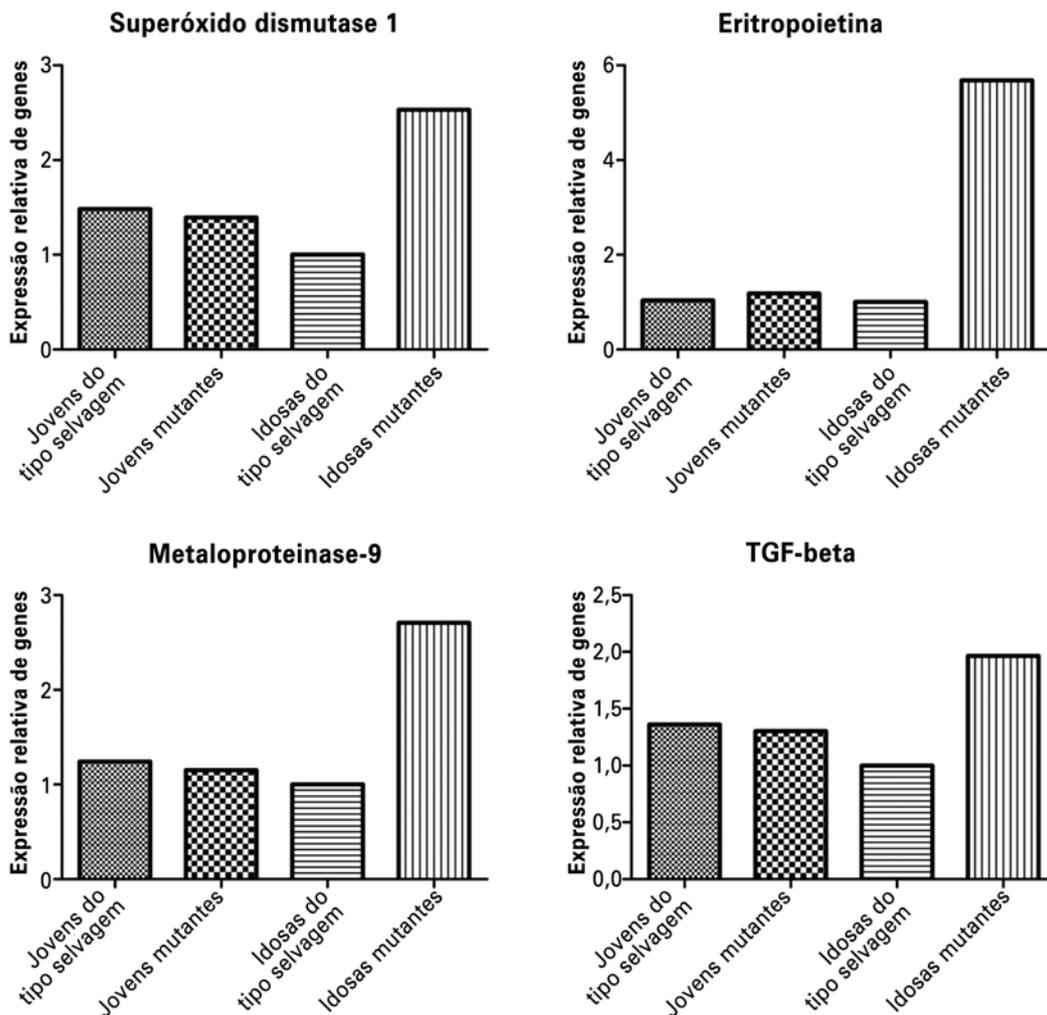


Figura 5. Análises de níveis renais de expressão gênica de superóxido dismutase 1, eritropoietina, metaloproteinase-9 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) nos rins de camundongos *Immp12* e controles do tipo selvagem. Os níveis do DNA mensageiro do superóxido dismutase 1, da eritropoietina, da metaloproteinase-9 e do TGF- β nos rins estavam significativamente maiores em mutantes idosas em comparação às idosas do tipo selvagem

DISCUSSÃO

Fibrose intersticial é o fator comum da maioria das doenças que evoluem para insuficiência renal crônica. Estudos com biópsias de rins humanos mostraram correlação entre a fibrose intersticial e o prognóstico desfavorável.^(10,11) Fibrose renal em diabetes, envelhecimento e lesão por isquemia/reperfusão foi associada à produção excessiva de EROS, que é considerada a principal via patogênica nesses transtornos.⁽³⁾ O excesso de EROS está ligado a alterações no metabolismo mitocondrial, levando ao dano celular. O rim é afetado particularmente pelo processo de envelhecimento: a idade aumenta a glomeruloesclerose e a fibrose intersticial.⁽¹²⁾ Alterações associadas ao envelhecimento no nível celular incluem um número aumentado de mutações no DNA nuclear e no DNA mitocondrial, lipofuscina e produtos finais da glicação avançada (AGEs), estresse

oxidativo aumentado, e consequente aumento da apoptose.⁽¹³⁾ Lesão por isquemia/reperfusão no rim produz excesso de EROS, além da capacidade sequestradora do órgão, causando dano celular; o excesso de EROS foi associado à nefropatia crônica do aloenxerto após transplante renal.⁽⁸⁾ Uma característica comum em todas essas condições é a superprodução de EROS, que resulta em fibrose renal e doença crônica progressiva. O estresse oxidativo e a inflamação agem conjuntamente em muitos tecidos. O estresse oxidativo induz à produção de citocinas inflamatórias que, por sua vez, induzirão à produção de radicais livres. Um aldeído específico é o 4-hidroxi-2-nonenal, que é cada vez mais reconhecido como um mediador e marcador de disfunção celular. No modelo de camundongo *Immp2L*, a superprodução da matriz extracelular, a glomeruloesclerose, a células apoptóticas e a regulação positiva de

genes pró-inflamatórios poderão estar relacionadas ao excesso de superóxido e demonstrar um processo acelerado de envelhecimento com perda de função.

Os camundongos *Immp2L* mutantes têm demonstrado uma deficiência na quantidade de *CYC1* em vários tecidos, incluindo o rim. As mitocôndrias desses animais também demonstraram níveis excessivos de ATP e do íon superóxido. A proteína mitocondrial, *CYC1*, no rim tem um peso molecular maior que nos controles.⁽⁷⁾ Verificamos que, quando comparados a controles da mesma idade, os animais jovens apresentaram um escore maior de glomerulosclerose, formação de cilindros tubulares, e atrofia tubular. Análises da deposição da matriz extracelular, assim como é mostrada pela deposição total de colágeno do tipo IV, foram mais elevadas nos jovens mutantes do que nos animais controle da mesma idade, de forma consistente. Os animais idosos mutantes apresentaram um escore de glomerulosclerose e de atrofia tubular semelhante ao dos animais pareados por idade. Entretanto, camundongos idosos mutantes tiveram deposição significativamente maior de colágeno total e deposição de colágeno do tipo IV que os controles da mesma idade, o que sugere uma deposição aumentada da matriz extracelular e mostra um mecanismo fibrótico que ocorre no rim. Macrófagos/monócitos foram mais abundantes em camundongos mutantes idosos em comparação aos controles da mesma idade, mostrando um possível influxo de células inflamatórias para os tecidos renais durante o processo fibrótico. Ainda, as idosas mutantes apresentavam níveis maiores de creatinina que os controles da mesma idade. Em conjunto, esses achados sugerem que a mutação no *Immp2L* mitocondrial possa alterar a arquitetura normal dos rins pelo aumento de deposição da matriz extracelular.

Quando comparados com controles da mesma idade, animais jovens mutantes apresentaram expressão significativamente maior de SOD-1, a enzima depuradora de superóxido mais comum no rim. A expressão mais elevada da enzima pode representar um mecanismo compensatório para vencer uma produção aumentada de superóxido.^(14,15) Em outros modelos com geração aumentada de EROS, a expressão de SOD parece variar. Fujita et al.⁽³⁾, em dois modelos murinos diabéticos (*KK/Ta-Akita* e *C57BL/6-Akita*), relataram diferente suscetibilidade à nefropatia diabética, apesar dos níveis comparáveis de hiperglicemia. Os camundongos *KK/Ta-Akita* desenvolveram albuminúria à medida que envelheciam e apresentaram regulação negativa de SOD-1 e SOD-3, enquanto os *C57BL/6-Akita* tiveram expressão normal de SOD e eram mais resistentes à nefropatia diabética. Quando camundongos *KK/Ta-Akita*

foram tratados com um mimético de SOD, foi observada uma atenuação da nefropatia diabética. Assim, podemos considerar que a maior expressão de SOD-1 em jovens camundongos mutantes, comparado aos controles pareados por idade, é um mecanismo protetor, embora não seja plenamente eficaz. A quantidade de SOD-1 só diferiu entre idosos mutantes e os controles da mesma idade. Entretanto, as idosas mutantes apresentaram regulação positiva da expressão gênica de SOD-1, o que possivelmente refletia uma tentativa de depurar o excesso de superóxido. Esses achados estão em concordância com os de Dobashi et al.,⁽¹⁴⁾ mostrando que a expressão de genes antioxidantes, tais como SOD-1, não é diretamente coordenada com a respectiva expressão proteica. A perda de enzimas antioxidantes pode ser um fator contribuinte para dano renal como resultado do processo de envelhecimento.

Além de uma regulação positiva de SOD-1, idosas mutantes apresentaram um aumento da proteína 4-HNE no rim, o que mostrou a quebra do mecanismo depurador do superóxido levando ao dano tissular. Esses achados sugerem que, embora jovens animais produzam mais SOD-1, o tecido é apenas parcialmente protegido contra lesão renal.

A transição epitélio-mesenquimal define uma transformação fenotípica nas células epiteliais.^(2,10,16) Após uma lesão, as células epiteliais perdem seus marcadores epiteliais e começam a expressar alguns marcadores mesenquimais, como S100A4. Animais idosos mutantes apresentaram uma presença significativamente maior de S100A4 do que seus controles pareados para idade, enquanto os jovens mutantes não mostraram esse marcador nas células epiteliais tubulares. Essas observações sugerem que, durante exposição crônica ao superóxido, as células renais perdem sua diferenciação e começam a expressar marcadores de fibroblastos que representam a transição epitélio-mesenquimal. Essa transformação pode ser uma das fontes da superprodução da matriz extracelular nos rins de idosas mutantes, representada como um aumento de deposição do colágeno do tipo IV. A expressão gênica da MMP-9 também estava com regulação positiva em mutantes idosas *Immp2L* na tentativa de digerir enzimaticamente a deposição de colágeno. Esses dados sugerem que a mutação mitocondrial *Immp2L* leva à transição epitélio-mesenquimal e à fibrose progressiva no rim.

Animais idosos mutantes apresentavam um número significativamente maior de células apoptóticas que os controles da mesma idade, sugerindo que a sinalização de *Immp2L* pode atenuar a apoptose celular. No modelo animal de lesão por isquemia/reperfusão renal, a administração de uma enzima antioxidante mimética,

MnTMPyP, atenuou o número de células apoptóticas.⁽⁸⁾ Isso sugeriu que o dano oxidativo estava associado a um aumento de apoptose celular. Os efeitos antiapoptóticos da EPO exógena foram relatados por vários pesquisadores.⁽¹⁷⁻²¹⁾ A EPO recombinante humana (rhEPO) tem múltiplas funções parácrinas e autócrinas que coordenam as respostas locais a danos, atenuando tanto as causas primárias (apoptóticas) e secundárias (inflamatórias) da morte celular.⁽²²⁾ Ainda, alguns estudos clínicos relataram que rhEPO reduziu o estresse oxidativo.⁽²³⁾ Pode-se especular que, no nosso modelo, o aumento na expressão de EPO em camundongos idosos mutantes tenha ocorrido por uma resposta compensatória ao dano renal.

CONCLUSÕES

Uma mutação no gene *Immp2L*, associada a aumentos nos níveis de superóxido mitocondrial, atenuou os marcadores de defesa antioxidante e aumentou a deposição de matriz extracelular intersticial renal e glomeruloesclerose com perda de função. Sugerimos que *Immp2L* seja protetor contra o desenvolvimento de fibrose renal. Além disso, o modelo de camundongo *Immp2L* mutante pode ser útil para futuras investigações sobre o papel do superóxido no desenvolvimento de fibrose renal e o processo de envelhecimento.

Contribuição dos autores

Nadia Karina Guimarães-Souza fez o projeto do estudo, realizou os experimentos, escreveu e revisou o manuscrito. Liliya Marsova Yamaleyeva fez os experimentos, escreveu e revisou o manuscrito. Ana Claudia Mallet realizou os experimentos. Baisong Lu forneceu os camundongos *Immp2L* mutantes. Colin E. Bishop forneceu camundongos *Immp2L* mutantes. Karl Erik Andersson projetou o estudo e revisou o manuscrito.

REFERÊNCIAS

- Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008; 214(2):199-210. Review.
- Djamali A, Reese S, Yracheta J, Oberley T, Hullett D, Becker B. Epithelial-to-mesenchymal transition and oxidative stress in chronic allograft nephropathy. *Am J Transplant.* 2005;5(3):500-9.
- Fujita H, Fujishima H, Chida S, Takahashi K, Qi Z, Kanetsuna Y, et al. Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(6):1303-13.
- Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.* 2004;44(3):248-52. Review.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82(2):291-5. Review.
- Mattson MP. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol.* 2009;44(10):625-33. Review.
- Lu B, Poirier C, Gaspar T, Gratzke C, Harrison W, Busija D, et al. A mutation in the inner mitochondrial membrane peptidase 2-like gene (*Immp2L*) affects mitochondrial function and impairs fertility in mice. *Biol Reprod.* 2008;78(4):601-10.
- Kim J, Seok YM, Jung KJ, Park KM. Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297(2):F461-70.
- Jaimes EA, Galceran JM, Raji L. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int.* 1998;54(3):775-84.
- Bedi S, Vidyasagar A, Djamali A. Epithelial-to-mesenchymal transition and chronic allograft tubulointerstitial fibrosis. *Transplant Rev (Orlando).* 2008;22(1):1-5. Review.
- Mackensen-Haen S, Bohle A, Christensen J, Wehrmann M, Kendziorra H, Kokot F. The consequences for renal function of widening of the interstitium and changes in the tubular epithelium of the renal cortex and outer medulla in various renal diseases. *Clin Nephrol.* 1992;37(2):70-7.
- Baylis C. Changes in renal hemodynamics and structure in the aging kidney; sexual dimorphism and the nitric oxide system. *Exp Gerontol.* 2005;40(4):271-8. Review.
- Percy CJ, Power D, Gobe GC. Renal ageing: changes in the cellular mechanism of energy metabolism and oxidant handling. *Nephrology (Carlton).* 2008;13(2):147-52. Review.
- Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem.* 2000;205(1-2):1-11.
- Ghosh S, Khazaei M, Moien-Afshari F, Ang LS, Granville DJ, Verchere CB, et al. Moderate exercise attenuates caspase-3 activity, oxidative stress, and inhibits progression of diabetic renal disease in db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(4):F700-8.
- Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* 2002; 110(3):341-50.
- Park SH, Choi MJ, Song IK, Choi SY, Nam JO, Kim CD, et al. Erythropoietin decreases renal fibrosis in mice with ureteral obstruction: role of inhibiting TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(5):1497-507.
- Hamed S, Ullmann Y, Masoud M, Hellou E, Khamaysi Z, Teot L. Topical erythropoietin promotes wound repair in diabetic rats. *J Invest Dermatol.* 2010;130(1):287-94.
- Shimoda M, Sawada T, Iwasaki Y, Mori S, Kijima H, Okada T, et al. Erythropoietin strongly protects the liver from ischemia-reperfusion injury in a pig model. *Hepatology.* 2009;56(90):470-5.
- Timmer SA, De Boer K, Knaapen P, Götte MJ, Van Rossum AC. The potential role of erythropoietin in chronic heart failure: from the correction of anemia to improved perfusion and reduced apoptosis? *J Card Fail.* 2009;15(4):353-61. Review.
- Song YR, You SJ, Lee YM, Chin HJ, Chae DW, Oh YK, et al. Activation of hypoxia-inducible factor attenuates renal injury in rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(1):77-85.
- Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(8):4802-6.
- Kumral A, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Genc K, Yilmaz O, et al. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate.* 2005;87(1):15-8.