

Efeito do octreotide no estresse oxidativo em eritrócitos e no tecido renal no modelo de síndrome nefrótica experimental induzida por adriamicina

Effect of octreotide on oxidative stress in the erythrocyte and kidney tissue in adriamycin-induced experimental nephrotic syndrome model

Autores

Sibel Cavdar¹ 
 Alev Garip Acar² 
 Asuman Camyar³ 
 Ender Hür⁴ 
 Eser Yıldırım Sozmen⁵ 
 Sait Sen⁶ 
 Melih Ozısık⁷ 
 Yasemin Delen Akcay⁸ 
 Elif Duman⁸ 
 Sena Gönen⁹ 
 Fehmi Akcicek¹ 
 Soner Duman¹ 

¹Ege University, Medical Faculty Hospital, Department of Internal Medicine, Izmir, Turkey.

²Izmir Atatürk Training and Research Hospital, Department of Internal Medicine, Izmir, Turkey.

³Izmir Çiğli Training and Research Hospital, Department of Internal Medicine, Izmir, Turkey.

⁴Uşak University Medical Faculty Hospital, Department of Internal Medicine, Uşak, Turkey.

⁵Ege University Medical Faculty Hospital, Department of Medical Biochemistry, Izmir, Turkey.

⁶Ege University Medical Faculty Hospital, Department of Pathology, Izmir, Turkey.

⁷Izmir Tepecik Training and Research Hospital, Department of Internal Medicine, Izmir, Turkey.

⁸Suat Seren Chest Diseases and Surgery Training and Research Hospital, Izmir, Turkey.

⁹Ege University Medical Faculty Hospital, Department of Microbiology, Izmir, Turkey.

Data de submissão: 02/12/2022.

Data de aprovação: 26/05/2023.

Data de publicação: 31/07/2023.

Correspondência para:

Sibel Cavdar.

E-mail: sibelilgun@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2022-0180pt>

RESUMO

Introdução: Síndrome nefrótica (SN) é uma das causas de doença renal em estágio terminal. É importante elucidar a patogênese e oferecer novas opções de tratamento. Estresse oxidativo pode desencadear a patogênese sistemicamente ou isoladamente nos rins. O octreotide (OCT) tem efeitos antioxidantes benéficos. Nosso objetivo foi investigar a fonte de estresse oxidativo e efeito do OCT no modelo experimental de SN. **Métodos:** Dividimos 24 ratos albinos Wistar não urêmicos em 3 grupos. Grupo controle, 2 mL de solução salina intramuscular (im); grupo SN, adriamicina 5 mg/kg intravenosa (iv); grupo tratamento SN, adriamicina 5 mg/kg (iv) e OCT 200 mcg/kg (im) foram administrados no início do estudo (Dia 0). Aos 21 dias, mediram-se os níveis de creatinina e proteína em amostras de urina de 24 horas. Mediu-se a catalase (CAT) eritrocitária e renal e a substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Avaliou-se também histologia renal. **Resultados:** Não houve diferença significativa entre os três grupos em termos de CAT e TBARS em eritrócitos. O nível de CAT renal foi menor no grupo SN e significativamente menor que no grupo controle. No grupo tratamento, o nível de CAT aumentou significativamente em comparação com o grupo SN. Quanto à histologia renal, as avaliações tubular e intersticial foram semelhantes em todos os grupos. O escore glomerular foi significativamente maior no grupo SN em comparação com o grupo controle e diminuiu significativamente no grupo de tratamento em comparação com o grupo SN. **Conclusões:** Estresse oxidativo na SN pode ser devido à diminuição do mecanismo de proteção antioxidante nos rins. O octreotide melhora níveis de antioxidantes e histologia do tecido renal e pode ser uma opção de tratamento.

ABSTRACT

Introduction: Nephrotic syndrome (NS) is one of the reasons of end-stage kidney disease, and elucidating the pathogenesis and offer new treatment options is important. Oxidative stress might trigger pathogenesis systemically or isolated in the kidneys. Octreotide (OCT) has beneficial antioxidant effects. We aimed to investigate the source of oxidative stress and the effect of OCT on experimental NS model. **Methods:** Twenty-four non-uremic Wistar albino rats were divided into 3 groups. Control group, 2 mL saline intramuscular (im); NS group, adriamycin 5 mg/kg intravenous (iv); NS treatment group, adriamycin 5 mg/kg (iv) and OCT 200 mcg/kg (im) were administered at baseline (Day 0). At the end of 21 days, creatinine and protein levels were measured in 24-hour urine samples. Erythrocyte and renal catalase (CAT) and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) were measured. Renal histology was also evaluated. **Results:** There was no significant difference among the 3 groups in terms of CAT and TBARS in erythrocytes. Renal CAT level was lowest in NS group, and significantly lower than the control group. In treatment group, CAT level significantly increased compared with NS group. In terms of renal histology, tubular and interstitial evaluations were similar in all groups. Glomerular score was significantly higher in NS group compared with control group and it was significantly decreased in treatment group compared to NS group. **Conclusions:** Oxidative stress in NS might be due to the decrease in antioxidant protection mechanism in kidney. Octreotide improves antioxidant levels and histology in renal tissue and might be a treatment option.



Descritores: Síndrome Nefrótica; Octreotide; Espécies Reativas de Oxigênio; Catalase; Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico; Estresse Oxidativo.

Keywords: Nephrotic Syndrome, Octreotide, Reactive Oxygen Species, Catalase, Thiobarbituric Acid Reactive Substance, Oxidative Stress.

INTRODUÇÃO

A síndrome nefrótica (SN) é uma das causas da doença renal em estágio terminal, e os mecanismos fisiopatológicos são importantes para novas opções de tratamento¹. Embora os mecanismos imunológicos, a autoimunidade e a predisposição genética desempenhem um papel na patogênese da SN, ela também pode se desenvolver como resultado do estresse oxidativo, que é um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e os mecanismos de defesa antioxidante². Acredita-se que as EROs desempenhem um papel importante também na patogênese da proteinúria, causando aumento da permeabilidade da parede glomerular e migração de podócitos^{3,4}.

É possível produzir a SN experimentalmente com diferentes métodos para estudar a fisiopatologia da SN⁵. A adriamicina (cujo nome genérico é doxorubicina (DOX)) é um agente antineoplásico do grupo das antraciclinas que induz a nefropatia experimentalmente^{6,7}. No modelo de síndrome nefrótica induzida por adriamicina, a adriamicina estimula o dano oxidativo nos glomérulos, aumenta o dano aos podócitos, causa alterações na membrana basal glomerular e provoca danos semelhantes à doença de alteração mínima/glomeruloesclerose segmentar focal^{8,9}. Um modelo de nefropatia induzida por adriamicina é induzido por uma única injeção na veia caudal de 5–7,5 mg/kg de adriamicina¹⁰. Após a administração intravenosa (iv), a adriamicina é rapidamente eliminada do plasma e se acumula nos tecidos, principalmente nos rins¹¹. Por esse motivo, sua característica nefrotóxica é evidente. A adriamicina causa glomeruloesclerose grave, fibrose intersticial e inflamação, lesão das células endoteliais glomerulares e dos podócitos¹². Além disso, sugeriu-se que o estresse oxidativo é responsável pela patogênese da proteinúria nesse modelo¹³.

Em seres humanos, os produtos oxidantes são constantemente formados como resultado do metabolismo aeróbico normal¹⁴. Em condições fisiológicas normais, a produção de oxidantes é equilibrada por mecanismos antioxidantes, evitando assim danos oxidativos¹⁵. Sob estresse, o equilíbrio entre as EROs e o sistema antioxidante é interrompido em favor das EROs, resultando em estresse oxidativo e citotoxicidade^{16,17}. O estresse oxidativo causa danos celulares por peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, mutações e quebras do ácido desoxirribonucleico (DNA), efeitos citotóxicos e interrupções na sinalização¹⁷.

A somatostatina é um neuro-hormônio tetradecapeptídeo inibitório geral que apresenta diversos efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios^{18,19}. O octreotide (OCT), um análogo sintético da somatostatina, possui uma estrutura octapeptídica e é resistente à degradação metabólica²⁰. Além disso, sua duração de ação é maior do que a do hormônio natural²⁰. As propriedades antioxidantes do OCT também foram relatadas em alguns estudos clínicos e em vários modelos experimentais^{21,22}.

No presente estudo, o objetivo foi investigar a fonte de estresse oxidativo e se o OCT é um agente terapêutico útil para o modelo de SN induzida por adriamicina em ratos, por meio de radicais livres de oxigênio.

MÉTODOS

PROTOCOLO DE ESTUDO

Vinte e quatro ratos Wistar albinos machos não urêmicos (n: 24; peso 180–220 gramas) obtidos do Centro de Pesquisa e Aplicação de Animais de Laboratório da *Ege University* (Izmir, Turquia) foram divididos aleatoriamente em três grupos iguais. Eles foram alojados em gaiolas de policarbonato sob

temperatura ambiente de 24°C com um ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com uma dieta padrão de laboratório (40 g/dia) e tiveram livre acesso à água da torneira. O Comitê de Ética Animal do Hospital Universitário Ege aprovou o desenho do estudo (Número de Aprovação Ética: 2010–33). Foram seguidas as diretrizes institucionais e nacionais para o cuidado e uso de animais de laboratório.

TRATAMENTOS

Todas as injeções foram administradas no início do estudo (Dia 0). Nenhuma outra injeção foi aplicada em nenhum grupo nos dias seguintes até o dia do sacrifício. Os tratamentos e procedimentos aplicados estão resumidos na Tabela 1. Os grupos foram formados da seguinte maneira.

- 1) Grupo 1: Grupo controle (n = 8): 2 ml de solução salina foram administrados por via intramuscular (im);
- 2) Grupo 2: Grupo síndrome nefrótica (SN) (n = 8): Foram administrados 5 mg/kg de adriamicina (Doxorrubicina Hexal®; Sandoz, Basileia, Suíça) (iv via veia caudal);
- 3) Grupo 3: Grupo de tratamento da síndrome nefrótica (TSN) (SN + OCT) (n = 8): Foram administrados 5 mg/kg de adriamicina (iv via veia caudal) e 200 mcg/kg de octreotide (Sandostatin LAR®; Novartis, Basel, Suíça).

No 20º dia após as injeções, todos os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24 horas. As gaiolas metabólicas permitem a coleta separada de urina e fezes de animais experimentais. No 21º dia, os ratos foram anestesiados com injeção

intraperitoneal de anestesia com cetamina HCL (Ketalar®; Pfizer, Istambul, Turquia) (60 mL/kg de peso corporal) e as amostras de sangue foram imediatamente coletadas por meio de punção cardíaca direta nos ratos sacrificados. A avaliação semiquantitativa dos rins foi realizada pelo mesmo patologista, que desconhecia os grupos.

PARÂMETROS FUNCIONAIS

Os níveis séricos de proteína total, colesterol total, triglicerídeos e creatinina foram medidos espectrofotometricamente com kits comerciais (Biolabo Reagents, Maizy, França).

A concentração total de proteína urinária (miligramas por decilitro) foi determinada usando o método de Lowry.

DETERMINAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Os níveis de EROs em amostras biológicas podem ser medidos diretamente ou pela avaliação do dano oxidativo e do status antioxidante. O exame de danos relevantes em proteínas, lipídios e DNA pode ser usado indiretamente para estimar os níveis de EROs¹⁵.

Os lipídios são altamente sensíveis ao ataque oxidante. O malondialdeído (MDA) é um dos principais biomarcadores para a avaliação da peroxidação lipídica, e os produtos da peroxidação lipídica, como a substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sua sigla em inglês), é um método comumente usado para sua detecção²³.

Os antioxidantes são examinados como dois grupos, enzimáticos e não enzimáticos. A catalase (CAT) é um dos antioxidantes enzimáticos¹⁵, e foi

TABELA 1 TRATAMENTOS E PROCEDIMENTOS UTILIZADOS NOS GRUPOS

	Substâncias injetáveis	Dia das injeções	Dia da colocação dos ratos em gaiolas metabólicas	Dia do sacrifício, injeção de cetamina, anestesia com HCL
Grupo 1: Grupo controle (n = 8)	2 ml de solução salina (im)	0	20	21
Grupo 2: Grupo SN (n = 8)	DOX 5mg/kg (iv)	0	20	21
Grupo 3: Grupo TSN (n = 8)	DOX 5mg/kg (iv) OCT 200mcg/kg (im)	0	20	21

SN: síndrome nefrótica; TSN: tratamento da síndrome nefrótica; DOX: doxorubicina; OCT: octreotide.

selecionada para o nosso estudo, uma vez que foi demonstrado que as doenças glomerulares aumentam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no rim e a enzima chave no metabolismo do H_2O_2 é a CAT^{15,24}.

Os níveis de TBARS e CAT foram medidos no tecido renal e nos eritrócitos plasmáticos.

ERITRÓCITO

Preparo do hemolisado: após a separação do plasma, os eritrócitos foram lavados duas vezes com solução de NaCl (cloreto de sódio) 9 g/L e hemolisados pela aplicação de água gelada (1/5, v/v). A atividade da CAT no hemolisado foi imediatamente estudada. Os níveis de TBARS foram estudados após a diluição do hemolisado em solução salina fisiológica. Após a diluição, foi adicionado ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) e fervido a 95 graus por 30 minutos.

TECIDO RENAL

Os tecidos foram pesados e homogeneizados com tampão fosfato (1/10: p/v) em gelo. As análises foram feitas após centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos.

MEDIÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA)

O TBA (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) foi adicionado ao homogeneizado. Após ferver por 20 minutos a 100°C e centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos, foram feitas medições colorimétricas no sobrenadante em um comprimento de onda de 532 nm. O MDA (nmol/mL) foi calculado com base no gráfico padrão (1.1.1.3 tetraetoxipropan, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha). Os resultados foram apresentados como nmol/gHb.

MEDIÇÃO DA CATALASE

Os homogenatos foram diluídos em tampão fosfato (50 mM, pH = 7) na proporção de 1:10 e as atividades da catalase foram determinadas pelo método espectrofotométrico ultravioleta (UV) com base na degradação do peróxido de hidrogênio pela catalase²⁵. Uma amostra foi adicionada a uma solução tampão de fosfato recém-preparada contendo 30 mM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , Carlo Erba, Val de Reuil, França). A diminuição da absorbância a um comprimento de onda de 240 nm foi lida durante 2 minutos em intervalos de 15 segundos. O valor de k e a quantidade de enzima foram calculados encontrando-se as absorbâncias mais adequadas para cada análise de acordo com as regressões lineares.

PARÂMETROS ESTRUTURAIS

Para a avaliação histopatológica, a cápsula foi removida dos rins, que foram então seccionados transversalmente. Os rins foram deixados em solução de formalina a aproximadamente 4% e, em seguida, processados para inclusão em parafina. Seções de parafina de 3 a 5 mm de espessura foram cortadas dos blocos, preparadas rotineiramente, coradas com hematoxilina e eosina e, em seguida, avaliadas em um microscópio óptico (BX, Olympus, Tóquio, Japão) por um único patologista sem conhecimento dos grupos. A esclerose glomerular, a necrose tubular e a inflamação intersticial foram avaliadas semiquantitativamente de 0 a 4. O escore histopatológico está resumido na Tabela 2.

ESCLEROSE GLOMERULAR (EG), DEFINIDA COMO ADESÕES, ESCLEROSE E PROLIFERAÇÃO QUE AFETAM A DISTÂNCIA DE BOWMAN E OS GLOMÉRULOS

Escore: Glomérulos

0. Comum, ausência de EG.
1. Suspeita de adesão glomerular e esclerose não pôde ser determinada com clareza. A distância de Bowman é estreita e a bola glomerular toca a cápsula.
2. Menos de 5% de esclerose segmentar e/ou adesão à cápsula de Bowman. Afeta menos de 5% dos glomérulos e menos de 10% do glomérulo.
3. Mais de 10% de esclerose glomerular e adesões.
4. Mais de 25% de esclerose glomerular e adesões.

INFLAMAÇÃO INTERSTICIAL (II), DEFINIDA COMO INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS EM ÁREAS PERIVASCULARES E INTERSTICIAIS

Escore: Interstício

0. Comum, ausência de II.
1. Infiltrado inflamatório em um campo microscópico na área cortical.
2. Infiltrado inflamatório mais pronunciado na área cortical, focal, não excedendo 10%.
3. 10–25% de infiltrado inflamatório.
4. Mais de 25% de infiltrado inflamatório.

NECROSE TUBULAR (NT), DEFINIDA COMO PERDA DE CÉLULAS EPITELIAIS DO NÚCLEO, CITOPLASMA ACIDÓFILO ESCURO, PERDA DE CÉLULAS EPITELIAIS TUBULARES NO LÚMEN TUBULAR E SEÇÕES ACELULARES DE TÚBULOS

Escore: Túbulos

0. Comum, ausência de NT.
1. Alterações vacuolares tubulares.

TABELA 2 ESCORES HISTOPATOLÓGICOS

Escores para avaliação histopatológica	Esclerose glomerular (EG)	Inflamação intersticial (II)	Necrose tubular (NT)
0	Comum. Ausência de EG.	Comum. Ausência de II.	Comum. Ausência de NT.
1	Suspeita de adesão glomerular, esclerose não pôde ser determinada com clareza. A distância de Bowman é estreita e a bola glomerular toca a cápsula.	Infiltrado inflamatório em um campo microscópico na área cortical.	Alterações vacuolares tubulares.
2	Menos de 5% de esclerose segmentar e/ou adesão à cápsula de Bowman. Afeta menos de 5% dos glomérulos e somente menos de 10% do glomérulo.	Infiltrado inflamatório mais pronunciado na área cortical, focal, não excedendo 10%.	Características regenerativas tubulares - hiper Cromasia tubular e alteração no padrão da cromatina.
3	EG: 10%–25%	II: 10–25%	Degeneração/regeneração tubular, bem como agrupamento de cilindros tubulares.
4	EG > 25%	II > 25%	Necrose tubular difusa.

EG: Esclerose glomerular; II: Inflamação intersticial; NT: Necrose tubular.

2. Características regenerativas tubulares, hiper Cromasia tubular e alteração no padrão da cromatina.
3. Degeneração e regeneração tubular, bem como agrupamento de cilindros tubulares.
4. Necrose tubular difusa.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, foi utilizado o programa SPSS 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA). As variáveis contínuas são relatadas como médias \pm desvios padrão (DP). Os testes não paramétricos Kruskal Wallis e U de Mann-Whitney foram usados para comparar diferenças de grupos independentes, uma vez que as suposições do teste paramétrico não foram atendidas. O teste de Kruskal Wallis foi aplicado para comparar as médias dos três grupos. O teste U de Mann-Whitney foi usado para comparar grupos binários. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

A excreção de proteína na urina foi maior no grupo SN em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$) e com o grupo TSN ($p < 0,05$). Os níveis séricos de proteína total foram menores no grupo SN em comparação com o grupo controle e com o grupo TSN ($p < 0,05$; $p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de creatinina

plasmática no grupo SN e no grupo de tratamento da SN em comparação com o grupo controle. Os níveis de creatinina foram semelhantes em todos os três grupos. Embora o valor de triglicerídeos séricos no grupo SN tenha sido maior do que no grupo controle ($p < 0,05$), não foi observada diferença significativa entre os grupos TSN e SN ($p > 0,05$). Também não houve diferença significativa entre os grupos em termos de valores séricos de colesterol total ($p > 0,05$). As medições bioquímicas de plasma e urina dos grupos são mostradas na Tabela 3 e no Gráfico 1.

Não houve diferença significativa nos níveis de CAT e TBARS dos eritrócitos entre os 3 grupos (Tabela 3, Gráfico 2). No tecido renal, os níveis de TBARS aumentaram no grupo SN em comparação com o grupo controle ($p > 0,05$) e diminuíram no grupo de tratamento em comparação com o grupo SN ($p > 0,05$). No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 3, Gráfico 3). O nível de catalase no tecido renal diminuiu no grupo SN em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$), e um aumento estatisticamente significativo foi encontrado no grupo de tratamento em comparação com o grupo SN ($p < 0,05$) (Tabela 3, Gráfico 3). Na avaliação histológica do rim, não foi encontrada diferença significativa entre os três grupos nas estruturas tubular e intersticial ($p > 0,05$ para todas as comparações). O escore de patologia glomerular aumentou no grupo SN em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$)

TABELA 3 ACHADOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E HISTOLÓGICOS

		Grupo controle (n = 8)	Grupo Síndrome Nefrótica (SN) (n = 8)	Grupo de Tratamento da Síndrome Nefrótica (TSN) (n = 8)
		média ± DP	média ± DP	média ± DP
Rato	Peso (gr)	217 ± 17	235 ± 12	209 ± 9
Urina	Volume (cc)	3,8 ± 0,3	8,5 ± 1a	6 ± 1
	Proteinúria (mg/dL/dia)	12,7 ± 0,4	227 ± 60a	52 ± 20b
Plasma	Creatinina (mg/dL)	0,6 ± 0,06	0,4 ± 0,07a	0,4 ± 0,04a
	Proteína total (g/dL)	5,8 ± 0,02	3,7 ± 0,6a	5,9 ± 0,05b
	Colesterol (mg/dL)	188 ± 5	248 ± 19	222 ± 28
	Triglicerídeos (mg/dL)	91 ± 5	138 ± 13a	135 ± 24
Eritrócitos	CAT (U/gHb)	2464 ± 500	2547 ± 660	1442 ± 556
	TBARS (nmol/gHb)	116 ± 14	95 ± 6,3	105 ± 8
Tecido Renal	CAT (U/mL)	53 ± 2	35 ± 4,3a	50 ± 2,47b
	TBARS (mmol/mg)	0,35 ± 0,03	0,38 ± 0,02	0,36 ± 0,01
Histologia Renal	Glomerular	0 ± 0	1,1 ± 0,35a	0 ± 0b
	Interstício	0,6 ± 0,4	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,2
	Tubular	0,34 ± 0,3	0,50 ± 0,27	1,3 ± 0,4

Os valores numéricos são apresentados como média ± DP e o teste de Kruskal Wallis foi usado para a comparação média dos três grupos. O teste U de Mann-Whitney foi usado para comparar as médias de dois grupos independentes.

CAT: catalase; TBARS: substância reativa ao ácido tiobarbitúrico; DP: desvio padrão.

a: *versus* controle; b: *versus* grupo síndrome nefrótica; (p < 0,05).

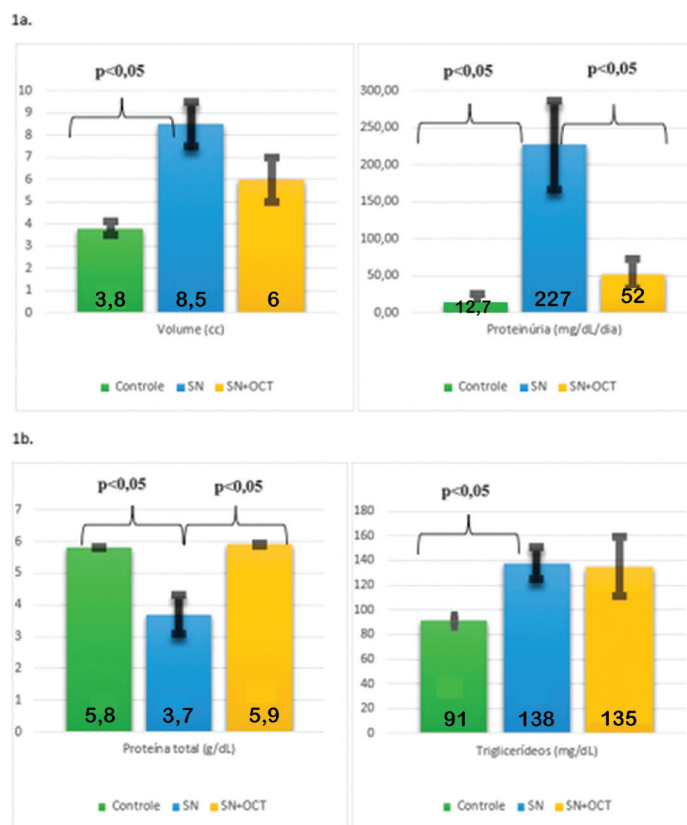


Gráfico 1. Desenvolvimento de síndrome nefrótica. 1a: Alteração do volume urinário e proteinúria; 1b: Alteração da proteína total plasmática e triglicerídeos. O desenvolvimento da síndrome nefrótica foi demonstrado por alterações no volume urinário, proteinúria, proteína total plasmática e níveis de triglicerídeos. SN: Síndrome nefrótica; OCT: Octreotídeo.

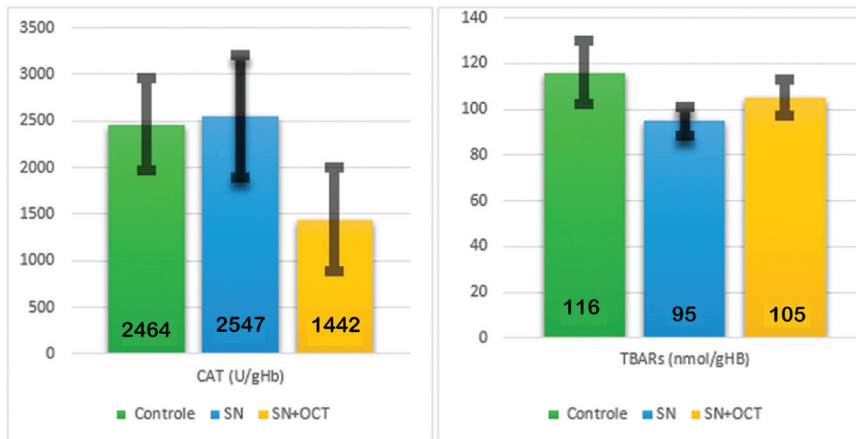


Gráfico 2. Alterações na CAT e TBARS em eritrócitos. Não há alterações significativas na CAT e TBARS em eritrócitos do grupo controle, do grupo SN e do grupo SN + OCT ($p > 0,05$). CAT: catalase; TBARS: substância reativa ao ácido tiobarbitúrico; SN: síndrome nefrótica; OCT: octreotíde.

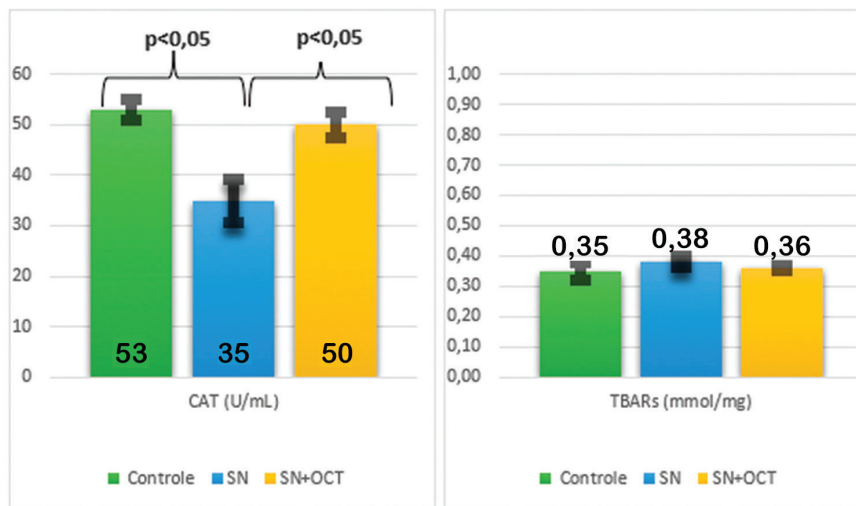


Gráfico 3. Alterações de CAT e TBARS no tecido renal. CAT: catalase; TBARS: substância reativa ao ácido tiobarbitúrico; SN: síndrome nefrótica; OCT: octreotíde.

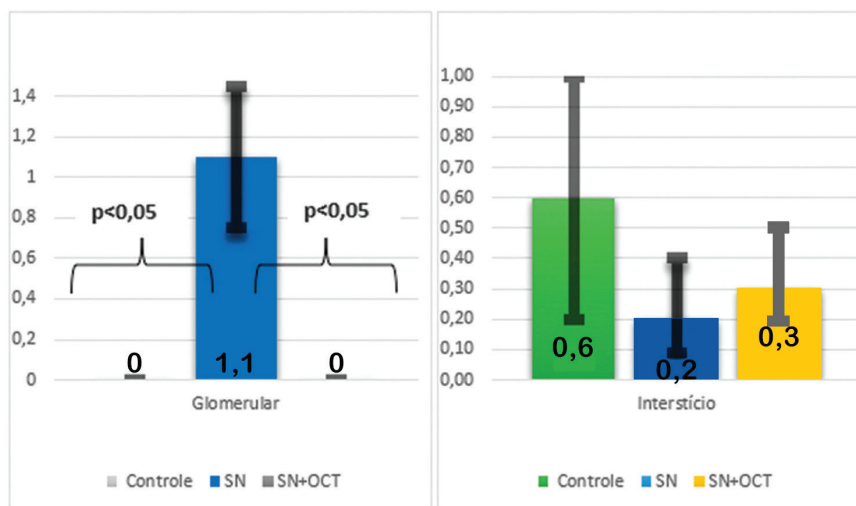


Gráfico 4. Efeito do OCT na histologia renal. $p < 0,05$ para glomérulos, $p > 0,05$ para interstício. SN: síndrome nefrótica; OCT: octreotíde.

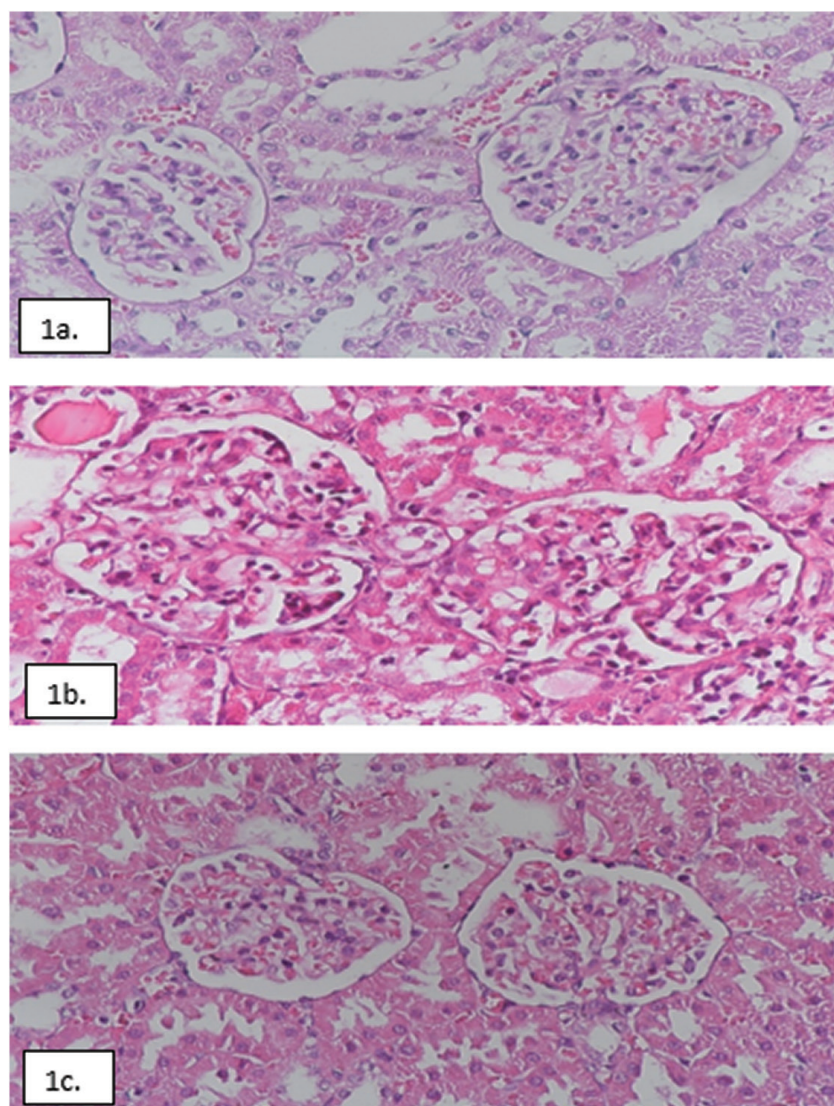


Figura 1. Patologia Renal. **1a.** Grupo controle, **1b.** Grupo SN, **1c.** Grupo TSN (SN + OCT). Visão de microscopia óptica dos rins dos grupos controle, SN e TSN (SN + OCT). (H&E, X40). SN: Síndrome nefrótica; TSN: Tratamento da síndrome nefrótica; OCT: Octreotide; H&E; Hematoxilina e eosina. **1a.** Histologia normal é observada no grupo controle. **1b.** No grupo SN, observam-se adesão, esclerose e proliferação concomitante na cápsula de Bowman. **1c.** No grupo TSN (SN + OCT), a distância de Bowman é observada como normal, esclerose e proliferação não são observadas.

e diminuiu significativamente no grupo de tratamento em comparação com o grupo SN (Figura 1, Tabela 3, Gráfico 4).

DISCUSSÃO

A síndrome nefrótica engloba etiologicamente uma variedade de doenças e é caracterizada por proteinúria, hipoalbuminemia, hiperlipidemia e edema¹. A proteinúria é um importante fator de risco para a progressão da insuficiência renal crônica e existe uma forte relação entre o nível de proteína urinária e o estresse oxidativo no rim^{26,27}. Além disso, a SN é uma causa importante de doença renal em estágio terminal¹. Por esse motivo, é extremamente

importante elucidar a patogênese da SN e da proteinúria para o desenvolvimento de novas opções de tratamento. Portanto, modelos experimentais de SN estão sendo desenvolvidos, e os estudos sobre esse assunto prosseguem. Neste estudo, 3 semanas após a administração de uma dose única de 5 mg/kg de adriamicina iv, a SN se desenvolveu com aumento da proteinúria na urina de 24 horas, diminuição da proteína total sérica e alto escore de esclerose glomerular na avaliação histológica.

Embora as etiologias subjacentes e a patogênese da SN sejam diferentes, as EROs podem desempenhar um papel importante na etiopatogenia da proteinúria²⁷⁻²⁹. A formação de EROs é desencadeada na maioria

das doenças renais, incluindo a SN²⁷. Embora isso sugira que a formação de EROs seja o resultado da SN, outros experimentos em animais também demonstraram que as EROs causam a SN ao afetar os podócitos^{27,29}, que são altamente vulneráveis a danos oxidativos³. As EROs podem estar envolvidas na patogênese da lesão glomerular por mecanismos tóxicos, isquêmicos e imunológicos³⁰. O aumento dos níveis de EROs dentro das células pode levar a eventos de oxidação aleatórios e irreversíveis, causando danos permanentes às macromoléculas, como DNA, lipídios e proteínas, contribuindo, em última análise, para a morte celular e/ou o desenvolvimento de doenças¹⁴. A lesão glomerular é diretamente mediada pelo aumento da geração de EROs, como H₂O₂, OH⁻, radicais de ânion superóxido e produtos de peroxidação lipídica³.

Não está claro se a fonte de estresse oxidativo na patogênese da SN está no nível sistêmico ou renal. Alguns estudos demonstraram que o desequilíbrio entre as EROs e o sistema antioxidante na SN está relacionado à reação oxidativa originada dos neutrófilos circulantes^{29,31}. Além disso, o acúmulo crônico de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPPs, por sua sigla em inglês) no plasma tem sido associado à perda de podócitos, proteinúria e glomeruloesclerose³. Por outro lado, em um estudo realizado em crianças com SN, no qual o estresse oxidativo foi avaliado, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos remissão e controle quanto aos níveis de MDA nos eritrócitos³². Em nosso estudo, quando o grupo SN, o grupo de tratamento da SN e o grupo controle foram comparados, não foi observada nenhuma alteração significativa nos níveis de TBARS e CAT medidos em eritrócitos. Esse achado pode indicar que a SN induzida por adriamicina está relacionada à patologia renal isolada, e não a uma reação oxidativa sistêmica. Baud et al.³⁰ também relataram que, em doenças glomerulares, os macrófagos isolados dos glomérulos produzem mais radicais do que os monócitos no sangue periférico. Isso sustenta a ideia de que o equilíbrio comprometido do sistema ERO-antioxidante na SN resulta do tecido renal, e não de uma reação oxidativa sistêmica.

O estresse oxidativo na doença renal está ligado tanto à depleção de antioxidantes quanto ao aumento da produção de EROs³³. Em nosso estudo, os níveis de TBARS no tecido renal aumentaram no grupo SN em comparação com o grupo controle e diminuíram no grupo de tratamento em comparação com o grupo

SN, mas essas diferenças não foram estatisticamente significativas. Isso pode estar relacionado à meia-vida curta do MDA e de outros produtos de peroxidação lipídica^{29,34}. No entanto, o ensaio de TBARS é geralmente considerado um bom indicador dos níveis gerais de estresse oxidativo em um material biológico³⁵. Além disso, sabe-se que os produtos de oxidação de proteínas, que têm uma meia-vida mais longa, estão associados a danos podocitários, proteinúria e desenvolvimento de glomeruloesclerose segmentar focal, bem como fibrose tubulointersticial³.

Estudos para novas opções de tratamento para a SN estão em andamento, e estudos sobre EROs, que se acredita desempenharem um papel na etiopatogenia da SN e da proteinúria, podem ser um passo acertado. Evitar fatores que causam estresse oxidativo é muito importante na prevenção da formação e progressão de muitas doenças³⁶. Devido ao envolvimento do estresse oxidativo na fibrose renal, as terapias que visam o estresse oxidativo são promissoras²⁷. Até onde sabemos pela literatura, o OCT, que foi testado em diversas doenças e demonstrou influenciar as EROs^{22,37}, nunca foi testado na SN.

Estudos clínicos relataram propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antiapoptóticas do OCT e seu efeito inibitório geral³⁸. No estudo realizado por Niedermühlbichler e Wiedermann³⁹, os peptídeos relacionados à somatostatina tiveram um papel regulador no metabolismo dos radicais de oxigênio. Acreditamos que o OCT possa ser uma opção de tratamento na SN com seus efeitos anti-inflamatórios, antifibróticos, antioxidantes e inibitórios gerais. Em nosso estudo, o nível de CAT no tecido renal foi significativamente menor no grupo SN em comparação com o grupo controle e aumentou significativamente no grupo de tratamento em comparação com o grupo SN. Em outras palavras, a capacidade antioxidante do grupo SN diminuiu em comparação com o grupo controle e, após a aplicação do OCT, a capacidade antioxidante aumentou e atingiu o nível do grupo controle. As avaliações histopatológicas também corroboraram esses dados. O escore de esclerose glomerular aumentou no grupo SN em comparação com o grupo controle e diminuiu no grupo de tratamento da SN em comparação com o grupo SN, indicando que o tratamento com OCT melhorou tanto a capacidade antioxidante deteriorada quanto os parâmetros histopatológicos no tecido renal.

A proteinúria danifica o glomérulo e o tubulointerstício. O estresse oxidativo tem um papel importante na fibrose tubulointersticial pela ativação de miofibroblastos e na glomeruloesclerose pela esclerose mesangial, anormalidade de podócitos e lesão de células epiteliais parietais²⁷. O dano tubulointersticial é comum em doenças glomerulares e está correlacionado ao grau de proteinúria e à função renal⁴⁰. A nefropatia induzida por adriamicina causa lesão podocitária seguida de glomeruloesclerose, inflamação tubulointersticial e fibrose⁷. Não foi observada nenhuma diferença nas estruturas tubulointersticiais em todos os três grupos e isso pode estar relacionado à duração do nosso estudo. Na literatura, as alterações tubulointersticiais foram geralmente observadas nas semanas 4 a 6⁷. A duração de 3 semanas do nosso estudo pode não ter sido suficiente para danificar os túbulos.

Os resultados deste estudo sugerem que os mecanismos comprometidos de proteção antioxidante, em vez do aumento da produção de EROs no rim, desempenham um papel na etiopatogenia da SN. O OCT pode ser uma opção de tratamento ao melhorar a capacidade antioxidante e as estruturas histopatológicas nos rins.

CONCLUSÃO

O estresse oxidativo desempenha um papel na patogênese da SN. Nossos achados foram consistentes com diversos estudos na literatura. O estresse oxidativo na SN pode ser devido ao comprometimento do mecanismo de proteção antioxidante no rim. O efeito antioxidante e antifibrótico do octreotida, demonstrado em diversos estudos na literatura, também foi corroborado por nosso estudo. Mostramos pela primeira vez que o OCT pode melhorar a capacidade antioxidante reduzida e a esclerose glomerular no tecido renal.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Não se sabe se o OCT tem um efeito na sobrevida. Por essa razão, um estudo mais longo deve ser planejado no futuro. Se os produtos de oxidação de proteínas e EROs, como o H₂O₂ tivessem sido medidos juntamente com o MDA, a mudança nos radicais livres na SN poderia ter sido mais clara. Não foram avaliados os efeitos do OCT nos parâmetros antioxidantes, como vitamina E, vitamina C, glutatona, glutatona peroxidase e superóxido dismutase, o que poderia demonstrar de forma mais ampla a capacidade antioxidante total. Além disso, não houve um grupo

de OCT para examinar o efeito da OCT isoladamente. Ao planejar estudos futuros, essas deficiências devem ser consideradas para que estudos expandidos e aprimorados possam ser realizados.

AGRADECIMENTO

Este estudo foi apoiado pelo Fundo de Pesquisa e Apoio a Projetos da *Ege University* (Projeto No: 2011-TIP-060).

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

SC, AGA, AC, EH, EYS, SS, MO, YDA, ED, SG, FA e SD fizeram contribuições substanciais para a concepção ou desenho do trabalho; para a coleta, análise e interpretação dos dados; na redação do artigo ou em sua revisão crítica e na aprovação final da versão a ser publicada.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Politano SA, Colbert GB, Hamiduzzaman N. Nephrotic syndrome. Primary care. 2020;47(4):597–613. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pop.2020.08.002>. PubMed PMID: 33121631.
2. Wang CS, Greenbaum LA. Nephrotic syndrome. *Pediatr Clin North Am.* 2019;66(1):73–85. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2018.08.006>. PubMed PMID: 30454752.
3. Duni A, Liakopoulos V, Roumeliotis S, Peschos D, Dounousi E. Oxidative stress in the pathogenesis and evolution of chronic kidney disease: untangling Ariadne's Thread. *Int J Mol Sci.* 2019;20(15):3711. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20153711>. PubMed PMID: 31362427.
4. Chen CA, Chang JM, Chen HC, Chang EE. Generation of endoplasmic reticulum stress-dependent reactive oxygen species mediates TGF-β1-induced podocyte migration. *J Biochem.* 2022;171(3):305–14. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvab128>. PubMed PMID: 34993544.
5. Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-About FC, Durvasula RV, Hauser PV, Kowalewska J, et al. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(2):F213–29. doi: <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.90421.2008>. PubMed PMID: 18784259.
6. Johnson-Arbor K, Dubey R. Doxorubicin. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. PMID: 29083582 Bookshelf ID: NBK459232
7. Lee VW, Harris DC. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton).* 2011;16(1):30–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1797.2010.01383.x>. PubMed PMID: 21175974.
8. Handa T, Mori KP, Ishii A, Ohno S, Kanai Y, Watanabe-Takano H, et al. Osteocrin ameliorates adriamycin nephropathy via p38 mitogen-activated protein kinase inhibition. *Sci Rep.* 2021;11(1):21835. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-01095-8>. PubMed PMID: 34750411.
9. Huang G, Zhu Y, Yong C, Tian F, Liu L, Wu Q, et al. Artemisia capillaris Thunb. water extract attenuates adriamycin-induced renal injury by regulating apoptosis through the ROS/MAPK

- axis. *J Food Biochem.* 2022;46(2):e14065. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.14065>. PubMed PMID: 34984698.
10. Tan J, Wang J, Geng L, Yue Y, Wu N, Zhang Q. Comparative study of fucoidan from *saccharina japonica* and its depolymerized fragment on adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. *Mar Drugs.* 2020;18(3):137. <http://dx.doi.org/10.3390/md18030137>. PubMed PMID: 32120786.
 11. Yesair DW, Schwartzbach E, Shuck D, Denine EP, Asbell MA. Comparative pharmacokinetics of daunomycin and adriamycin in several animal species. *Cancer Res.* 1972;32(6):1177–83. PubMed PMID: 5030818.
 12. Sun YB, Qu X, Zhang X, Caruana G, Bertram JF, Li J. Glomerular endothelial cell injury and damage precedes that of podocytes in adriamycin-induced nephropathy. *PLoS One.* 2013;8(1):e55027. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0055027>. PubMed PMID: 23359116.
 13. Okasora T, Takikawa T, Utsunomiya Y, Senoh I, Hayashibara H, Shiraki K, et al. Suppressive effect of superoxide dismutase on adriamycin nephropathy. *Nephron J.* 1992;60(2):199–203. doi: <http://dx.doi.org/10.1159/000186739>. PubMed PMID: 1553005.
 14. Lennicke C, Cochemé HM. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Mol Cell.* 2021;81(18):3691–707. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.018>. PubMed PMID: 34547234.
 15. Xu N, Jiang S, Persson PB, Persson EAG, Lai EY, Patzak A. Reactive oxygen species in renal vascular function. *Acta Physiol (Oxf).* 2020;229(4):e13477. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/apha.13477>. PubMed PMID: 32311827.
 16. Huang MZ, Li JY. Physiological regulation of reactive oxygen species in organisms based on their physicochemical properties. *Acta Physiol (Oxf).* 2020;228(1):e13351. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/apha.13351>. PubMed PMID: 31344326.
 17. Chavda V, Lu B, Chaurasia B, Garg K, Deora H, Umana GE, et al. Molecular mechanisms of oxidative stress in stroke and cancer. *Brain Disorders.* 2021;5:100029. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dscb.2021.100029>.
 18. Casnici C, Lattuada D, Crotta K, Truzzi MC, Corradini C, Ingegnoli F, et al. Anti-inflammatory effect of somatostatin analogue octreotide on rheumatoid arthritis synoviocytes. *Inflammation.* 2018;41(5):1648–60. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-018-0808-5>. PubMed PMID: 29804189.
 19. Duque-Díaz E, Martínez-Rangel D, Ruiz-Roa SJIC. Neuropeptides in the human brainstem. *Invest Clin.* 2018;59(2):161–78. doi: <http://dx.doi.org/10.22209/IC.v59n2a06>.
 20. Mas E, Borrelli O, Broekaert I, de-Carpi JM, Dolinsek J, Miele E, et al. Drugs in focus: octreotide use in children with gastrointestinal disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2022;74(1):1–6. doi: <http://dx.doi.org/10.1097/MPG.0000000000003294>. PubMed PMID: 34508049.
 21. Gao Y, Hou L, Wang Y, Guo S, Yuan D, Jiang Y, et al. Octreotide alleviates pancreatic damage caused by paraquat in rats by reducing inflammatory responses and oxidative stress. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2020;80:103456. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2020.103456>. PubMed PMID: 32673753.
 22. Dai GF, Wang Z, Zhang JY. Octreotide protects doxorubicin-induced cardiac toxicity via regulating oxidative stress. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(18):6139–48. PubMed PMID: 30280802.
 23. Mas-Bargues C, Escrivá C, Dromant M, Borrás C, Viña J. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Arch Biochem Biophys.* 2021;709:108941. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2021.108941>. PubMed PMID: 34097903.
 24. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem.* 2017;398(10):1095–108. doi: <http://dx.doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>. PubMed PMID: 28384098.
 25. Kojima K, Matsui K, Nagase M. Protection of $\alpha 3$ integrin-mediated podocyte shape by superoxide dismutase in the puromycin aminonucleoside nephrosis rat. *Am J Kidney Dis.* 2000;35(6):1175–85. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386\(00\)70056-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0272-6386(00)70056-4). PubMed PMID: 10845833.
 26. Liu D, Lv LL. New understanding on the role of proteinuria in progression of chronic kidney disease. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1165:487–500. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2_24. PubMed PMID: 31399981.
 27. Su H, Wan C, Song A, Qiu Y, Xiong W, Zhang C. Oxidative stress and renal fibrosis: mechanisms and therapies. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1165:585–604. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2_29. PubMed PMID: 31399986.
 28. Zhou L, Chen X, Lu M, Wu Q, Yuan Q, Hu C, et al. Wnt/ β -catenin links oxidative stress to podocyte injury and proteinuria. *Kidney Int.* 2019;95(4):830–45. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2018.10.032>. PubMed PMID: 30770219.
 29. Bertelli R, Trivelli A, Magnasco A, Cioni M, Bodria M, Carrea A, et al. Failure of regulation results in an amplified oxidation burst by neutrophils in children with primary nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2010;161(1):151–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04160.x>. PubMed PMID: 20491793.
 30. Baud L, Fouqueray B, Philippe C, Ardaillou R. Reactive oxygen species as glomerular autacoids. *J Am Soc Nephrol.* 1992;2(10, Suppl):S132–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.V210s132>. PubMed PMID: 1600128.
 31. Demirkan H. Ailevi akdeniz ateşli hastalarda nötrofil fonksiyonlarının göstergesi olarak nötrofillerde kalsiyum sinyali ve oksidatif stres üzerinde kolşisinin etkisinin araştırılması [thesis]. ISPARTA: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2010.
 32. Kamireddy R, Kavuri S, Devi S, Vemula H, Chandana D, Harinarayanan S, et al. Oxidative stress in pediatric nephrotic syndrome. *Clin Chim Acta.* 2002;325(1-2):147–50. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981\(02\)00294-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00294-2). PubMed PMID: 12367779.
 33. Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2019;34(6):975–91. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-018-4005-4>. PubMed PMID: 30105414.
 34. Gil HW, Seok SJ, Jeong DS, Yang JO, Lee EY, Hong SY. Plasma level of malondialdehyde in the cases of acute paraquat intoxication. *Clin Toxicol (Phila).* 2010;48(2):149–52. doi: <http://dx.doi.org/10.3109/15563650903468803>. PubMed PMID: 20050821.
 35. Aguilar Diaz De Leon J, Borges CR. Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. *J Vis Exp.* 2020(159): e61122, doi:10.3791/61122 (2020). PMID: 32478759
 36. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* 2018;13:757–72. doi: <http://dx.doi.org/10.2147/CIA.S158513>. PubMed PMID: 29731617.
 37. Kalyoncu S, Yilmaz B, Demir M, Tuncer M, Bozdog Z, Ince O, et al. Octreotide and lanreotide decrease ovarian ischemia-reperfusion injury in rats by improving oxidative and nitrosative stress. *J Obstet Gynaecol Res.* 2020;46(10):2050–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/jog.14379>. PubMed PMID: 32748523.
 38. Seydanoğlu A, Gül M, Erdem S, Cander B, Ayan M, Toy H, et al. Dose-dependent effects of octreotide on oxidant-antioxidant status and lung histopathology during experimental sepsis. *Selcuk Medical Journal.* 2018;26(3):90–4.
 39. Niedermühlbichler M, Wiedermann CJ. Suppression of superoxide release from human monocytes by somatostatin-related peptides. *Regul Pept.* 1992;41(1):39–47. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0167-0115\(92\)90512-S](http://dx.doi.org/10.1016/0167-0115(92)90512-S). PubMed PMID: 1360687.
 40. Zoja C, Abbate M, Remuzzi G. Progression of renal injury toward interstitial inflammation and glomerular sclerosis is dependent on abnormal protein filtration. *Nephrol Dial Transplant.* 2015;30(5):706–12. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfu261>. PubMed PMID: 25087196.