

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Avaliação dos efeitos do tratamento com quercetina e melatonina em
modelo animal de nefrite lúpica induzido por pristano**

MARIANE DOS SANTOS

Porto Alegre
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**Avaliação dos efeitos do tratamento com quercetina e melatonina em modelo
animal de nefrite lúpica induzido por pristano**

MARIANE DOS SANTOS

Orientador: Prof. Doutor Francisco José Veronese.

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Medicina: Ciências Médicas,
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas.

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos, Mariane

Avaliação dos efeitos do tratamento com quercetina e melatonina em modelo animal de nefrite lúpica induzido por pristano / Mariane dos Santos. -- 2018. 188 f.

Orientador: Francisco José Veríssimo Veronese.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Lupus Eritematoso Sistêmico. 2. Nefrite Lúpica. 3. Quercetina. 4. Melatonina. 5. Podócitos. I. Veríssimo Veronese, Francisco José, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais Otilismar e Dalila Ione pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida, a eles minha admiração e orgulho pela persistência e generosidade.

Ao meu orientador Francisco Veronese por aceitar me orientar nesse projeto e por ter sido um orientador incansável na busca de recursos, na realização dos objetivos do projeto e em todo o suporte nesse período.

Aos colegas de laboratório de Biologia Molecular aplicada à Nefrologia (LABMAN), à minha amiga e aluna de iniciação científica Priscila Poletti pela ajuda incansável e, principalmente, às amigas Patrícia Milhoransa e Carolina Montanari pelo apoio e amizade nesse período.

À professora Dra Rezzani e sua equipe pela orientação durante o período de estágio de Doutorado Sanduíche.

À CAPES e ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE/CAPES) pelo apoio e incentivos financeiros e pelo estágio no exterior que ajudaram na execução desse projeto e que são fundamentais para a Ciência Brasileira e desenvolvimento de novos pesquisadores.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA (FIPE) pelo financiamento disponibilizado ao projeto e pelo uso da estrutura e tecnologias disponíveis na instituição.

Ao PPG Ciências Médicas e a secretária Vera Ribeiro pela assistência e orientação nas burocracias da pós-graduação. A todas as pessoas que não tiveram seus nomes citados mas que tiveram importância ímpar nesse período, o meu muito obrigada.

RESUMO

Introdução: A nefrite lúpica (NL) é uma manifestação grave do lúpus eritematoso sistêmico (LES), que pode levar à perda de função renal e necessidade de terapia renal substitutiva. O modelo animal de NL induzido por pristano reproduz a doença humana, em que se detectam autoanticorpos causando glomerulonefrite com padrão proliferativo e inflamatório, e a presença de estresse oxidativo exacerbado e de aumento da produção de marcadores pró-fibróticos. A quercetina e a melatonina são substâncias naturais que podem ser potenciais alternativas para o tratamento da NL, devido ao seu efeito anti-inflamatório, antioxidante e anti-fibrótico.

Objetivos: Avaliar o efeito protetor da quercetina e da melatonina em camundongos induzidos por pristano sobre a proteinúria, marcadores de inflamação, de estresse oxidativo, de apoptose e de fibrose sobre a injúria estrutural e molecular das células epiteliais podocitárias do glomérulo renal.

Métodos: Camundongos BALB/c (fêmeas) com 60 dias de vida foram alojados em sala com temperatura controlada (25°C), na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o "Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório". O modelo animal de NL foi induzido por uma única injeção intraperitoneal de pristano (PT). O tratamento com melatonina iniciou um dia após a indução e com a quercetina após 30 dias da indução (PT-M e PT-Q, respectivamente). Após 180 dias da indução, os animais foram eutanasiados e os rins removidos. A análise morfológica para evidenciar lesão renal compatível com NL foi realizada com hematoxilina-eosina e ácido periódico-Schiff. Foi atribuído um escore de inflamação glomerular e tubular, descrito em porcentagem (%). Imunofluorescência e ensaios bioquímicos foram utilizados para avaliar a expressão de marcadores de inflamação (IL-6; fator de necrose tumoral- α , TNF- α), de estresse

oxidativo (CAT e SOD1 antioxidantes e TBARS pró-oxidante), de apoptose (Bax) e de fibrose (TGF- β_1 e colágenos I e III). A ultraestrutura glomerular e tubular foi avaliada por microscopia eletrônica (ME), e a expressão tecidual do RNA mensageiro (RNAm) de podocina, podoplanina e $\alpha_3\beta_1$ -integrina foram quantificados pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real para os camundongos tratados com quercetina.

Resultados: Os camundongos induzidos com pristano desenvolveram lesões compatíveis com NL, apresentando infiltrado inflamatório, proliferação de células endocapilares, extracapilares e mesangiais, achatamento dos pedicelos dos podócitos, descolamento da borda em escova das células tubulares e mitocôndrias anormais com ruptura de cristas. Em relação aos camundongos controle (C), o grupo PT mostrou aumento da proteinúria no sexto mês (PT: $57,0 \pm 17,2$ vs. C: $6,6 \pm 2,4$ mg/dL; $p=0,012$), maior escore de inflamação (%): $7,42(5,31-8,43)$ vs. $0,51(0,35-2,42)$; $p<0,001$, e expressão aumentada de marcadores pró-fibróticos ($p=0,009$), de apoptose ($p=0,009$) e pró-oxidantes ($p=0,001$), assim como redução de antioxidantes ($p=0,001$). Na ultraestrutura, foram observados achatamento dos pedicelos dos podócitos, células mesangiais apoptóticas e mitocôndrias anormais com ruptura de cristas, juntamente com supressão dos RNAm de podocina ($p<0,001$), podoplanina ($p=0,009$) e $\alpha_3\beta_1$ -integrina ($p=0,005$). O tratamento com quercetina induziu nefroproteção no grupo PT-Q quando comparado ao PT, em que foi observado redução significativa na proteinúria ($3,4 \pm 2,0$ mg/dL, $p<0,001$), no escore de inflamação [$4,23(2,12-6,94)$, $p=0,041$], na expressão de IL-6 ($p=0,016$), TNF- α ($p=0,007$), TGF- β_1 ($p=0,003$) e Bax ($p=0,006$). A quercetina também aumentou significativamente a expressão de CAT ($p=0,001$) e SOD1 ($p=0,003$). Adicionalmente, observou-se recuperação parcial da ultraestrutura renal na ME, e maior expressão do RNAm de podocina ($p<0,001$) (mas não de podoplanina e de $\alpha_3\beta_1$ -integrina), em relação aos níveis encontrados no grupo C. Nos grupos da melatonina, o grupo PT apresentou escore de

inflamação maior em relação aos camundongos controle (C) (3,49% vs. controle 0,83%; $p < 0,05$), índice de deposição de colágeno total (2,50% vs. 0,20%; $p < 0,05$), redução da expressão das enzimas antioxidantes (SOD1: $p = 0,003$; CAT: $p = 0,012$) e aumento na expressão de IL-6, de Bax e de TGF- β_1 ($p < 0,05$ para todos). Comparado aos camundongos induzidos com pristano, o grupo tratado com melatonina apresentou redução no escore de inflamação (3,49% vs. 1,2%; $p < 0,05$), no índice de fibrose intersticial (2,50% vs. 0,36%; $p = 0,018$), aumento da expressão de enzimas antioxidantes (SOD1: $p = 0,008$; CAT: $p = 0,001$) e redução na expressão de IL-6, de Bax e de TGF- β_1 ($p < 0,05$ para todos). Um menor grau de achatamento dos pedicelos dos podócitos, do espessamento da membrana basal e menor lesão mitocondrial foram observados na ME no grupo tratado com melatonina.

Conclusão: Esses resultados fornecem evidências de que a quercetina e a melatonina restauram parcialmente as alterações estruturais da NL no modelo de camundongos induzido por pristano, modulando a inflamação, o estresse oxidativo, a apoptose e os marcadores pró-fibróticos, assim como a expressão do RNAm das proteínas do podócito e sua ultraestrutura. Com base nesses achados, consideramos que essas substâncias naturais podem ser uma estratégia terapêutica alternativa para minimizar a lesão renal da NL.

Palavras-chave: Pristano, modelo animal, antioxidantes, melatonina, quercetina e podócitos.

ABSTRACT

Introduction: Lupus nephritis (LN) is a severe manifestation of systemic lupus erythematosus (SLE), which can lead to loss of renal function and need for renal replacement therapy. The animal model of LN induced by pristane reproduces human disease, in which autoantibodies are detected causing proliferative and inflammatory glomerulonephritis, and the presence of exacerbated oxidative stress and pro-fibrotic markers. Quercetin and melatonin are natural substances that may be potential alternatives for the treatment of LN due to its anti-inflammatory, antioxidant and anti-fibrotic effects.

Objectives: To evaluate the protective effect of quercetin and melatonin in pristane-induced LN mice on proteinuria, markers of inflammation, oxidative stress, apoptosis and fibrosis, and on the structural and molecular injury of podocyte epithelial cells of the renal glomerulus.

Methods: BALB/c mice (females) with 60 days of life, housed in a room with controlled temperature (25°C), at the Animal Facility (UEA) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). All the procedures were conducted in accordance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". The animal model of LN was induced by a single intraperitoneal injection of pristane (PT). Treatment with melatonin started one day after induction and with quercetin after 30 days of induction (PT-M and PT-Q, respectively). After 180 days of induction, animals were euthanized and the kidneys removed. Morphological analysis to demonstrate LN-compatible renal lesion was performed with hematoxylin-eosin and periodic acid-Schiff. A glomerular and tubular inflammation score was reported as percentage (%). Immunofluorescence and biochemical assays were used to evaluate the expression of inflammation markers (IL-6,

tumor necrosis factor- α , TNF- α), oxidative stress (CAT and SOD1 antioxidants and pro-oxidant TBARS), apoptosis and fibrosis (TGF- β 1 and collagens I and III). The glomerular and tubular ultrastructure was evaluated by electron microscopy (EM), and the tissue expression of podocin messenger RNA (mRNA), podoplanin and α 3 β 1-integrin were quantified by quantitative real-time polymerase chain reaction for the quercetin-treated mice.

Results: Pristane-induced mice developed compatible lesions with LN, presenting inflammatory infiltrate, proliferation of endocapillary, extracapillary and mesangial cells, podocyte foot process effacement, brush border detachment of tubular cells and abnormal mitochondria with ruptured cristae. In relation to the control mice (C), the PT group showed increased proteinuria in the sixth month (PT: 57.0 ± 17.2 vs. C: 6.6 ± 2.4 mg/dL, $p=0.012$), higher degree of inflammation (%): 7.42 (5.31-8.43) vs. 0.51 (0.35-2.42); ($p=0.001$), and pro-oxidant ($p=0.001$), as well as antioxidant reduction ($p=0.001$), and increased expression of pro-fibrotic ($p=0.009$), apoptosis ($p=0.009$) and pro-oxidant markers. In the ultrastructure, podocyte pedicels, apoptotic mesangial cells and abnormal mitochondria with ridges rupture were observed, together with suppression of podocin mRNA ($p<0.001$), podoplanin ($p=0.009$) and α 3 β 1-integrin ($p=0.005$). Treatment with quercetin induced nephroprotection in the PT-Q group when compared to PT, where a significant reduction in proteinuria (3.4 ± 2.0 mg/dL, $p<0.001$) was observed in the inflammation score [4.23 (2.12-6.94), $p=0.041$], on the expression of IL-6 ($p=0.016$), TNF- α ($p=0.007$), TGF- β 1 ($p=0.003$) and Bax ($p=0.006$). Simultaneously, quercetin significantly increased CAT expression ($p=0.001$) and SOD1 ($p=0.003$). In addition, there was a partial recovery of the renal ultrastructure in the EM, and a higher expression of podocin mRNA ($p<0.001$) (but not of podoplanin and α 3 β 1-integrin), in relation to the levels found in C group. In melatonin groups, the PT group presented higher inflammation

score regarding to the C group (3.49% vs. control 0.83%, $p < 0.05$), in the total collagen deposition rate (2.50% vs. 0.20%, $p < 0.05$), reduction of the expression of the antioxidant enzymes (SOD1: $p = 0.003$, CAT: $p = 0.012$) and increased expression of IL-6, Bax and TGF- β 1 ($p < 0.05$ for all). Compared to the pristane-induced mice, the melatonin group presented a reduction in the inflammation score (3.49% vs. 1.2%, $p < 0.05$), in the interstitial fibrosis index (vs. 0.36%, $p = 0.018$), increased expression of antioxidant enzymes (SOD1: $p = 0.008$, CAT: $p = 0.001$) and decreased expression of IL-6, Bax, and TGF- β 1 ($p < 0.05$ for all). A lower degree of podocyte foot process effacement, thickening of the basement membrane and abnormal mitochondria were observed in the EM.

Conclusion: These results provide evidence that quercetin and melatonin partially restore the structural changes of LN in the pristane-induced mouse model, modulating inflammation, oxidative stress, apoptosis and pro fibrotic markers, as well as expression of mRNA from podocyte proteins and its ultrastructure. Based on these findings, we consider that these natural substances may be an alternative therapeutic strategy to minimize renal injury in LN.

Key words: Pristane, animal model, antioxidants, melatonin, quercetin and podocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da quercetina.....	47
Figura 2. Estrutura química da melatonina.....	56
Figura 3. Mapa conceitual do estudo.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas	21
Tabela 2. Classificação da NL pela ISN/RPS.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

AANAT - Aril-alquilamina N-acetiltransferase

ACR – Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology*)

ANAs - Anticorpos antinucleares

aPL - Antifosfolipídicos

ASMT - N-acetilserotonina-O-metiltransferase

AZA - Azatioprina

CAT - Catalase

CCF - Ciclofosfamida

CMLV - Células da musculatura lisa vascular

CCR1- Receptores de quimiocinas

DAC - Doença arterial coronária

DMPO - 5,5 dimetil-1-pirrolina-N-óxido

DRC - Doença renal crônica

EUA - Estados Unidos da América

ERK - quinase regulada pela sinalização extracelular (*Extracellular signal regulated kinase*)

Fator BlyS - fator estimulador de linfócitos B (*B Lymphocyte Stimulator*)

GLADEL - *Grupo Latino Americano de Estudio del Lupus*

GSH - Glutathiona

GSQ - 6-glutathiona-quercetina

HDL - Lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein*)

HIOMT - Hidroxiindole-O-metil transferase

HSV - Herpes simples vírus

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

IF - Imunofluorescência

IFN – Interferon

IKK – Complexo IκB quinase

IL - Interleucina

ISN/RPS – Sociedade Internacional de Nefrologia e Patologia Renal (*International Society of Nephrology/Renal Pathology Society*)

JNK - Proteína quinase c-Jun-NH2- terminal (*Jun NH2-terminal kinase*)

LDL - Lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein*)

LPS - Lipopolissacarídeo

lpr – Linfoproliferação (*lymphoproliferation*)

LES - Lúpus eritematoso sistêmico

MBG - Membrana basal glomerular

ME - Microscopia eletrônica

MMP - Metaloproteinase de matriz

MO - Microscopia óptica

MMF - Micofenolato mofetil

MAPK - Proteína-quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen-activate protein kinase*)

MIP-1α - Proteína inflamatória de macrófagos (*Macrophage Inflammatory Proteins-1α*)

MT - Receptores melatonérgicos

mTOR - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*Mammalian Target of Rapamycin*)

NF-κB - Fator nuclear kappa B

NAC - N-acetilcisteína

NAT - N-acetil transferase

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF-κB - factor nuclear kappa B

NO - Óxido nítrico

NO₃⁻ - Peroxinitrito

NL - Nefrite lúpica

NZB - *New Zealand Black*

NZW - *New Zealand White*

O²⁻ - Radical ânion superóxido

O² - Oxigênio singlete

PDTC - Pirrolidina ditiocarbamato

PT - Pristano

ROI - Reativos intermediários de oxigênio (*reactive oxygen intermediates*)

ROR - Receptores órfãos retinóides

ROS - Espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

RZR - Receptores Z retinóides

SLICC - *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*

snRNP - Pequenas proteínas nucleares de ribonucleoproteína nuclear (*small nuclear ribonucleo proteins*)

SOD - Superóxido dismutase

TLR - Receptores Toll Like (*Toll like receptors*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*)

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta (*transforming growth factor beta*)

UK - Reino Unido (*United Kingdom*)

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*)

Yaa - Acelerador autoimune ligado ao y (*Y-chromosome-linked autoimmune accelerator*)

SUMÁRIO

1. Introdução	18
2. Revisão da Literatura	20
2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações	20
2.2. Lúpus Eritematoso Sistêmico	22
2.2.1. Epidemiologia.....	23
2.2.2. Classificação e diagnóstico.....	24
2.2.3. Patogênese do LES	25
2.2.4. Papel dos autoanticorpos na patogênese do LES.....	28
2.2.5. Envolvimento de múltiplos órgãos	29
2.3. Nefrite Lúpica (NL)	32
2.3.1. Epidemiologia da NL.....	33
2.3.2. Classificação e diagnóstico.....	34
2.3.3. Patogênese da NL	36
2.3.4. Os podócitos e a injúria podocitária na NL	37
2.3.4. Tratamento da nefrite lúpica.....	38
2.3.5. Nefrite lúpica e estresse oxidativo.....	41
2.3.6. Nefrite lúpica e tratamento antioxidante	42
2.4. Modelos animais de LES	44
2.4.1. Modelos espontâneos de camundongos.....	45
2.4.2. Modelos induzidos de camundongos.....	46
2.6. Uso de substâncias naturais no modelo induzido por pristano.....	47
2.6.1. Quercetina.....	47
2.6.1.1. Biossíntese	48
2.6.1.2. Catabolismo	49
2.6.1.3. Receptores e mecanismos de ação.....	50
2.6.1.4. Quercetina e estresse oxidativo	51
2.6.1.5. Principais funções da quercetina	52
2.6.1.6. Quercetina e outras funções.....	54
2.6.2.1. Biossíntese	57
2.6.2.2. Catabolismo	58
2.6.2.3. Receptores e mecanismos de ação.....	59
2.6.2.4. Melatonina e estresse oxidativo.....	60

2.6.2.5. Principais funções da melatonina	61
2.6.2.6. Melatonina e outras funções	65
3. Marco Conceitual	67
4. Justificativa	69
5. Objetivos.....	70
5.1. Objetivo Geral	70
5.2. Objetivos Específicos	70
6. Referências	71
7. Artigos publicados	91
7.1. Artigo 1.....	92
7.3. Artigo 3.....	150
8. Considerações finais	184
9. Perspectivas.....	185
10. Anexo	186

1. Introdução

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença multifatorial que afeta múltiplos órgãos e predominantemente mulheres, com patogênese não completamente conhecida. É caracterizada pela perda de tolerância imunológica a autoantígenos nucleares, ativação policlonal de linfócitos B e T, apoptose e *clearance* deficientes de nucleossomos, resultando na produção de autoanticorpos patogênicos e formação de imunocomplexos [1,2]. O depósito e acúmulo de imunocomplexos nos tecidos induz a ativação de complemento, de citocinas pró inflamatórias e dos receptores *toll like*, entre outros mecanismos, produzindo dano tecidual progressivo [3,4].

Uma das manifestações mais severas do LES é a nefrite lúpica (NL), afetando cerca da metade desses pacientes [5]. Clinicamente, a NL é caracterizada por proteinúria, hematúria, cilindros celulares e perda da função renal, podendo evoluir para doença renal crônica (DRC) terminal com a necessidade de terapia renal substitutiva [6]. Além dos mecanismos citados acima, a NL também tem associação na sua patogênese ao desequilíbrio entre mecanismos pró-oxidantes e antioxidantes. Poucos estudos investigaram o uso de antioxidantes no tratamento da NL, na sua maioria estudos experimentais, mostrando resultados satisfatórios [7–9].

Pacientes com LES possuem alto grau de heterogeneidade clínica, em que a doença se manifesta afetando diferentes órgãos, com maior ou menor gravidade, sendo a NL uma de suas manifestações mais graves. Desta forma, modelos animais em estudos pré-clínicos têm sido valiosos para investigar a fisiopatologia do LES e da NL na amplitude de seus múltiplos mecanismos [10,11]. Esses modelos podem ser espontâneos ou induzidos, reproduzindo as alterações imunológicas, clínicas e laboratoriais do LES em humanos.

Os modelos animais também são de extrema importância para identificar e validar novos alvos terapêuticos para o controle da doença. O objetivo da terapia no LES é controlar a atividade da doença e modificar sua evolução e prognóstico, porém até o momento o tratamento convencional permanece insatisfatório, devido a heterogeneidade biológica entre os pacientes e a falta de terapias mais específicas e seguras. Novas terapias podem ser uma alternativa promissora para o tratamento das manifestações do LES, como a terapia nutricional, a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes, reduzir comorbidades e efeitos colaterais causados pela terapia farmacológica. Também é notável o papel promissor dos antioxidantes.

A quercetina é um flavonóide com diversas propriedades que conferem proteção, exercendo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anti-fibróticos, comprovadamente benéficos. Esses efeitos se refletem na proteção contra várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares, osteoporose e câncer (ex., de pulmão) [12].

A melatonina é uma neuroindolamina comumente usada para corrigir distúrbios do sono, também existem evidências de suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-fibróticas e de modulação de apoptose [13–16]. No entanto, apesar da ausência de efeitos colaterais aparentes, o uso de melatonina no tratamento de outras patologias ainda permanece em investigação, especificamente de seus benefícios atribuídos a doses farmacológicas.

Dentro do contexto de que a etiopatogênese da NL ainda não é completamente compreendida e na busca de melhores resultados no seu tratamento com minimização dos efeitos colaterais. Investigar os efeitos de substâncias naturais sobre os mecanismos fisiopatológicos e na terapêutica dessa doença são alternativas que necessitam ser exploradas em modelos experimentais, abrindo assim novas possibilidades de tratamento de pacientes lúpicos portadores de NL.

2. Revisão da Literatura

2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura está focada no lúpus eritematoso sistêmico e sua manifestação renal, a nefrite lúpica. Além do estudo da patogênese dessas doenças, a pesquisa em modelo animal induzido por pristano e as possíveis novas terapias utilizando substâncias com potencial antioxidante e anti-inflamatório, também foram pesquisadas as substâncias quercetina e melatonina como terapias potenciais no tratamento de nefropatias.

A estratégia de busca envolveu bases de dados como: SciELO, LILACS e MEDLINE (site PubMed). Utilizaram-se as palavras-chave: “*systemic lupus erythematosus*”, “*systemic lupus erythematosus and lupus nephritis*”, “*animal model and lupus*”, “*animal model*” and “*pristane*”, “*pristane and lupus nephritis*”, “*podocytes and lupus nephritis*”, “*spontaneous*” and “*induced lupus animal model*”, “*antioxidant*” and “*lupus nephritis*”, “*lupus nephritis and quercetin*”, “*renal disease*” and “*quercetin*”, “*lupus nephritis and melatonin*”, “*renal disease*” and “*melatonin*”, “*pristane*” and “*melatonin*”, “*lupus nephritis*” and “*oxidative stress*” “*quercetin*” and “*fibrosis*”, “*quercetin*” and “*apoptosis*” “*melatonin*” and “*fibrosis*”, “*melatonin*” and “*apoptosis*” e termos relacionados.

A tabela 1 resume a estratégia de busca das referências bibliográficas relacionados às bases que fundamentam o objetivo do estudo até a data de 30 de Agosto de 2018.

Tabela 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas

Palavras-chave	Pubmed	SciELO	LILACS
“systemic lupus erythematosus”	63807	739	1950
“systemic lupus erythematosus” and “lupus nephritis”	4937	54	18
“animal model” and “lupus”	249	0	0
“animal model” and “pristane”	18	0	0
“pristane” and “lupus nephritis”	45	0	0
“podocytes” and “lupus nephritis”	129	1	2
“spontaneous” and “induced lupus animal model”	109	0	0
“antioxidant” and “lupus nephritis”	48	0	0
“lupus nephritis” and “quercetin”	0	0	0
“renal disease” and “quercetin”	8	0	0
“pristane” and “quercetin”	0	0	0
“lupus nephritis” and “melatonin”	1	0	0
“renal disease” and “melatonin”	17	0	0
“pristane” and “melatonin”	1	0	0
“lupus nephritis” and “oxidative stress”	34	0	0
“quercetin” and “fibrosis”	117	2	2
“quercetin” and “apoptosis”	1362	8	8
“melatonin” and “fibrosis”	134	1	1
“melatonin” and “apoptosis”	1064	8	6

2.2. Lúpus Eritematoso Sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença de etiologia multifatorial que afeta predominantemente mulheres, e a sua patogênese não é completamente conhecida [1]. Essa doença apresenta diversas manifestações clínicas afetando rins, cérebro, coração, articulações e pele, os quais estão diretamente relacionados às alterações no sistema imune. Além disso, o LES está associado a fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e hormonais, sendo caracterizado pela perda da tolerância da resposta imune a autoantígenos nucleares, produção de autoanticorpos patogênicos direcionados contra um ou mais componentes celulares formando imunocomplexos, falha em remover linfócitos B e T autorreativos, entre outros mecanismos [2]. O LES também está fortemente relacionado a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, amplificando a autoimunidade e consequente lesão em órgãos alvo [4].

Uma das manifestações mais graves do LES é a nefrite lúpica (NL), que se manifesta por síndrome nefrítica e/ou nefrótica com proteinúria, hematúria, perda da função renal e hipertensão arterial sistêmica. O quadro clínico nem sempre se correlaciona com a classe histológica da NL identificada na biópsia renal, mas a histopatologia permanece como padrão ouro para determinar o grau de severidade e a cronicidade da doença. Além disso, o diagnóstico histológico é importante também para determinar a escolha do tratamento [5].

Pacientes com dano renal pelo LES têm maior risco de mortalidade, considerando que frequentemente têm manifestações extra-renais e imunodeficiência. A principal causa de mortalidade no LES e na NL é a infecção, enquanto que a morte tardia é causada por aterosclerose e complicações cardiovasculares [17].

2.2.1. Epidemiologia

A prevalência mundial de LES varia de 14,6 a 122 casos por 100 mil habitantes [2]. No Brasil, existe apenas um estudo que determina a incidência de 8,7 por 100.000 habitantes/ano em Natal, uma cidade no nordeste do Brasil, mostrando uma alta incidência de LES, aparentemente maior do que o relatado em outros centros internacionais [6]. A idade média no diagnóstico parece menor que a referida por outros estudos, e as diferenças observadas podem ser devidas a fatores étnicos e/ou ambientais. No entanto, outros estudos mostraram que a incidência de LES é maior em pacientes afro-americanos e afro-caribenhos em comparação aos caucasianos [18,19].

Evidências indicam que fatores étnicos podem estar relacionados ao início do LES, pois é mais prevalente em indivíduos afrodescendentes e de outras etnias não caucasianas quando comparado com indivíduos brancos nos Estados Unidos da América (EUA) e no Reino Unido (UK) [18,20,21]. Nos EUA, as populações de origem africana, hispânica ou asiática apresentam maior prevalência de manifestações do LES e envolvimento de órgãos vitais em comparação com outros grupos étnicos [22]. Além desses grupos, indivíduos hispânicos desenvolvem manifestações mais severas de LES e acumulam danos mais rapidamente em relação aos caucasianos. O aumento da reatividade dos autoanticorpos e o elevado risco genético pode explicar o fenótipo lúpico mais grave em indivíduos não brancos [23].

Além disso, em um estudo de coorte brasileira de 888 pacientes com LES [18], a média de idade observada no diagnóstico do LES foi de 29,9 anos e a duração média da doença desde o diagnóstico foi de 14,5 anos. Também houve uma maior prevalência da doença nas mulheres (91,9%), variando de 88,3 a 96,2% com uma taxa de 9:1 considerando mulheres e homens, respectivamente [22,24]. Esse predomínio em mulheres pode ser explicada por alterações hormonais, considerando o uso de estrogênio

em contraceptivos orais e as terapias de reposição hormonal, que podem desencadear doenças autoimunes e condições patológicas [25]. Além disso, este estudo não mostrou diferença de idade de início da doença entre homens e mulheres.

2.2.2. Classificação e diagnóstico

O diagnóstico de LES é feito em pacientes que desenvolvem uma combinação de manifestações clínicas e alterações sorológicas específicas. Durante os últimos quarenta anos, foram elaborados quatro diferentes critérios de classificação para melhorar o diagnóstico clínico em pacientes acometidos por lúpus [26].

Os primeiros critérios de LES foram desenvolvidos por Cohen et al. em 1971, e exigiam a presença de 4 de 14 itens para classificar as manifestações clinico-laboratoriais como LES. Entre esses critérios, haviam manifestações cutâneas (como por exemplo, a erupção cutânea malar), articulares (artralgia e artrite), lesão renal com hematuria, proteinúria ($\geq 3,5$ g/24 horas) além de cilindros celulares, distúrbios hematológicos e anormalidades do sistema imunológico [27].

Em 1982, o *American College of Rheumatology* (ACR) revisou essa classificação devido aos avanços progressivos na compreensão das vias patogênicas do LES. Consequentemente, definiu-se por classificar um paciente como tendo LES se apresentasse pelo menos 4 de 11 critérios, nos quais o critério de proteinúria modificou de 3,5 g/dia para 0,5 g/dia. Além disso, o ACR enfatizou a importância da disfunção autoimune e do papel dos autoanticorpos no LES, incluindo os anticorpos antinucleares (ANAs) [28].

Na revisão de 1997, a ACR adicionou os anticorpos anti-fosfolipídicos (aPL) em associação com LES como um dos critérios diagnósticos do LES, e excluiu a positividade

para células LE. Embora os critérios da ACR de 1997 não tenham sido validados, foram utilizados na prática clínica e na pesquisa do LES [29].

O *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) em 2012, dedicado à pesquisa do LES, revisou os critérios da ACR de 1997 [29]. Os critérios clínicos incluem: 1) Lupus cutâneo agudo; 2) Lúpus cutâneo crônico; 3) Úlceras orais; 4) Alopecia sem cicatrizes; 5) Sinovite envolvendo duas ou mais articulações; 6) Serosite; 7) Alterações renais (proteinúria igual ou maior a 500 mg em urina de 24 h ou pela relação proteinúria/creatininúria em amostra de urina, ou cilindros hemáticos); 8) Neurológicos (convulsões, psicose, mononeurite multiplex, mielite, neuropatia craniana ou periférica, estado confusional agudo); 9) Anemia hemolítica; 9) Leucopenia (< 4000 leucócitos/mm³ pelo menos uma vez, ou linfopenia com < 1000 /mm³ pelo menos uma vez); 10) Trombocitopenia (< 100.00 /mm³ pelo menos uma vez). Os critérios imunológicos são: 1) ANAs acima do valor de referência; 2) anti-dsDNA acima do valor de referência, exceto por ELISA quando o valor é duas vezes o valor de referência; 3) Anti-Sm; 4) Anticorpos anti-fosfolipídicos (anticoagulante lúpico ou RPR falso positivo, anticorpos anticardiolipina (IgA, IgG ou IgM) em títulos médios ou elevados), anti- β_2 glicoproteína I (IgA, IgG ou IgM); 5) Baixo nível de complemento sérico (C3, C4, CH50); 6) Teste de Coombs positivo na ausência de anemia hemolítica). A classificação da SLICC define que o paciente deve satisfazer pelo menos 4 critérios, incluindo 1 critério clínico e 1 critério imunológico, ou ter NL comprovada por biópsia como único critério clínico na presença de anticorpos anti-nucleares ou anti-DNA de cadeia dupla [26,27,29].

2.2.3. Patogênese do LES

A patogênese do LES envolve predisposição genética, fatores ambientais e anormalidades do sistema imune inato e adaptativo [30]. Um número relevante de fatores

estão envolvidos na patogênese do LES, incluindo distúrbios na imunorregulação, tais como falha nos mecanismos de apoptose para remover ou silenciar células B e T autorreativas, exposição anormal ou apresentação de autoantígenos, além de hiperatividade de células B e T e excessiva estimulação na produção de citocinas inflamatórias [31,32].

A depuração de restos celulares é uma função fisiológica do organismo e essencial para a manutenção da auto-tolerância imunológica. As células apoptóticas são fagocitadas através de receptores que reconhecem componentes alterados da membrana celular presentes no soro de indivíduos saudáveis [31]. Os defeitos nos mecanismos de depuração resultam em necrose e em uma sobrecarga de autoantígenos que, ao invés de serem consumidos por fagócitos, ativam receptores pró-inflamatórios dentro das células do sistema imune inato [3].

O LES induz alterações nos macrófagos que incluem a eliminação inadequada das células apoptóticas, hiperativação e o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, os macrófagos no LES apresentam autoantígenos às células T autorreativas em um meio inflamatório, diferente da apresentação imune geralmente associada ao material celular apoptótico [33]. Após a exposição ao antígeno, as células T CD4 desenvolvem fatores que induzem a um perfil específico de fenótipo e produção de citocinas. Os pacientes com LES apresentam uma hiperprodução de IL-2, que está envolvida na ativação e proliferação de células T, de IL-17 que é produzida por células T ativadas, além do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), da interleucina-6 (IL-6), da interleucina (IL-10) e do interferon tipo I (IFN) [30,33]. O sistema imune adaptativo envolve a geração de células B e T efectoras e a expansão clonal dos linfócitos. Os linfócitos autorreativos são gerados constantemente por processos somáticos que estabelecem uma ampla gama de receptores de células B e T necessárias para proteção

contra agentes patogênicos. Este processo é deficiente em pacientes com LES devido à perda de autotolerância as células B e à remoção de células B imaturas autorreativas os quais não são efetivas [3].

Semelhante aos linfócitos T, as células B são comumente afetadas em pacientes com LES e produzem uma série de autoanticorpos contra componentes celulares, mais comumente contra antígenos intranucleares [32]. Na patogênese do LES, as células T apresentam defeitos na regulação da tolerância e sinalização de seus receptores, os quais contribuem para a sua ativação. As células T também participam do *loop* de regulação da resposta das células B, além de infiltrarem e causarem danos nos tecidos [34]. Essas anormalidades nas células B e T resultam na produção de autoanticorpos patogênicos.

Acredita-se que o estresse oxidativo acentua algumas das exposições irregulares dos tecidos e reação aos sinais de morte celular que caracterizam a patologia do LES. A ativação anormal e o processamento da sinalização de morte celular pelo sistema imune desencadeiam a liberação de restos nucleares de células apoptóticas e necróticas e estimula a produção de anticorpos antinucleares (por exemplo, anti-Ro e anti-DNA), seguida de inflamação, dano aos órgãos alvo e patologia. A produção excessiva e a depuração ineficaz de reativos intermediários de oxigênio (ROI) estão envolvidas no desenvolvimento do LES [35]. Os ROI são originários principalmente das mitocôndrias, sendo que as células T de pacientes com LES apresentam disfunção mitocondrial, caracterizadas por hiperpolarização mitocondrial [36]. Aumento da produção de ROI ou níveis diminuídos de glutathiona reduzida (um marcador inverso de toxicidade celular oxidativa) foram encontrados em linfócitos de sangue periférico de pacientes com LES. Além da produção mitocondrial, os ROI também podem ser gerados por enzimas como a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase em fagócitos e, em menor

extensão, em células endoteliais, células T e células B, bem como por oxidantes ambientais [37].

2.2.4. Papel dos autoanticorpos na patogênese do LES

O principal distúrbio imunológico nos pacientes com LES é a superprodução de autoanticorpos e falta de autotolerância por linfócitos B. A positividade para anticorpos antinucleares (ANA) é a marca imunológica do LES sendo testada frequentemente como parte de uma investigação diagnóstica inicial. Embora os autoanticorpos ANA sejam um teste sensível e detectado em mais de 95% dos pacientes com LES, um teste mais específico é a análise da presença de anticorpos anti-dsDNA e anti-Sm. Os anticorpos anti-Sm reagem com pequenas proteínas nucleares de ribonucleoproteína nuclear (snRNP), enquanto os anticorpos anti-DNA se ligam a um determinante de ácido nucleico amplamente conservado e presente no DNA. Os títulos de anticorpos anti-dsDNA variam frequentemente durante o desfecho da doença, enquanto os títulos de anticorpos anti-Sm são geralmente constantes e mais específicos para o diagnóstico de LES, mas apresentam-se apenas em 30% dos pacientes com a doença [38].

A presença de autoanticorpos em pacientes com LES é cumulativa, dentre os quais os anticorpos ANA, anti-Ra, anti-Ro (SSA), anticorpos anti-La (SSB) e antifosfolipídicos são detectados primeiro, seguidos pelos anticorpos anti-dsDNA, anti-Sm e anti- snRNP. O número desses anticorpos continua a aumentar até que o diagnóstico e a intervenção terapêutica do LES sejam realizados, inibindo e controlando assim a sua produção [39].

Os autoanticorpos se ligam aos antígenos e produzem imunocomplexos, que, se não removidos corretamente, podem se depositar em vários órgãos, como articulações, rins, pele, pulmão, cérebro, entre outros. A lesão tecidual induz uma resposta inflamatória exacerbada, ocasionando danos aos órgãos [38,40]. É importante ressaltar que a

deposição desses imunocomplexos é muito intensa nos rins levando a lesões renais em aproximadamente 50% dos pacientes [41]. O envolvimento renal é quase inevitável em todas as formas de LES com evolução crônica, onde muitos pacientes desenvolvem lesões renais, as quais são definidas como nefrite lúpica, que é uma forma específica de glomerulonefrite com um espectro muito diferente de lesões teciduais [42].

Em relação à frequência de autoanticorpos no LES, um estudo recente realizado na Inglaterra examinou uma coorte de 511 indivíduos com LES com início na vida adulta, mostrando a presença de ANA em 94% dos pacientes, anti-dsDNA em 63%, anti-Sm em 16%, anti-RNP em 29%, anti-Ro em 38% e anti-La em 15% [43]. Em uma população brasileira com LES, 92 pacientes com início da doença na vida adulta foram testados, detectando-se ANA em 100% dos pacientes, anti-dsDNA em 40,2%, anti-RNP em 40,9%, anti-Sm em 31%, anti-Ro em 39,5% e anti-La em 23,3% [44].

A positividade para autoanticorpos específicos no lúpus é observada mais frequentemente em indivíduos não europeus. Um estudo mostrou que pacientes afro-americanos e hispânicos apresentavam maior número de autoanticorpos, ou seja, 53% dos afro-americanos e 34% dos indivíduos hispânicos apresentaram quatro ou mais especificidades para autoanticorpos em comparação com 19% dos indivíduos europeus [45]. Assim como os anticorpos anti-Sm, anti-RNP, anti-dsDNA estavam menos presentes em indivíduos hispânicos e europeus em comparação com afro-americanos.

2.2.5. Envolvimento de múltiplos órgãos

O LES é uma doença que afeta múltiplos órgãos caracterizada por episódios de atividade e remissão ao longo do tempo, os quais restringem a habilidade dos pacientes afetados de realizar as atividades diárias [46]. Entre as manifestações mais comuns estão problemas cardíacos, articulares, cutâneos e manifestações renais, a NL.

As manifestações cardiovasculares são uma das mais importantes causas para a morbidade e mortalidade dos pacientes com LES. Esses pacientes apresentam aterosclerose avançada levando à doença arterial coronariana (DAC) e outras manifestações cardíacas que podem estar presentes. Pericardite é a mais comum, entretanto, miocardite, endocardite, hipertensão e problemas microcirculatórios também podem ocorrer [47].

Em uma coorte brasileira, 36,9% dos pacientes desenvolveram manifestações renais, comparável aos encontrados em outros estudos que relataram uma prevalência variando de 27,9 a 58,3% [48,49]. Indivíduos afro-caribenhos portadores de LES desenvolvem doença renal mais precocemente e com maior frequência [50,51], assim como indivíduos não europeus na França, afro-americanos e latino-americanos [22,52,53].

Além do mais, raça e fatores étnicos desempenham um papel determinante na doença renal crônica (DRC) terminal e na mortalidade. A progressão para DRC terminal é mais comum em indivíduos afro-americanos e hispânicos com NL [54], já a apresentação com DRC terminal ou rápida progressão são significativamente mais comuns em afro-americanos [21]. Contreras et al [55] demonstraram que pacientes afro-americanos com NL desenvolveram DRC terminal e tiveram maiores taxas de mortalidade quando comparados a populações não africanas. Entretanto, parece que pacientes lúpicos de diferentes etnias apresentam taxas similares de rejeição do enxerto renal no seguimento pós-transplante [55].

Lúpus eritematoso cutâneo pode ser uma doença isolada somente envolvendo a pele, ou pode estar presente como parte das manifestações do LES, com pelo menos o envolvimento de um órgão interno e desordens sorológicas imunes. Além disso, manifestações cutâneas incluem *rash* malar, *rash* discoide, fotossensibilidade e úlceras

orais. O envolvimento da pele não somente contribui como também facilita o diagnóstico precoce do LES [56].

Envolvimento articular é uma das manifestações mais comuns em pacientes com LES, com uma prevalência variando de 69% a 95%. Essa manifestação afeta a qualidade de vida dos pacientes e, também pode levar a incapacidade e comprometimento do desempenho funcional nas atividades diárias [57].

Entre as manifestações torácicas, a doença pleural é a mais comum e causa grande morbidade e mortalidade nos pacientes com LES. A dor torácica pleurítica, febre, tosse e dispneia são típicas e o diagnóstico de lúpus pleurítico é estabelecido por fluido sorológico pleural, com a presença de altos títulos de ANA no líquido pleural [58].

O LES pode afetar e levar à lesão qualquer parte do trato gastrointestinal, ocasionado pela deposição de complexos imunes. As complicações incluem isquemia intestinal, hemorragia, infarto ou perfuração intestinal. Clinicamente, os pacientes podem apresentar dor abdominal, febre, vômitos, perda de peso e diarreia [59].

As manifestações neuropsiquiátricas envolvem o sistema nervoso central e periférico e são condições complexas, heterogêneas e geralmente associadas a um pior prognóstico. As complicações neurológicas são responsáveis pela alta morbidade e mortalidade no LES, com um amplo espectro de manifestações clínicas e apesar da disfunção cognitiva (50%) ser a manifestação mais comum, o neurolupus também pode apresentar-se como neuropatia periférica (15%), psicose (10%) ou outras anormalidades do sistema nervoso central, como acidente vascular cerebral, síndrome cerebral orgânica e convulsões [60].

Apesar dos avanços, os pacientes com LES apresentam uma expectativa de vida de duas a cinco vezes menor do que a população em geral, sendo mais grave em pacientes mais jovens. Na comparação entre pacientes jovens e pacientes com início da doença na

vida adulta, o risco de mortalidade é cerca de 2,5 vezes maior em pacientes mais jovens [61,62].

2.3. Nefrite Lúpica (NL)

A NL é uma das complicações mais graves do LES, ocorrendo em aproximadamente metade desses pacientes [52]. Clinicamente, a NL é caracterizada por proteinúria, hematúria, cilindros celulares e perda de função renal que pode levar a DRC terminal e necessidade de diálise ou transplante renal [5,6]. A NL sem tratamento pode destruir o parênquima normal do rim e induzir dano crônico com graus variados de fibrose intersticial, atrofia tubular e esclerose glomerular [63].

As alterações histológicas na NL variam da ausência de lesões, proliferação mesangial isolada e depósitos subepiteliais na membrana basal glomerular (MBG) a formas proliferativas severas, com proliferação endocapilar, depósitos de imunocomplexos subendoteliais, pseudo-trombos intracapilares, necrose e formação de crescentes glomerulares [64]. Recentemente, a lesão dos podócitos na NL e sua contribuição para a fisiopatologia da glomerulonefrite também têm sido estudadas [65–67].

A NL compreende vários padrões de histopatologia renal no LES, incluindo patologia glomerular, tubulointersticial e vascular. Além disso, uma característica do envolvimento renal é a deposição de imunocomplexos circulantes e a ligação ao antígeno no tecido renal [68]. Outros padrões de doença renal, não classificados como NL em suas formas clássicas, são a podocitopatia lúpica e a microangiopatia trombótica, que também podem estar presentes em pacientes com LES [69,70].

2.3.1. Epidemiologia da NL

Os aspectos epidemiológicos da NL são afetados por diversos fatores como demográficos, socioeconômicos, genéticos, clínicos, histológicos e sorológicos [71]. Um dos fatores de risco independentes e consistentemente identificados para o envolvimento renal e rápido desenvolvimento de nefrite são a etnia africana e mestiços latino-americanos, em diferentes coortes multiétnicas dos Estados Unidos [72], América Latina [22], Reino Unido [50] e França [73]. Assim como, a etnia afro-americana é associada à NL recorrente e, possivelmente, com sobrevida reduzida em pacientes submetidos a transplante renal [74].

O *status* socioeconômico também pode ter um impacto importante no desenvolvimento da doença renal nos pacientes. Um estudo adicional, usando a renda familiar, nível educacional e seguro saúde como medidas de *status* econômico e social em uma população americana multiétnica, relatou que a pobreza foi um importante fator para progressão de formas proliferativas da NL. O risco de progressão da doença renal foi relatado pela falta de seguro saúde e pobreza, independente de fatores étnicos, genéticos ou biológicos [75].

A NL ocorreu em 38,8% dos pacientes com LES em uma grande coorte multicêntrica e multiétnica da Europa, América do Norte e América Central, sendo associada à DRC terminal e morte em quase cinco anos de seguimento. No Brasil, 50 a 70% dos adultos e crianças com LES, respectivamente, apresentou nefrite em um estudo de coorte retrospectiva [52,76].

A maior frequência de envolvimento renal tem sido associada com o sexo masculino no LES. Em um estudo de coorte realizado pelo *Grupo Latino Americano de Estudio del Lupus (GLADEL)* mais de 50% dos pacientes tiveram alguma forma de envolvimento renal, com uma frequência em homens de 61% e em mulheres de 50,7%.

O sexo masculino mostrou maior tendência em desenvolver glomerulonefrite e síndrome nefrótica que o sexo feminino [22].

A NL é o principal fator de risco para morbidade e mortalidade no LES, e 10% dos pacientes com NL desenvolverão DRC terminal. O risco de DRC terminal é maior em determinados subgrupos de NL, chegando a 44% ao longo de 15 anos. Pacientes com NL tem uma maior taxa de mortalidade (6-6,8 *versus* 2,4) maior que paciente com LES e sem NL. Além disso, a sobrevida melhora de 46% a 95% em 10 anos se a remissão da doença for atingida [41].

2.3.2. Classificação e diagnóstico

Houveram algumas classificações da NL de 1982 a 1995, porém com a finalidade de integrar avaliações clinicopatológicas e patogênicas e também para eliminar inconsistências e ambiguidades, Weening et al. [77] propuseram em 2004 uma classificação revisada que introduz várias modificações importantes. A classificação é baseada exclusivamente na patologia glomerular e os autores recomendam que qualquer patologia vascular e tubulointersticial significativa fosse relatada como um ponto separado no diagnóstico. Eles identificaram seis classes de LN e os dados de diagnóstico são relatados na Tabela 1 de acordo com a sociedade internacional de nefrologia e patologia renal (*International Society of Nephrology/Renal Pathology Society - ISN/RPS*).

Tabela 2. Classificação da NL pela ISN/RPS.

Classe histológica	Classificação	Alterações histológicas
Classe I	NL mesangial mínima	Glomérulos normais na microscopia óptica (MO), mas com depósitos mesangiais na imunofluorescência (IF)
Classe II	NL proliferativa mesangial	Hiper celularidade puramente mesangial de qualquer grau ou expansão da matriz mesangial na MO, com depósitos imunes mesangiais. Podem ser alguns depósitos subepiteliais ou subendoteliais isolados visíveis por IF ou microscopia eletrônica (ME), mas não por MO
Classe III	NL proliferativa focal (A): NL proliferativa focal com lesões ativas. (A/C): NL proliferativa focal com lesões ativas e crônicas (C): NL proliferativa focal com lesões crônicas	Glomerulonefrite ativa ou inativa focal, segmentar ou global endo ou extracapilar envolvendo < 50% de todos os glomérulos, tipicamente com depósitos imunes subendoteliais focais, com ou sem alterações mesangiais
Classe IV	NL proliferativa difusa S (A): NL proliferativa segmentar difusa, lesões ativas e necrotizantes G (A): NL proliferativa global difusa, lesões ativas e necrotizantes S (A/C): NL proliferativa segmentar difusa, lesões ativas e crônicas G (A/C) NL proliferativa global difusa, lesões ativas e crônicas S (C): NL proliferativa segmentar difusa, lesões crônicas com cicatrizes G (C): NL proliferativa global difusa, lesões crônicas com cicatrizes	Glomerulonefrite ativa ou inativa difusa, segmentar ou global endo ou extracapilar envolvendo ≥ 50% dos glomérulos, tipicamente com depósitos imunes difusos subendotelial, com ou sem alterações mesangiais: (IV-S) NL segmentar difusa quando ≥ 50% dos glomérulos envolvidos tem lesões segmentais, e (IV-G) NL global difusa quando ≥ 50% dos glomérulos envolvidos tem lesões globais. Segmentar é definida como uma lesão glomerular que envolve menos da metade dos tufo glomerulares. Essa classe inclui casos com depósitos difusos nas alças capilares mas com pouco ou nenhuma proliferação glomerular
Classe V	NL membranosa	Depósitos imunes subepiteliais segmentar ou global e/ou sequelas morfológicas pela MO e IF ou ME, com ou sem alterações mesangiais. Classe V NL pode ocorrer em combinação com classe III ou IV nos quais ambos os casos serão diagnosticados
Classe VI	NL esclerosante avançada	com ≥ 90% dos glomérulos globalmente esclerosados sem atividade residual

Adaptado de Weening, 2004 [77].

2.3.3. Patogênese da NL

A patogênese da NL envolve mecanismos patogênicos extra-renais e intra-renais. Os mecanismos extra-renais desenvolvem-se com uma combinação entre fatores ambientais e genéticos, defeitos na imunorregulação bem como proliferação descontrolada de linfócitos B e T. Os mecanismos intra-renais envolvem dano renal mediado por imunocomplexos, ativação de receptores *Toll Like* (TLR), sinalização medida pelo IFN e recrutamento de leucócitos mediados por quimiocinas [68].

O depósito de imunocomplexos no rim ativa a cascata do complemento, levando a co-localização de proteínas do complemento nos glomérulos, ativando vias pró-inflamatórias e células residentes renais, o que provoca lesão tecidual e o desenvolvimento da nefrite. As células inflamatórias são recrutadas através da ação de receptores Fc e receptores *Toll Like* (TLR) ativados pela expressão exacerbada de citocinas e quimiocinas [3].

A injúria glomerular ocorre através de padrões específicos e dependem do sítio de ligação dos imunocomplexos, os quais levam a padrões diferentes de dano tecidual. Depósitos mesangiais e subendoteliais estão associados com infiltração de células imunes com acentuada proliferação endocapilar e mesangial, enquanto que depósitos subepiteliais (podocitários) resultam em lesão não-exsudativa e não proliferativa [77]. O tipo de depósito pode depender do autoanticorpo específico, e também da duração e severidade da NL. A deposição de imunocomplexos no mesângio leva às lesões de classe I e II (mesangial mínima e mesangial proliferativa), e os imunocomplexos subendoteliais induzem lesões proliferativas das classes III (focal) e IV (difusa). Por fim, depósitos subepiteliais levam à formação de lesões da classe V (membranosa), e se em associação com depósitos subendoteliais, às classes mistas III/IV ou IV/V [68].

Uma nova classe descrita ainda em estudo é a podocitopatia lúpica, em que se observam fusão podocitária em mais de 50% dos capilares glomerulares na ausência de imuno-depósitos e de proliferação endocapilar, com histopatologia semelhante a lesões mínimas, proliferação mesangial e glomeruloesclerose segmentar e focal. Nessas formas de NL é provável que as alterações funcionais nos podócitos predominem [78,79].

A NL inicia-se pela deposição de autoanticorpos do tipo anti-dsDNA contendo imunocomplexos no parênquima renal. Embora somente a deposição de imunocomplexos não é suficiente para induzir dano, esse mecanismo ocorre acompanhado pela ativação da via clássica do complemento, infiltração de células do sistema imune, liberação de quimiocinas, citocinas e dano oxidativo, os quais em conjunto induzem inflamação renal e conseqüentemente dano tecidual. A ativação da via clássica do complemento ocorre através da interação do componente C1q com imunocomplexos, os quais devido a *clearance* deficiente resultam na acumulação de C1q e na produção do anticorpo anti-C1q no tecido renal [63].

2.3.4. Os podócitos e a injúria podocitária na NL

Os podócitos são células epiteliais terminais (não proliferam), polarizadas e com carga negativa, possuindo uma forma peculiar modificável devido ao citoesqueleto rico em microfilamentos de F-actina e de miosina. Embriologicamente, os podócitos derivam de células mesenquimais e desempenham papel importante na manutenção da barreira do filtro glomerular, na filtração glomerular e na formação do filtrado glomerular para o espaço de Bowman [80,81].

A complexa cito-arquitetura dos podócitos é necessária para que essas células altamente especializadas realizem suas funções, que incluem: manutenção da forma da alça do capilar glomerular e da integridade da barreira em tamanho e carga às proteínas,

oposição à pressão gerada dentro do glomérulo, síntese e manutenção da membrana basal glomerular (MBG) onde estão ancorados, além de produção e secreção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), necessário para manter a integridade das células epiteliais nos capilares glomerulares. Alterações nas suas funções após uma injúria inflamatória, mecânica ou por mutações genéticas resulta em proteinúria e perda de função renal [80–82].

A injúria persistente aos podócitos leva à sua perda permanente e à patologia glomerular através da desregulação, inflamação ou degeneração da célula epitelial como na NL, por exemplo [83]. Sabe-se que autoanticorpos como o dsDNA ligam-se às estruturas glomerulares, incluindo os podócitos [84], os quais estudos clínicos e experimentais têm correlacionado a atividade da NL ao dano estrutural do diafragma em fenda, à desregulação da arquitetura do citoesqueleto e à perda do ancoramento na MBG, inclusive nos estágios iniciais da doença [66,85].

A apresentação clínica da NL provavelmente se correlaciona com a histopatologia da doença, porém a extensão dos danos ao podócito em nível molecular ainda não é claro. Estudos têm investigado a perda de podócitos na urina (podocitúria) e da redução de sua expressão no tecido (podocitopenia) como uma evidência de lesão estrutural do capilar glomerular, correlacionado-a com a severidade histológica e com alterações observadas na microscopia eletrônica [67,85,86].

2.3.4. Tratamento da nefrite lúpica

A NL é um fator de risco importante para a morbidade e mortalidade no LES e apesar das terapias potentes com anti-inflamatórios e imunossupressores, muitos pacientes evoluem para DRC e DRC terminal [41]. Atualmente, o objetivo da terapia é controlar a atividade da doença, uma vez que o tratamento permanece insuficiente devido

a heterogeneidade biológica entre os pacientes e a falta de terapias seguras e específicas. Além disso, o objetivo de estudos recentes é tratar os pacientes de maneira estratégica, personalizada e induzir melhores resultados em longo prazo. Portanto, é de fundamental importância encontrar terapias capazes de modificar o curso da doença ou reverter seu período de atividade, minimizando efeitos colaterais [87].

A tomada de decisão para o início do tratamento, a seleção de um regime terapêutico e a duração do tratamento dependem da caracterização do envolvimento renal baseados nos critérios de classificação de 2004 da *ISN/RPS* [77]. Na prática clínica, a NL humana é tratada com um regime terapêutico de indução e é seguida por imunossupressão de manutenção adicional [88].

O tratamento típico inclui drogas antimaláricas (principalmente hidroxicloroquina e cloroquina), drogas imunossupressoras, agentes biológicos e algumas terapias adjuntas seguindo as recomendações internacionais [89]. Ciclofosfamida (CCF) e micofenolato mofetil (MMF) são drogas usadas para terapia de indução associada com glicocorticoides (metilprednisolona endovenosa seguida de prednisona oral) sendo que o MMF demonstrou eficácia comparável a CCF em estudos recentes [90,91].

A fase de manutenção continua com o tratamento imunossupressor para alcançar e/ ou manter resposta completa ou parcial, assim prevenindo a recidiva da NL, o surgimento de lesões crônicas e DRC, ao mesmo tempo minimizando os efeitos tóxicos da longa exposição de drogas imunossupressoras [91]. Geralmente, a terapia nessa fase é realizada com MMF ou azatioprina (AZA), e também provou ser eficaz e segura, quando comparada ao tratamento com a CCF em longo prazo [92].

Além disso, a ciclosporina e o tacrolimus, drogas inibidoras da calcineurina, também foram avaliadas em pacientes com NL estável. Alguns dados limitados sugerem que o tacrolimus ou a combinação de baixas doses de MMF com tacrolimus podem ser

usadas como terapia de indução na NL, particularmente em pacientes com contraindicações ou pela falta de resposta ou intolerância à CCF ou ao MMF [93].

Como descrito previamente, células B desempenham um papel proeminente na patogênese da NL através de uma variedade de diferentes mecanismos. Além disso, as células B como alvo terapêutico surgiram como uma estratégia biologicamente plausível nos últimos anos [91]. A única droga biológica aprovada para o tratamento do LES é o Belimumab, um anticorpo monoclonal inibindo o fator estimulador de linfócitos B (fator BlyS) e a produção de células B, mas outros agentes que usam essas células como alvo, tais como Rituximab, Blisibimod e Tabalumab também estão sendo testadas em estudos clínicos de fase III [94–96].

Recentemente, novas terapias podem ser uma alternativa para o tratamento das manifestações do LES, como a terapia nutricional e o uso de suplementos nutricionais. Essas alternativas poderiam melhorar a qualidade de vida desses pacientes, reduzindo comorbidades e os efeitos colaterais causados pela terapia farmacológica. Crescentes evidências mostram que a ingestão de diferentes nutrientes apresentam efeitos benéficos derivados de suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras, sugerindo um potencial efeito positivo da terapia dietética na prevenção e cuidado no LES [87].

Também é notável o papel dos antioxidantes alimentares, como polifenóis, flavonóides e melatonina, incluídos na dieta através de vegetais, frutas, cereais e bebidas como o chá e o vinho. No entanto, estudos adicionais são necessários para uma melhor compreensão do processo de regulação e dos fatores-chave da ação dessas substâncias sobre essas doenças, antes da sua inclusão na prática clínica [87].

2.3.5. Nefrite lúpica e estresse oxidativo

Extensas evidências indicam que o estresse oxidativo, que é um desequilíbrio entre a produção oxidante e a atividade do sistema antioxidante, desempenha um papel importante na patogênese da doença glomerular. Na NL, ocorre a deposição de imunocomplexos que é acompanhada pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou ROI, as quais desempenham um papel central na injúria glomerular aguda e crônica em pacientes com NL [97,98].

A detecção da oxidação de lipídios, o dano oxidativo ao DNA e a oxidação de proteínas em pacientes com lúpus são evidências do envolvimento das ROS no LES e na NL [99]. O papel fundamental das ROS em produzir dano celular agudo e irreversível é bem caracterizado, sendo que os mecanismos de dano celular por ROS incluem peroxidação de membranas celulares, reticulação de proteínas celulares e dano ao DNA [100]. Os produtos liberados de células lesadas podem amplificar a resposta inflamatória aguda, levando a danos na citoarquitetura das células de órgãos alvo. Por sua vez, as ROS são também capazes de amplificar as reações imunológicas que promovem a destruição tecidual na NL [101].

Reações oxidantes estão associadas com fibrogênese renal em pacientes com LES e outras doenças progressivas, dando suporte ao papel da produção crônica de ROS como uma via de sinalização para expansão da matriz extracelular, produção de fibroblastos e de colágeno que resulta em fibrose tecidual [102]. Wang et al. demonstraram que o tratamento com ácido beta-aminoisobutírico melhora a fibrose renal em rins obstruídos de camundongos através de inibição da ativação de fibroblastos [103].

Portanto, as ROS são potentes estimuladores da produção de colágeno em estudos experimentais utilizando cultura de fibroblastos [104]. Esses autores também sugerem que doenças fibrogênicas estão associadas com a redução de enzimas antioxidantes

(superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, entre outras) e aumento da produção de ROS [105]. Essas observações fornecem a base de uma “retroalimentação positiva”, levando à persistente geração de ROS na NL progressiva. Estudos são necessários para avaliar a eficácia potencial de antioxidantes e compostos naturais como alvos terapêuticos para prevenir a progressão da doença renal em pacientes com NL [106].

2.3.6. Nefrite lúpica e tratamento antioxidante

A NL está intimamente associada ao desequilíbrio entre as atividades oxidantes e antioxidantes na sua patogênese. Alguns estudos que investigaram o uso de antioxidantes no tratamento da NL obtiveram resultados satisfatórios, sendo que existem poucos estudos relatando o tratamento da NL com antioxidantes. São estudos em grande parte experimentais, com apenas um relato de caso na literatura [7,8,107].

Suwannaroj et al. demonstraram que o tratamento com N-acetilcisteína (NAC) em modelo experimental utilizando camundongos reduziu a mortalidade desses animais [7]. Outro estudo realizado por Lai et al. mostrou que a NAC melhorou o LES através do bloqueio da atividade da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) em células T. Além disso, o tratamento com NAC melhorou os níveis de glutathione (GSH) regulando a atividade da doença e suas manifestações [37].

Um estudo experimental avaliou os efeitos protetores da administração crônica de melatonina (30 mg/kg de peso corporal na água de beber) em camundongos MRL/Mpj-Fas^{lpr}, que desenvolvem espontaneamente uma doença autoimune com características semelhantes ao LES humano. Os camundongos fêmeas e a maioria dos machos exibiram anormalidades glomerulares compatíveis com nefrite, lesões do tipo artrite e presença de infiltrado inflamatório intersticial variando de padrões leves a severos. O tratamento com a melatonina melhorou os padrões histológicos em fêmeas mas piorou em machos, e por

isso esses autores sugeriram que os efeitos da melatonina são sexo-dependentes e, provavelmente, ocorrem pela modulação e inibição de hormônios sexuais [108].

Adicionalmente, em um modelo de lúpus induzido por pristano, um provável desencadeador ambiental do LES em populações susceptíveis, Zhou et al. demonstraram que a administração oral de melatonina (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg), imediatamente após a injeção de pristano, inibe ou reverte alterações imunológicas no modelo de camundongos BALB/c, após 24 semanas de tratamento. Nesse estudo, foi demonstrado uma redução dos níveis de IgM anti-ssDNA e de autoanticorpos anti-histonas, redução da secreção de IL-6 e IL-13, e melhora das lesões histológicas renais, com redução no espessamento das paredes capilares e na expansão mesangial, e menor porcentagem do infiltrado inflamatório intersticial. Esses mecanismos envolvem a modulação de distúrbios no sistema imunológico e conseqüentemente das alterações histológicas nos animais induzidos por pristano [8].

Zhai et al. administraram em uma linhagem de camundongos MRL/lpr a pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), um potente antioxidante, que é frequentemente usado para estudar o papel das reações dos radicais livres em vários processos biológicos e contra o dano celular induzido por radicais livres. O PDTC exerceu um efeito protetor nos camundongos tratados através da redução do número de células do infiltrado inflamatório, além da severidade do dano autoimune, dos níveis séricos de anti-dsDNA e do achatamento dos pedicelos dos podócitos. Esses efeitos são mediados, em parte, pela inibição da via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e da p38 proteínoquinases ativadas por mitógenos (MAPK). O PDTC pode ser eficaz prevenindo a fibrose renal em modelos espontâneos de LES, e também por antagonizar os efeitos induzidos pelo lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias, os quais podem acelerar e exacerbar a NL [9].

Um relato de caso envolvendo substâncias antioxidantes tratou pacientes com NL com hidroxicloroquina (400 mg/dia), calcitriol (0,25 µg/dia) e NAC. O comprimido efervescente de 600 mg de NAC foi dissolvido em água morna e administrado duas vezes ao dia, durante 12 meses. Após o tratamento houve melhora dos índices relativos do número de leucócitos, da proteinúria de 24 horas e da taxa de sedimentação de eritrócitos ou velocidade de hemossedimentação, refletindo um resultado terapêutico satisfatório e sugerindo que a combinação de NAC com hidroxicloroquina e calcitriol pode ser adequada para o tratamento inicial da NL [107]. Contudo, estudos adicionais são necessários para o melhor entendimento do processo de regulação mediado por antioxidantes e de fatores críticos para a sua ação em doenças autoimunes.

2.4. Modelos animais de LES

Devido ao alto grau de heterogeneidade clínica em pacientes com LES, os modelos de camundongos têm sido valiosos para investigar a etiopatogenia do LES e da NL, bem como para identificar e validar novos alvos terapêuticos [11]. Modelos de camundongos com LES podem ser espontâneos ou induzidos, e várias alterações renais têm sido relatados nesses animais. Os modelos espontâneos de camundongos incluem o híbrido entre o F1 e o *New Zealand Black* (NZB) e o *New Zealand White* (NZW) formando a geração híbrida (NZB/W F1) [109], o MRL/lpr [110], e a linhagem BXSB/Yaa [111], além do modelo exposto ao pristano [10], que é um modelo induzido.

2.4.1. Modelos espontâneos de camundongos

O modelo de camundongo híbrido NZB/W apresenta susceptibilidade a autoimunidade, altos níveis séricos de anticorpos antinucleares, anti-dsDNA, anti-Ro, anti-La e anti-Sm que são característicos do LES humano. Esses camundongos desenvolvem proteinúria progressiva e glomerulonefrite com depósitos de imunocomplexos no mesângio, cilindros celulares e formação de crescentes, além de proliferação difusa de células glomerulares. No geral, a linhagem híbrida NZB/W F1 tem sido usada para estudar os mecanismos genéticos subjacentes do LES e suas características, e também estudar a etiopatogênese da glomerulonefrite mediada por imunocomplexos envolvendo a deposição de anti-dsDNA e outros autoanticorpos, além do papel do IFN tipo 1 no desenvolvimento do LES [10,112].

A linhagem de camundongo MRL/lpr é um modelo espontâneo de mutação recessiva *lymphoproliferation (lpr)* e apresenta diversas características que reproduzem as alterações encontradas nos pacientes com LES, como glomerulonefrite mediada por deposição de imunocomplexos e hiperatividade de células B e T [112,113]. Esses animais espontaneamente desenvolvem autoanticorpos tais como anticorpos ANA, anti-DNA (dsDNA e ssDNA), anti-Ro e anti-La. Eles também induzem linfadenopatia, dano em diferentes órgãos e morte prematura, sendo que os índices de mortalidade chegam a 50% após 24 semanas de vida [10].

Outro modelo animal de LES espontâneo é a linhagem BXSB que foi criada através do cruzamento dos camundongos C57BL/6J fêmeas e camundongos machos SB/Le. Esses animais apresentam o cromossomo Y ligado ao acelerador autoimune aa (Yaa), levando ao aumento da autoimunidade e à glomerulonefrite aguda em machos, os quais são diferentes de outros modelos animais que afetam as fêmeas de maneira mais pronunciada. Clinicamente, como a linhagem BZB/W, o modelo BXSB apresenta

anticorpos anti-DNA séricos e glomerulonefrite severa. Além disso, eles também são usados para estudar LES de origem genética e para investigar danos de vias dependentes de células T [114,115].

2.4.2. Modelos induzidos de camundongos

Sato et al. relataram que fêmeas BALB/c expostas ao pristano apresentavam diversas características semelhantes ao LES de humanos. Por essa razão, o modelo animal induzido com uma única injeção intraperitoneal de pristano tem sido usado para estudar a fisiopatologia dessa doença, sendo que o dano renal é detectado geralmente 6 meses após injeção de pristano. Esses camundongos desenvolvem proteinúria e alterações teciduais, tais como depósitos de IgG e complementos no glomérulo, e também deposição de outros imunocomplexos, proliferação celular, fusão e achatamento dos pedicelos dos podócitos consistente com a forma proliferativa difusa de NL [116,117].

O pristano também induz a produção de autoanticorpos IgG em associação com o LES ativo, incluindo ANA, dsDNA, ssDNA, cromatina, Sm, RNP, Su e proteína P ribossomal. Além disso, manifestações clínicas do LES foram encontradas nesse modelo animal, tais como glomerulonefrite mediada por imunocomplexos e hipergamaglobulinemia policlonal [118]. Além das manifestações clínicas semelhantes, também ocorre produção exacerbada de IFN- α , IFN- β e citocinas pró-inflamatórias que podem ser detectadas nesse modelo como no soro de pacientes com LES ativo [119]. Portanto, o modelo do pristano é uma ferramenta importante que permite testar novas abordagens terapêuticas para tratar manifestações agudas e crônicas em órgãos-alvo, como o rim por exemplo. Isso permite o estudo dos mecanismos envolvidos no início da doença e a influência do fator ambiental no desencadeamento do lúpus em relação aos modelos espontâneos.

2.6. Uso de substâncias naturais no modelo induzido por pristano

2.6.1. Quercetina

Os flavonóides são compostos fenólicos que representam constituintes substanciais da parte não energética da dieta humana e acredita-se que promovem a saúde ideal, em parte, através dos seus efeitos antioxidantes na proteção de componentes celulares contra ROS [120]. A quercetina [2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one] é um flavonóide polifenólico formado por um pó cristalino variando de amarelo a esverdeado, geralmente encontrado em muitos alimentos que são frequentemente consumidos como a maçã, cebola roxa, brócolis, chás, vegetais, bem como em muitas sementes, nozes, flores, cascas e folhas e sua estrutura química está representada na figura 1 [121,122].

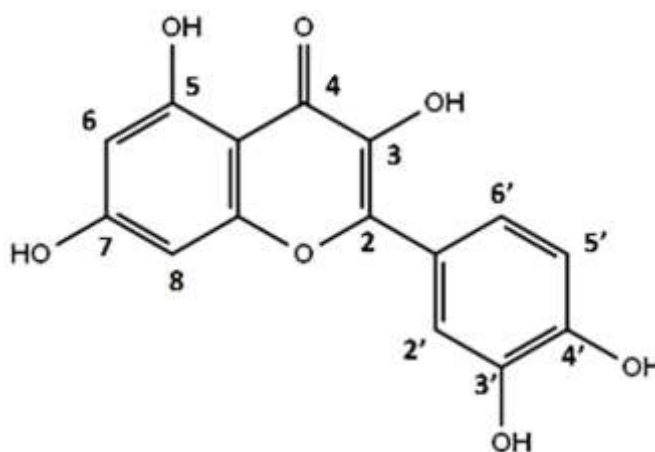


Figura 1. Estrutura química da quercetina.

Entre as frutas, as maçãs juntamente com cerejas e frutas vermelhas são a fonte mais rica de quercetina. A concentração de quercetina em bebidas tais como cerveja, vinho branco, café e chocolate ao leite foi observado ser abaixo de 1 mg/litro. Entretanto, uma maior concentração de quercetina foi observada no vinho tinto e infusão de chás,

como por exemplo, 4 a 16 e 10 a 25 mg/l respectivamente. Já em alimentos, a concentração de quercetina é afetada por vários fatores tais como temperatura, armazenamento e condições de desenvolvimento, uma vez que as altas temperaturas e o armazenamento de materiais alimentares reduzem o conteúdo de quercetina, que varia de acordo com a natureza dos alimentos [123].

2.6.1.1. Biossíntese

Flavonóides, bem como a quercetina, são importantes para a saúde humana. Esses compostos, assim como as vitaminas, não são produzidos endogenamente e devem também ser fornecidos através de dietas e suplementos nutricionais. A quercetina tem sido objeto de publicações científicas nos últimos 30 anos e apresentou a maior atividade entre os flavonóides estudados em modelos experimentais, sendo frequentemente usada para terapias em condições alérgicas, tratamento de gota, tratamento do câncer, entre outros, que são também, em parte, condições inflamatórias [124,125].

Há dúvidas se os flavonóides funcionam em sua forma ativa ou na forma de seus metabólitos, uma vez que os flavonóides são rapidamente metabolizados no trato intestinal por enterócitos e pela flora intestinal [126]. Embora o destino metabólico possa variar consideravelmente entre os diversos flavonóides, não há dúvida de que podem ocorrer concentrações consideráveis de seus metabólitos no sangue [127].

Hollman et al. mostraram que os glicosídeos de quercetina presentes nas principais fontes alimentares de flavonóides são absorvidos e eliminados lentamente ao longo do dia. Sendo assim, a quercetina poderia contribuir significativamente para as defesas antioxidantes presentes no plasma sanguíneo [128].

2.6.1.2. Catabolismo

Esse polifenol existe como quercetina livre (aglicona) com propriedade lipofílica e em formas glicosiladas, com propriedades não-lipofílicas. A quercetina na forma aglicona é facilmente absorvida através da bicamada de fosfolipídios de células epiteliais da mucosa intestinal [129]. Já, as formas glicosiladas da quercetina não são absorvidas pelo corpo e são comumente encontradas em plantas, tais como frutas, vegetais e grãos de soja. Contudo, Day et al. relataram que a lactase-florizina hidrolase expressa na membrana da borda em escova do intestino do rato hidrolisa as formas glicosiladas da quercetina na forma de aglicona [130].

Portanto, as moléculas de quercetina são absorvidas nas células intestinais por difusão simples através da bicamada de fosfolipídios e por difusão facilitada, e existem como agliconas no espaço citosólico nos dois casos de humanos e ratos. Então, nas células, a quercetina aglicona é glucoronidada, sulfatada ou metilada e esses tipos modificados de moléculas de quercetina entram na circulação [131]. Os principais metabólitos em ratos são di- e tri-conjugados de quercetina, tais como glucoronidados, sulfatados e/ou metilados, enquanto que em seres humanos, a quercetina-30-O-glucoronida é o principal metabólito circulante [131,132].

Matsugawa et al. mostraram que a taxa de excreção biliar dos metabólitos da quercetina das 9:00 às 19:00 era de 8,5% em relação à quantidade ingerida. Além disso, foi possível considerar que a taxa de excreção biliar é quase constante durante 24 horas, tendo em vista taxas de excreção semelhantes entre o estado de absorção (9:00 horas) e o estado pós absorvente (19:00 horas). A excreção urinária de quercetina corresponde a taxa de absorção líquida após atingir o equilíbrio no corpo de metabólito da quercetina na

alimentação diária, diferindo da excreção biliar que é cerca de duas vezes maior em condições fisiológicas normais [133].

2.6.1.3. Receptores e mecanismos de ação

A quercetina já demonstrou controlar a inflamação induzida pela obesidade [125], porém seus mecanismos de ação ainda não estão claros. A quercetina reduz a liberação de proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α) de adipócitos e macrófagos e de cocultura de adipócitos/macrófagos. Além disso, essa substância também impede a ativação da sinalização inflamatória pelos macrófagos, a infiltração e ativação de macrófagos induzidos por MIP-1 α . A ação inibitória da quercetina nas respostas inflamatórias induzidas por MIP-1 α dos macrófagos é mediada por redução de receptores de quimiocinas (CCR1/CCR5) e inibição da ativação das vias das quinases c-Jun-NH2-terminal (JNK), MAPK e I κ B quinase (IKK), bem como a degradação de IKK [134].

A quercetina também atua como agente neuroprotetivo e modula a atividade de diferentes receptores sinápticos e canais iônicos, incluindo receptores ionotrópicos GABA [135]. Já, a propriedade antioxidante da quercetina é atribuída a presença de uma fonte rica em grupos hidroxila e ligada ao orbital de ligação π , que atua como um potente elétron ou doador de prótons e sequestrador de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o qual está envolvido em diversas patologias [136]. A quercetina reage com o radical ânion superóxido (O²⁻) na presença da peroxidase formando H₂O₂ e o radical semiquinona, os quais danificam proteínas, lipídios e DNA levando ao dano celular [137].

A forma semiquinona da quercetina também reage com grupos tióis preferencialmente com GSH e forma o complexo estável 6-glutationa-quercetina (GSQ). A atividade antioxidante da quercetina também depende dos níveis de GSH. Altos níveis

de GSH promovem a formação de GSQ, aumentando a atividade antioxidante da quercetina, enquanto baixos níveis de GSH aumentam os níveis de semiquinona da quercetina causando dano celular, promovendo assim um efeito pró-oxidante [138].

2.6.1.4. Quercetina e estresse oxidativo

A estrutura química dos flavonóides, incluindo a quercetina, faz deles substâncias capazes de estabilizar elétrons livres obtidos dos radicais livres tais como ROS em sistemas *in vitro*. Flavonóides com estruturas particulares podem também inibir a produção de ROS com habilidade de quelar íons metálicos que contribuiriam para a produção desses radicais livres [139].

Além disso, esses compostos flavonóides, incluindo a quercetina, são conhecidos por inibir a produção do ânion superóxido pela xantina oxidase [140]. Esses flavonóides mostraram muitos efeitos nas células *in vitro*, aumentando o entendimento de como os nutrientes afetam o organismo na saúde e doença [141].

Heijnen et al. mostraram que grupos hidroxila, em particular, são relacionados positivamente às habilidades dos flavonóides de sequestrar radicais livres [142]. Tanto a configuração como o número total de grupos hidroxila influenciam substancialmente o mecanismo de atividade antioxidante da quercetina para a eliminação de ROS [143].

A presença de um inerente número de grupos hidroxila livres no esqueleto químico da quercetina desempenha um importante papel na sua atividade antioxidante [143]. Uma vez que a quercetina inibe os sistemas enzimáticos responsáveis pela geração de ROS (ciclooxigenase, lipoxigenase e xantina oxidase), liga-se aos ânions O^{2-} , oxigênio singlete (O^2) e radicais hidroxila e, como consequência, reduz a peroxidação lipídica, quela metais de transição como ferro e cobre e inibe a atividade da aldose redutase [144].

As propriedades antioxidantes da quercetina são consideradas benéficas à saúde humana, enquanto que a contribuição direta dos polifenóis para a redução do estresse oxidativo é controversa devido à presença de antioxidantes endógenos mais abundantes, como o ácido úrico, que é maior no plasma que os polifenóis. Curiosamente, no entanto, os polifenóis promovem a produção de óxido nítrico (NO) através da redução do nitrito da dieta e provavelmente na circulação. O NO gerado pode modular as funções fisiológicas dos tecidos de forma direta e indireta (na circulação, existe como derivado nitroso), enquanto que a alta potência redutora da quercetina parece causar uma diminuição da biodisponibilidade de nitrito com menor efeito na função vascular [145].

2.6.1.5. Principais funções da quercetina

A principal função da quercetina é eliminar radicais livres de oxigênio prevenindo o dano oxidativo e reduzindo a produção de hidroperóxido lipídico, sendo conhecida por seu forte poder antioxidante e anti-inflamatório [146]. Além disso, a quercetina também apresenta ações antioxidante através da capacidade de eliminar radicais livres e pela interação com enzimas antioxidantes, tais como a heme-oxigenase-1, os quais protege contra a apoptose causada pelo estresse oxidativo e induzidos pelo H_2O_2 e reduz a produção intracelular de ROS e a disfunção mitocondrial. Assim, a quercetina mostra ações anti-hipertensivas através de mecanismos dependentes das vias anti-inflamatórias e antioxidantes, como proteção de células cardiovasculares associadas a uma diminuição da concentração de triacilglicerol e aumento da concentração de colesterol lipoproteína de alta densidade (HDL), vasodilatação dependente do endotélio devido a uma maior produção de NO e prevenção da apoptose das células endoteliais [120].

A quercetina também atua aumentando a resistência das células ao estresse oxidativo induzido por oxidantes como o H₂O₂, hidroperóxido e moléculas neurotóxicas, seja por meio de sua atividade antioxidante direta ou indireta, reduzindo o estresse oxidativo, inflamação e o dano neuronal. O aumento da sobrevivência neuronal mediado pela quercetina ocorre através da redução da expressão de uma variedade de agentes oxidativos como citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, a cicloxigenase, e também mitigando as lesões neuronais mediadas por ROS [123].

As propriedades anti-necróticas e anti-inflamatórias têm sido associadas à habilidade da quercetina em bloquear o fator pró-inflamatório mais importante, o NF-κB, modulando importantes citocinas envolvidas na necrose e inflamação como IL-1β e IL-10 [147]. Assim como, o efeito anti-inflamatório da quercetina desempenha papel fundamental na redução de fatores de risco cardiovascular como fibrinogênio e proteína C reativa humana [148].

A substância quercetina, conhecida por sua forte capacidade antioxidante e anti-inflamatória, possui também efeito anti-fibrótico. Esse efeito se deve à capacidade da quercetina de inibir a ativação de fibroblastos, a fibrose hepática e também à inibição da ativação e infiltração de macrófagos hepáticos e da modulação de macrófagos polarizados M1 que possuem propriedades inflamatórias, protegendo o órgão da inflamação excessiva e da fibrose [149].

Essa substância também atua como um potente agente anticâncer por atenuar processos relacionados aos tumores como estresse oxidativo, apoptose, proliferação e metástase [150]. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a quercetina em baixas doses, através de suas propriedades antioxidantes e anti-apoptóticas inibe o crescimento de células cancerígenas, atuando como potente agente anticancerígeno e atenuando processos relacionados ao tumor, incluindo estresse oxidativo, apoptose, proliferação e

metástase. Porém, a quercetina em altas doses possui efeito pró-apoptótico agindo especificamente contra células tumorais, aumentando a atenção sobre o uso da quercetina como um adjuvante em quimioterapia [151,152].

Por fim, a quercetina regula a adipogênese e a apoptose reduzindo a ação das enzimas relacionadas à adipogênese na obesidade, reduzindo o número de células que armazenam gorduras (adipócitos). A quercetina atua bloqueando as ações de adipogênese através do estímulo da via de sinal p38MAPK. Simultaneamente, essa substância induz a apoptose de adipócitos maduros, controlando as importantes vias quinase reguladas pela sinalização extracelular (ERK) e JNK [125].

2.6.1.6. Quercetina e outras funções

A quercetina também protege contra a DAC através da prevenção da oxidação do colesterol lipoproteína de baixa densidade (LDL), prevenindo a formação da placa aterosclerótica e a agregação plaquetária, assim como promove o relaxamento do músculo liso cardiovascular, ocasionando os efeitos anti-hipertensivo e antiarrítmico [153]. A capacidade de inibir a proliferação e migração das células do músculo liso aórtico e a agregação plaquetária (efeitos antitrombóticos), juntamente com a inibição da fosforilação da MAPK, a torna uma substância capaz de prevenir distúrbios cardiovasculares [148].

A quercetina foi observada ser eficaz contra uma ampla variedade de vírus, como o vírus T-linfotrópico humano, por meio de suas propriedades anti-infecciosas e anti-replicativas. Além disso, essa substância também potencializa a ação antiviral contra o vírus da encefalomiocardite e o vírus do tipo herpes simples (HSV) induzindo a produção de TNF e aumentando assim a produção de IFN- β [123].

Em distúrbios cerebrais, a quercetina possui efeitos neuroprotetores, através da atividade direta de eliminação de radicais livres e quelação de metais, os quais podem efetivamente inibir o dano neuronal mediado pelo estresse oxidativo. Apesar da sua atividade antioxidante direta, a quercetina pode também atenuar o estresse oxidativo por inibir efetivamente as enzimas xantina oxidase e óxido nítrico sintase [155].

Em resumo, a quercetina é um flavonóide com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-fibróticas, exercendo muitos efeitos benéficos para a saúde, como a proteção contra várias doenças, incluindo osteoporose, câncer e doenças cardiovasculares. Ainda não existem estudos sobre os efeitos da quercetina em doenças autoimunes específicas como a nefrite lúpica, mas considerando a amplitude de seus efeitos sistêmicos seria uma estratégia a ser explorada tanto em modelos animais quanto em estudos clínicos.

2.6.2. Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina) foi isolada em 1958 da glândula pineal bovina pelo grupo de Lerner [156]. Essa substância está presente em diversos fluidos biológicos, tecidos e compartimentos celulares (saliva, urina, fluido cerebrospinal, folículo pré-ovulatório, fluido seminal, líquido amniótico e leite). O pico da secreção pineal ocorre a noite, com níveis plasmáticos máximos por volta das 3:00 – 4:00 horas da manhã, enquanto os níveis durante o dia são baixos ou até mesmo não detectáveis [157].

Atualmente, a melatonina é mais comumente usada para corrigir distúrbios do sono, devido à sua função central regulatória. Apesar da falta de efeitos colaterais aparentes, o uso de melatonina no tratamento de outras patologias ainda permanece em

estudo pois descrevem-se vários benefícios atribuídos a doses farmacológicas dessa neuroindolamina, que provavelmente afeta funções fisiológicas por ação localizada [158].

A melatonina é uma molécula altamente lipofílica, mas também possui propriedades hidrofílicas; ao invés de ser armazenada no órgão secretor, após a biossíntese, é liberada para capilares, onde até 70% está ligada à albumina. Os níveis de melatonina detectados nos fluídos biológicos usando técnicas atuais são eliminados pela pinealectomia, o que sugere que o alto nível de melatonina é associado à glândula pineal [159]. A estrutura química da melatonina está representada na figura 2 [160].

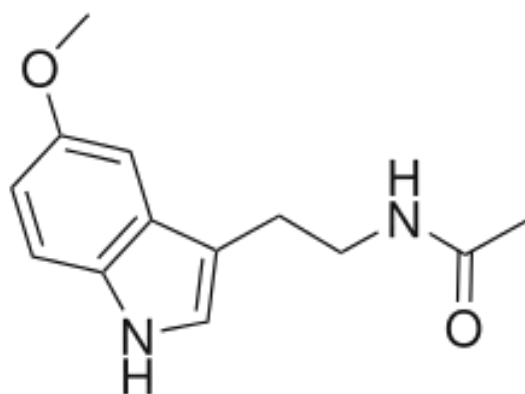


Figura 2. Estrutura química da melatonina.

A produção humana endógena de melatonina é aproximadamente 30 µg/dia associada com níveis plasmáticos de 100–200 pg/ml. Esses valores são muito variáveis e reduzem com a idade. O extravasamento de melatonina do trato gastrointestinal e de outros órgãos pode ser responsável pelas concentrações normais baixas de melatonina no plasma durante o dia, uma vez que a produção de melatonina fora da glândula pineal não está sob o controle circadiano do sistema nervoso central [161].

2.6.2.1. Biossíntese

Inicialmente, a melatonina foi isolada e identificada na glândula pineal bovina como a indolamina N-acetil-5-metoxitriptamina. A substância foi chamada de "melatonina" por sua capacidade de afetar os melanóforos da pele das rãs e pela sua relação química com a serotonina (5-hidroxitriptamina), sendo a melatonina o mais importante e melhor neurotransmissor estudado de todos os produtos provenientes da glândula pineal, embora outros indoles e peptídeos sejam sintetizados e secretados pela glândula pineal dos mamíferos [159]. Essa substância é sintetizada em vários órgãos, incluindo retina, glândulas de Harder, mucosas gastroentéricas, megacariócitos e plaquetas, sendo que as taxas, quantidades, modalidades e as condições variam em relação aos respectivos órgãos [157].

Resumidamente, os pinealócitos absorvem o triptofano do sangue e o convertem em serotonina através de hidroxilação e descarboxilação. A serotonina é então convertida em N-acetil serotonina pela enzima N-acetil transferase (NAT); a N-acetil-serotonina é metilada em melatonina pela enzima hidroxindole-O-metil transferase (HIOMT). A melatonina também pode ser formada através de O-metilação da serotonina e posterior N-acetilação de 5-metoxitriptamina, ou por O-metilação de triptofano seguido de descarboxilação e N-acetilação [162]. Além disso, duas enzimas estão envolvidas na síntese da melatonina, a aril-alquilamina N-acetiltransferase (AANAT) e N-acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT), as quais catalisam a conversão de serotonina em melatonina [163].

2.6.2.2. Catabolismo

A melatonina é metabolizada principalmente no fígado, mas também no rim, submetida a hidroxilação e, em seguida, conjugação em sulfato e glicuronídeo. Nos seres humanos, o principal metabólito é a 6-sulfatoximelatonina, sendo que sua concentração urinária representa até 90% da melatonina administrada. Além disso, a sua meia-vida no sangue após a infusão intravenosa é de cerca de 30 minutos, porém foi observado um padrão de eliminação bifásico com meia-vida de cerca de 3 e 45 minutos após a administração oral [159].

A principal via de degradação da melatonina consiste de 6-hidroxilação seguida de conjugação e eliminação renal. A concentração do metabólito urinário primário da melatonina, a 6-sulfatoximelatonina, reflete a quantidade de melatonina plasmática noturna no corpo, sendo que a sua avaliação quantitativa na urina é considerada um método prático para determinar a fase circadiana, uma vez que representa a quantidade de melatonina endógena e, apesar de uma grande variabilidade na melatonina, sua faixa permanece relativamente estável no mesmo indivíduo [164].

Finalmente, a degradação da melatonina ocorre através de várias vias principais, como a via de degradação hepática clássica que gera 6-hidroxi melatonina, a via indólica alternativa que produz 5-metoxindole acético ou 5-metoxitriptofol, a via quinúrgica que produz N1-acetil-N2-formil-5-metoxicinuramina e sua conversão para metabólitos funcionais após remoção de radicais [162].

2.6.2.3. Receptores e mecanismos de ação

As múltiplas ações da melatonina envolvem mecanismos dependentes de receptores assim como processos que são independentes de receptores. Três diferentes subtipos de receptores de melatonina, denominados receptores melatonérgicos do tipo 1, 2 e 3 (MT1, MT2 e MT3), foram identificados e demonstraram mediar o componente vascular interagindo com a melatonina. Além dos seus efeitos endócrinos clássicos, a melatonina funciona como um eliminador direto de radicais livres [165].

A melatonina exerce seus efeitos através de receptores específicos acoplados à proteína G e caracterizadas por um domínio que abrange sete trans-membranas. Os estudos de clonagem identificaram os receptores melatonérgicos de membrana: receptores MT1, que são expressos no núcleo supraquiasmático do hipotálamo e paratuberalis da hipófise, receptores MT2, localizados principalmente no cérebro e retina, e os receptores MT3, que não são expressos em mamíferos, mas encontrados em peixes, anfíbios e aves. Os receptores MT1 e MT2 são expressos em testículos de roedores, incluindo camundongos, ratos e *hamsters*. A melatonina também exerce os seus efeitos ligando-se a receptores nucleares como os receptores órfãos retinóides e os receptores Z retinóides (ROR/RZR), e proteínas intracelulares tais como calmodulina [166].

Os receptores MT1 e MT2 são expressos nos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo. Esses receptores também foram identificados nas artérias coronárias do corpo humano através de amostras provenientes de patologias e também de controles saudáveis. Alguns estudos sugerem que a melatonina possui efeitos diferentes na vasculatura, dependendo do tipo de receptor específico que foi ativado, com vasoconstrição ocorrendo após a ativação do receptor MT1 e vasodilatação após a ativação do receptor MT2 [161,167]. Alguns mecanismos mediados pelo receptor MT1 podem proteger contra a

inflamação dos vasos e a subsequente rigidez arterial, além de processos patogênicos que modulam a transdução de sinal através de terminações nervosas simpáticas [162].

Por fim, os grupos de receptores ROR/RZR são distribuídos de acordo com seu subtipo: ROR é expresso em níveis particularmente altos em linfócitos T, linfócitos B, neutrófilos e monócitos, enquanto RZR é encontrado no cérebro e glândula pineal, intermediando a ação de enzimas antioxidantes. Através da sua membrana e de receptores nucleares, a melatonina exerce efeitos generalizados sobre a secreção de mediadores endócrinos e, direta ou indiretamente, influencia o sistema do ritmo circadiano [162].

2.6.2.4. Melatonina e estresse oxidativo

O desequilíbrio entre a produção de ROS, espécies reativas de nitrogênio e a utilização ineficiente de oxigênio molecular pelas células levam ao estresse oxidativo. As ROS incluem o radical ânion O^{2-} , radical hidroxila, H_2O_2 e o oxigênio singlete, que são gerados como subprodutos da respiração celular e de outras condições fisiológicas, que incluem o envelhecimento, a inflamação, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas danificando componentes celulares, os quais incluem DNA/RNA, proteínas e os lipídios [13,144].

Algumas substâncias podem detoxificar radicais livres ou substâncias associadas, como a melatonina, protegendo contra o estresse oxidativo nas células. As ações antioxidantes da melatonina são observadas em diferentes níveis incluindo atenuação na formação de radicais livres, indução da expressão de enzimas antioxidantes e redução da ativação de enzimas pró-oxidantes [168].

Enquanto a ação direta da melatonina em sequestrar radicais livres é independente de receptores, a função antioxidante indireta pode ser mediada por receptores, localizados

nas membranas das células ou dentro dos núcleos. A melatonina é uma substância altamente lipofílica e também solúvel em meio aquoso, podendo entrar facilmente e distribuir-se amplamente em todas as células e compartimentos subcelulares em maiores concentrações, além de, possivelmente, estar presente nos núcleos celulares e nas mitocôndrias pela capacidade de atravessar as barreiras morfofuncionais [169].

A eficiência da melatonina em neutralizar o radical ânion O^{2-} dá-se pelo sequestro desse reagente em um sistema químico puro, e também é auxiliada pela evidência de que a melatonina reduz sutilmente o sinal de ressonância de rotação eletrônica utilizando o aduto 5,5 dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) como capturador de espécies radicais (*spin trap*). Recentemente, tem-se documentado que o precursor imediato de ânion hidroxila (OH^{\cdot}), o H_2O_2 , também é eliminado pela melatonina, que é apenas um agente fraco de oxidação e redução e não tem carga elétrica [170].

A melatonina também suprime a formação do oxigênio singlete, após a auto-oxidação da riboflavina pela exposição à luz, que é formada em células pela reação de fotossensibilização de substratos, como corantes e pigmentos biológicos. Além disso, a melatonina desintoxica o monóxido de nitrogênio e o ânion peroxinitrito atuando como um importante antioxidante [169].

2.6.2.5. Principais funções da melatonina

A melatonina reduz a geração de ROS, por ser um potente sequestrador de ROS, assim como de radicais hidroxila, radicais peróxido, ânion O^{2-} e H_2O_2 [162]. Além disso, a melatonina também atua como um antioxidante indireto devido a sua habilidade de estimular a síntese e, conseqüentemente, melhorar os níveis de enzimas antioxidantes,

tais como a superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase e catalase (CAT), enquanto aumenta os níveis de GSH e reduzir os de enzimas pró-oxidantes [171,172].

Apesar dos numerosos relatos da atividade anti-inflamatória da melatonina e de seus metabólitos, a informação sobre os mecanismos que determinam essa atividade ainda não está bem definida [14]. Sabe-se que a melatonina também desempenha um papel importante como modulador de um grande número de citocinas pró-inflamatórias e reduz os efeitos mediados pela prostaglandina e, em particular, os efeitos exercidos pela ciclo-oxigenase-2 [173].

Mayo et al. demonstraram que a melatonina inibiu o aumento da expressão da proteína ciclo-oxigenase-2 em um modelo de macrófagos estimulado por LPS bacteriano [174]. Uma vez que os radicais livres estão envolvidos no processo inflamatório, a melatonina é um bom candidato como agente anti-inflamatório, o que complementa suas ações antioxidantes e de eliminação de radicais livres [169].

Em doenças inflamatórias, tais como a aterosclerose, a ciclofilina A atua como uma citocina pró-inflamatória e ativa células endoteliais e células da musculatura lisa vascular (CMLV) para produzir mediadores inflamatórios, como as selectinas e moléculas de adesão [175], levando à formação de placa aterosclerótica. Em pesquisas recentes, foi demonstrado em camundongos deficientes de apolipoproteína E tratados com melatonina a inibição da expressão de ciclofilina A, além da modulação das moléculas de adesão celular e também redução na expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, migração de CMLV, estresse oxidativo e redução no extravasamento de células inflamatórias [176].

A melatonina provoca efeitos pró e anti-inflamatórios dependendo do estado celular. Os efeitos cito-protetores da melatonina envolvem várias vias e moléculas proeminentes associadas à inflamação, tais como o fator nuclear NF- κ B, TLR, MAPK,

mediadores inflamatórios da via do ácido araquidônico incluindo ciclooxygenase e lipoxigenase, RNAs não codificantes e metaloproteinases de matriz. Aparentemente, a sinalização de NF-κB é central para todas essas vias relacionadas à inflamação e, mais importante, os amplos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da melatonina eventualmente podem bloquear a via de sinalização NF-κB. O NF-κB é um fator de transcrição onipresente sensível ao estresse oxidativo, o qual possui papel primário na sobrevivência celular e nas respostas imunes e anti-inflamatórias [177].

A melatonina protege contra várias comorbidades e concomitantemente contra o dano mediado por radicais livres de oxigênio ou oxiradicais, inflamação, doença microvascular e risco aterotrombótico. Além disso, a melatonina é uma substância com perfil altamente seguro, baixa toxicidade e geralmente é muito bem tolerada em doses muito altas, diferindo assim de diversos produtos farmacêuticos mais comumente utilizados [178].

A apoptose é o resultado de diversas atividades biológicas e tem sido associada ao estresse oxidativo e ao desequilíbrio entre a geração de oxidantes, como a produção de ROS, e mecanismos de defesa antioxidante [171]. Kaur et al. relataram que o tratamento com a melatonina reduziu a apoptose de oligodendrócitos, degeneração de axônios e o dano vascular endotelial na massa branca no cérebro de ratos neonatais após uma lesão por hipóxia [15].

Um mecanismo molecular capaz de explicar a atividade anti-apoptótica da melatonina poderia ser a capacidade da melatonina de preservar os níveis de cardiolipina mitocondrial, pela capacidade de manter a homeostase mitocondrial, uma vez que as características bioquímicas e a estrutura da função protetora dependente de cardiolipina foram relatadas em mitocôndrias expostas isoladamente ao H₂O₂ [179]. Conseqüentemente, a melatonina pode interferir nas vias celulares apoptóticas em

diferentes níveis, prevenindo a morte celular por apoptose e, eventualmente, levando à proteção de células contra a disfunção mitocondrial [171].

O uso de antioxidantes, especialmente a melatonina, contribui para a prevenção e controle da fibrose, consequência do desenvolvimento do excesso de tecido conectivo, o qual está associado com infecção, inflamação e estresse oxidativo [180,181]. A expressão exacerbada dos receptores de melatonina é encontrada em fibroblastos no tecido humano com cicatrização hipertrófica, mas não na pele normal, sugerindo que a melatonina regula a formação de cicatriz e a fibrose [182].

Em geral, a melatonina possui uma ação protetora contra fibrose que envolve todos os órgãos e a sua deficiência causa defeitos na formação óssea e favorece o excesso da formação de fibrose tecidual [16]. Como um benefício das ações anti-fibróticas, a melatonina reduz a lesão nas células epiteliais, incluindo alterações apoptóticas e necróticas e infiltração de células inflamatórias, além de atenuar a ativação e proliferação de células efectoras fibrogênicas, redução dos marcadores fibróticos, especialmente TGF- β , bem como o estresse oxidativo e a reação inflamatória, reduzindo assim a deposição de matriz extracelular, incluindo glicosaminoglicanos e colágeno [182].

Sendo assim, a capacidade de melatonina para limitar a fibrose é atribuída à inibição do estresse oxidativo e da sinalização inflamatória. Em algumas situações, a fibrose é necessária e benéfica para a cicatrização de feridas, e a melatonina promove esse processo, porém os efeitos anti-fibróticos da melatonina podem variar com o curso do tratamento. O restabelecimento do ciclo claro/escuro e do ritmo circadiano para aumentar os níveis de melatonina pode ser uma abordagem terapêutica não invasiva benéfica para a fibrose e a proteção da fisiologia dos órgãos [182].

2.6.2.6. Melatonina e outras funções

Sabe-se que a ação benéfica da melatonina se deve à propriedade de sequestrar radicais livres e à ativação das enzimas de defesa antioxidante, normalizando o perfil lipídico e a pressão arterial, e aumentando a biodisponibilidade do óxido nítrico. A melatonina apresenta diversas funções que são protetoras do endotélio, por exemplo, proteção contra o dano endotelial, a vasoconstrição, a agregação plaquetária e a infiltração de leucócitos, contribuindo para os efeitos benéficos contra a lesão por isquemia e reperfusão [165].

Em mamíferos, a melatonina representa o sinal biológico da escuridão, pois a sua liberação é proporcional à duração da noite. Atua como regulador do sono, e inibe a liberação de dopamina no hipotálamo e na retina. Está envolvida no processo de envelhecimento e desenvolvimento da puberdade, controle de pressão arterial, eliminação de radicais livres e também regulação da resposta imune [165].

Estudos recentes documentaram que alguns dos efeitos antioxidantes da melatonina são, na verdade, devido aos seus metabólitos, que são gerados quando a melatonina interage com os radicais livres. Além disso, a capacidade de melatonina para inibir enzimas pró-oxidantes é mediada por um metabólito terciário de melatonina, o N1-acetil-N2-formil-5-metoxicinuramina. A capacidade da molécula precursora, a melatonina, bem como de seus metabólitos, atua na desintoxicação radical, aumentando sua capacidade de limitar ações oxidantes em diversos níveis dentro das células [169].

A melatonina também possui propriedades cardioprotetoras através de sua ação direta de eliminar radicais livres e sua atividade antioxidante indireta, juntamente com suas propriedades anti-inflamatórias [161,169]. Essa indolamina pode também regular a pressão arterial e possui importante efeito anti-aterogênico [169,176]. Além disso, a

melatonina atenua a fibrose cardíaca ao reduzir a expressão do mRNA de genes associados à hipertrofia cardíaca, como o fator de crescimento tumoral- β (TGF- β) e suprime a ativação transcricional do NF- κ B na hipóxia em ratos isquêmicos [183].

Em resumo, a melatonina é uma neuroindolamina que apresenta importantes propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-apoptóticas e anti-fibróticas, podendo além de controlar distúrbios do sono, proteger o organismo contra diversas doenças como as doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e outras associadas ao processo de envelhecimento. Existem muitos estudos sobre os efeitos da melatonina nessas condições, mas ainda não foram descritos os efeitos específicos da melatonina em doenças autoimunes como a nefrite lúpica, o que precisa ser investigado em modelos animais e também em estudos clínicos.

3. Marco Conceitual

O LES é uma doença que apresenta diversas manifestações clínicas e afeta múltiplos órgãos, uma das manifestações mais graves é a NL, sendo relacionados a alterações no sistema imune. A presente pesquisa avaliou novas terapias com o uso de substâncias naturais levando em consideração que o desenvolvimento do LES tem relação direta com estresse oxidativo e com uma intensa reação pró-inflamatória do sistema imune contra células de defesa do organismo. Nesse contexto, buscou-se avaliar o efeito protetor dessas substâncias na expressão de enzimas antioxidantes e nas alterações teciduais associadas com inflamação, apoptose e fibrose renal.

A pesquisa de novas terapias do LES e de suas manifestações sistêmicas tem potencial de induzir o controle da doença e também reduzir os efeitos colaterais causados pela terapia farmacológica convencional. É notável o papel dos antioxidantes alimentares, como polifenóis, flavonóides e melatonina incluídos na dieta através de vegetais, frutas, cereais, vegetais e bebidas como o chá e vinho. Crescentes evidências mostram que a ingestão de diferentes nutrientes apresenta efeitos benéficos derivados de suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras.

A figura 1 representa esquematicamente o marco conceitual do estudo. Esse esquema foi elaborado com o objetivo de apresentar a base teórica que sustenta a investigação da pesquisa, utilizando o modelo experimental de camundongos induzidos com pristano.

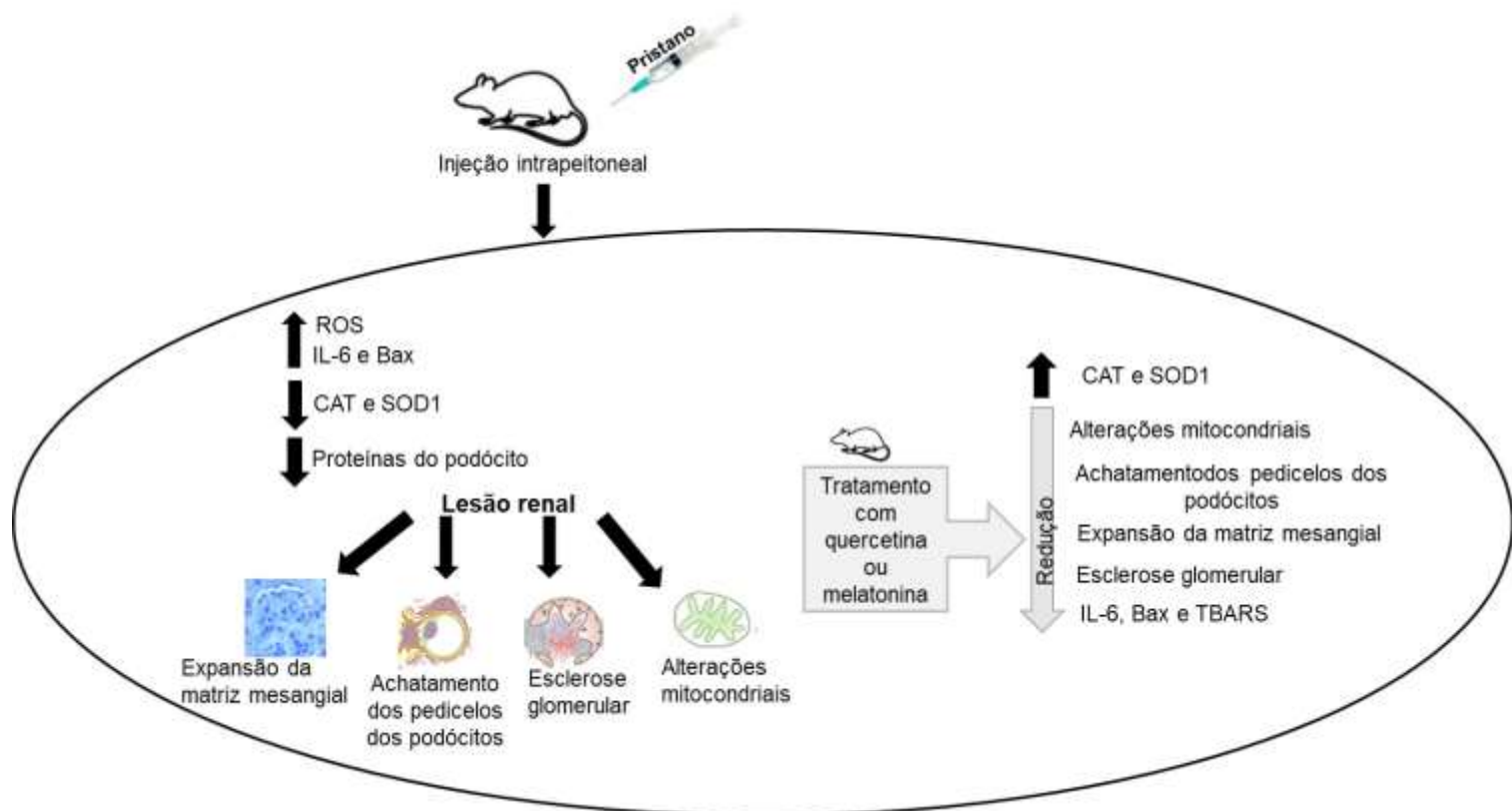


Figura 3. Mapa conceitual do estudo.

4. Justificativa

A nefrite lúpica (NL) é uma doença que acomete cerca de 50% dos pacientes portadores de LES, e dependendo da gravidade da lesão o paciente pode evoluir para insuficiência renal crônica terminal e necessidade de diálise ou transplante, gerando custos elevados para o sistema de saúde no Brasil. O modelo animal de LES é um experimento que reproduz a doença em humanos, induzindo uma variedade de auto-anticorpos, alterações laboratoriais e histopatológicas características da nefrite lúpica na sua forma proliferativa.

O uso desse modelo experimental pode permitir uma melhor compreensão da fisiopatologia do LES, apontando possíveis novas terapias para a nefrite, uma vez que os tratamentos com essas substâncias - a quercetina e a melatonina - mostraram eficácia em modelos experimentais de outras doenças, inclusive outras nefropatias como a nefropatia diabética.

Esse estudo se justifica pela necessidade de aprofundar a investigação do efeito nefroprotetor, antioxidante, anti-inflamatório, anti-fibrótico e anti-apoptótico da quercetina e da melatonina sobre o tecido renal lesado. Agregamos a essa pesquisa a investigação da injúria da célula epitelial podocitária do glomérulo renal, através do estudo da expressão das proteínas do podócito em nível molecular e da ultraestrutura nesse modelo experimental, avaliando o potencial efeito de recuperação da estrutura do podócito induzido por quercetina.

5. Objetivos

5.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos protetores do tratamento com quercetina e melatonina no tecido renal do modelo animal de nefrite lúpica induzido por pristano.

5.2. Objetivos Específicos

- Analisar alterações morfológicas renais usando a coloração de hematoxilina-eosina (HE) e do ácido periódico de Schiff (PAS);
- Quantificar a fibrose no tecido renal através do método de Sirius Red;
- Realizar avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão de organelas citoplasmáticas (mitocôndrias), do mesângio, da membrana basal e dos podócitos glomerulares;
- Detectar a expressão de marcadores específicos de apoptose, como o Bax no tecido renal por imunofluorescência;
- Detectar a expressão de antioxidantes endógenos (como catalase e superóxido dismutase), no tecido renal por imunofluorescência;
- Quantificar os produtos de aldeídos gerados pela peroxidação lipídica no tecido renal através da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Detectar a expressão do marcador relacionado à fibrose (TGF- β_1), no tecido renal por imunofluorescência;
- Avaliar alterações moleculares no tecido renal de proteínas associadas ao podócito por PCR em tempo real nos camundongos tratados com quercetina.

6. Referências

- [1] D’Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic Lupus Erythematosus. *Lancet Core Clin Collect* 2007;369:587–96. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60279-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60279-7).
- [2] Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2011;365:2110–21. doi:[10.1056/NEJMra1100359](https://doi.org/10.1056/NEJMra1100359).
- [3] Liu Z, Davidson A. Taming lupus—a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nat Med* 2012;18:871–82. doi:[10.1038/nm.2752](https://doi.org/10.1038/nm.2752).
- [4] Wong CK, Ho CY, Li EK, Lam CW. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000;9:589–93.
- [5] Borchers AT, Leibusor N, Naguwa SM, Cheema GS, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Lupus nephritis: a critical review. *Autoimmun Rev* 2012;12:174–94. doi:[10.1016/j.autrev.2012.08.018](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.08.018).
- [6] Cameron JS. Lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:413–424.
- [7] Suwannaroj S, Lagoo A, Keisler D, McMurray R. Antioxidants suppress mortality in the female NZB×NZW F1 mouse model of systemic lupus erythematosus (SLE). *Lupus* 2001;10:253–7. doi:[10.1191/096120301680416940](https://doi.org/10.1191/096120301680416940).
- [8] Zhou L-LL, Wei W, Si J-FF, Yuan D-PP. Regulatory effect of melatonin on cytokine disturbances in the pristane-induced lupus mice. *Mediators Inflamm* 2010;2010. doi:[10.1155/2010/951210](https://doi.org/10.1155/2010/951210).
- [9] Zhai JX, Zhang ZX, Feng YJ, Ding SS, Wang XH, Zou LW, et al. PDTC attenuate LPS-induced kidney injury in systemic lupus erythematosus-prone MRL/lpr Mice. *Mol Biol Rep* 2012;39:6763–71. doi:[10.1007/s11033-012-1501-7](https://doi.org/10.1007/s11033-012-1501-7).
- [10] Mcgaha TL, Madaio MP, Ana H. Animal models of renal disease Lupus nephritis : animal modeling of a complex disease syndrome pathology. *Drug Discov Today Dis Model* 2014;11:13–8. doi:[10.1016/j.ddmod.2014.08.002](https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2014.08.002).

- [11] Li W, Titov AA, Morel L. An update on lupus animal models. *Curr Opin Rheumatol* 2017. doi:10.1097/BOR.0000000000000412.
- [12] Anand David AV, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacogn Rev* 2016;10:84–9. doi:10.4103/0973-7847.194044.
- [13] Kozina LS, Arutjunyan A V, Khavinson VK. Antioxidant properties of geroprotective peptides of the pineal gland. *Arch Gerontol Geriatr* 2007;44 Suppl 1:213–6. doi:10.1016/j.archger.2007.01.029.
- [14] Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res* 2013;54:1–14. doi:10.1111/j.1600-079X.2012.01014.x.
- [15] Kaur C, Sivakumar V, Ling EA. Melatonin protects periventricular white matter from damage due to hypoxia. *J Pineal Res* 2010;48:185–93. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00740.x.
- [16] Abdel-Wanis ME, Kawahara N. The role of neurofibromin and melatonin in pathogenesis of pseudarthrosis after spinal fusion for neurofibromatous scoliosis. *Med Hypotheses* 2002;58:395–8. doi:10.1054/mehy.2001.1467.
- [17] Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Morbidity and Mortality in Systemic Lupus Erythematosus During a 10-Year Period. *Medicine (Baltimore)* 2003;82:299–308. doi:10.1097/01.md.0000091181.93122.55.
- [18] Borba EF, Araujo DB, Bonfá E, Shinjo SK. Clinical and immunological features of 888 Brazilian systemic lupus patients from a monocentric cohort: comparison with other populations. *Lupus* 2013;22:744–9. doi:10.1177/0961203313490432.
- [19] Hopkinson ND, Doherty M, Powell RJ. Clinical features and race-specific incidence/prevalence rates of systemic lupus erythematosus in a geographically complete cohort of patients. *Ann Rheum Dis* 1994;53:675–80.
- [20] Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA. The prevalence and incidence of

- systemic lupus erythematosus in Birmingham, England: Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum* 1995;38:551–8. doi:10.1002/art.1780380415.
- [21] Lim SS, Bayakly AR, Helmick CG, Gordon C, Easley KA, Drenkard C. The Incidence and Prevalence of Systemic Lupus Erythematosus, 2002-2004: The Georgia Lupus Registry. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:357–68. doi:10.1002/art.38239.
- [22] Pons-Estel B a, Catoggio LJ, Cardiel MH, Soriano ER, Gentiletti S, Villa AR, et al. The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: ethnic and disease heterogeneity among “Hispanics”. *Medicine (Baltimore)* 2004;83:1–17. doi:10.1097/01.md.0000104742.42401.e2.
- [23] Lewis MJ, Jawad AS. The effect of ethnicity and genetic ancestry on the epidemiology, clinical features and outcome of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2016;kew399. doi:10.1093/rheumatology/kew399.
- [24] Cervera R, Abarca-Costalago M, Abramovicz D, Allegri F, Annunziata P, Aydintug AO, et al. Systemic lupus erythematosus in Europe at the change of the millennium: Lessons from the “Euro-Lupus Project.” *Autoimmun Rev* 2006;5:180–6. doi:10.1016/j.autrev.2005.06.004.
- [25] Petri M. Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008;17:412–5. doi:10.1177/0961203308090026.
- [26] Larosa M, Iaccarino L, Gatto M, Punzi L, Doria A. Advances in the diagnosis and classification of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol* 2016;12:1309–20. doi:10.1080/1744666X.2016.1206470.
- [27] Yu C, Gershwin ME, Chang C. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: A critical review. *J Autoimmun* 2014;48–49:10–3. doi:10.1016/j.jaut.2014.01.004.
- [28] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, Mcshane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271–7. doi:10.1002/art.1780251101.

- [29] Petri M, Orbai A-M, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2012;64:2677–86. doi:10.1002/art.34473.
- [30] Crispín JC, Liossis SN, Kis-Toth K, Lieberman LA, Kytтары VC, Juang YT, et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med* 2010;16:47–57. doi:10.1016/j.molmed.2009.12.005.
- [31] Nowling TK, Gilkeson GS. Mechanisms of tissue injury in lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2011;13:250. doi:10.1186/ar3528.
- [32] Gualtierotti R, Biggioggero M, Penatti AE, Meroni PL. Updating on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2010;10:3–7. doi:10.1016/j.autrev.2010.09.007.
- [33] Byrne JC, Gabhann JN, Lazzari E, Mahony R. Genetics of SLE: Functional Relevance for Monocytes/Macrophages in Disease. *Clin Dev Immunol* 2012;15. doi:10.1155/2012/582352.
- [34] Moulton VR, Tsokos GC. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2011;13:207. doi:10.1186/ar3251.
- [35] Perl A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:674–86. doi:10.1038/nrrheum.2013.147.
- [36] Gergely P, Grossman C, Niland B, Puskas F, Neupane H, Allam F, et al. Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002;46:175–90. doi:10.1002/1529-0131(200201)46:1<175::AID-ART10015>3.0.CO;2-H.
- [37] Lai Z-W, Hanczko R, Bonilla E, Caza TN, Clair B, Bartos A, et al. N-acetylcysteine reduces disease activity by blocking mammalian target of rapamycin in T cells from systemic lupus erythematosus patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2012;64:2937–46. doi:10.1002/art.34502.

- [38] Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003;56:481–90.
- [39] Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone M V., Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349:1526–33. doi:10.1056/NEJMoa021933.
- [40] Korbet SM, Schwartz MM, Evans J, Lewis EJ, Collaborative Study Group. Severe Lupus Nephritis: Racial Differences in Presentation and Outcome. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:244–54. doi:10.1681/ASN.2006090992.
- [41] Almaani S, Meara A, Rovin BH. Update on Lupus Nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016;8:25–35. doi:10.2215/CJN.05780616.
- [42] Azoică T, Belibou IM, Lozneanu L, Giușcă SE, Cojocaru E, Căruntu ID. Large variability of the activity and chronicity indexes within and between histological classes of lupus nephritis. *Rom J Morphol Embryol* 2017;58:73–8.
- [43] Ambrose N, Morgan TA, Galloway J, Ionnoau Y, Beresford MW, Isenberg DA, et al. Differences in disease phenotype and severity in SLE across age groups. *Lupus* 2016;25:1542–50. doi:10.1177/0961203316644333.
- [44] Sardeto GA, Simas LM, Skare TS, Nisihara RM, Utiyama SRR. Antinucleosome in systemic lupus erythematosus. A study in a Brazilian population. *Clin Rheumatol* 2012;31:553–6. doi:10.1007/s10067-011-1889-9.
- [45] Bruner BF, Guthridge JM, Lu R, Vidal G, Kelly JA, Robertson JM, et al. Comparison of autoantibody specificities between traditional and bead-based assays in a large, diverse collection of patients with systemic lupus erythematosus and family members. *Arthritis Rheum* 2012;64:3677–86. doi:10.1002/art.34651.
- [46] Björk M, Dahlström Ö, Wetterö J, Sjöwall C. Quality of life and acquired organ damage are intimately related to activity limitations in patients with systemic lupus erythematosus. *BMC Musculoskelet Disord* 2015;16:188. doi:10.1186/s12891-015-0621-3.
- [47] Szekanecz Z, Shoenfeld Y. Lupus and cardiovascular disease: the facts. *Lupus* 2006;15:3–10. doi:10.1177/0961203306071665.

- [48] Vila LM, Mayor AM, Valentin AH, Garcia-Soberal M, Vila S. Clinical and immunological manifestations in 134 Puerto Rican patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1999;8:279–86. doi:10.1191/096120399678847803.
- [49] González L a, Toloza SM a, McGwin G, Alarcón GS. Ethnicity in systemic lupus erythematosus (SLE): its influence on susceptibility and outcomes. *Lupus* 2013;22:1214–24. doi:10.1177/0961203313502571.
- [50] Hopkinson ND, Jenkinson C, Muir KR, Doherty M, Powell RJ. Racial group, socioeconomic status, and the development of persistent proteinuria in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2000;59:116–9.
- [51] Alba P, Bento L, Cuadrado MJ, Karim Y, Tungekar MF, Abbs I, et al. Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:556–60.
- [52] Hanly JG, O’Keeffe AG, Su L, Urowitz MB, Romero-Diaz J, Gordon C, et al. The frequency and outcome of lupus nephritis: results from an international inception cohort study. *Rheumatology (Oxford)* 2016;55:252–62. doi:10.1093/rheumatology/kev311.
- [53] Sánchez E, Rasmussen A, Riba L, Acevedo-Vasquez E, Kelly JA, Langefeld CD, et al. Impact of genetic ancestry and sociodemographic status on the clinical expression of systemic lupus erythematosus in American Indian-European populations. *Arthritis Rheum* 2012;64:3687–94. doi:10.1002/art.34650.
- [54] Contreras G, Lenz O, Pardo V, Borja E, Cely C, Iqbal K, et al. Outcomes in African Americans and Hispanics with lupus nephritis. *Kidney Int* 2006;69:1846–51. doi:10.1038/sj.ki.5000243.
- [55] Contreras G, Li H, Gonzalez-Suarez M, Isakova T, Scialla JJ, Pedraza F, et al. Kidney allograft survival of African American and Caucasian American recipients with lupus. *Lupus* 2014;23:151–8. doi:10.1177/0961203313513819.
- [56] Zhang Y, Wu J, Han Y, Shi Z, Wang L. Pathogenesis of cutaneous lupus erythema associated with and without systemic lupus erythema. *Autoimmun Rev* 2017. doi:10.1016/j.autrev.2017.05.009.

- [57] Ceccarelli F, Perricone C, Cipriano E, Massaro L, Natalucci F, Capalbo G, et al. Joint involvement in systemic lupus erythematosus: From pathogenesis to clinical assessment 2017. doi:10.1016/j.semarthrit.2017.03.022.
- [58] Ahuja J, Arora D, Kanne JP, Henry TS, Godwin JD. Imaging of Pulmonary Manifestations of Connective Tissue Diseases. *Radiol Clin North Am* 2016;54:1015–31. doi:10.1016/j.rcl.2016.05.005.
- [59] Nay J, Menias CO, Mellnick VM, Balfe DM. Gastrointestinal manifestations of systemic disease: a multimodality review. *Abdom Imaging* 2015;40:1926–43. doi:10.1007/s00261-014-0334-3.
- [60] Faria R, Gonçalves J, Dias R. Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus Involvement: Towards a Tailored Approach to Our Patients? *Rambam Maimonides Med J* 2017;8:e0001. doi:10.5041/RMMJ.10276.
- [61] Fors Nieves CE, Izmirly PM. Mortality in Systemic Lupus Erythematosus: an Updated Review. *Curr Rheumatol Rep* 2016;18:1–7. doi:10.1007/s11926-016-0571-2.
- [62] Hersh AO, Trupin L, Yazdany J, Panopalis P, Julian L, Katz P, et al. Childhood-onset disease as a predictor of mortality in an adult cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010;62:1152–9. doi:10.1002/acr.20179.
- [63] Yung S, Chan TM. Mechanisms of kidney injury in lupus nephritis - the role of anti-dsDNA antibodies. *Front Immunol* 2015;6:1–11. doi:10.3389/fimmu.2015.00475.
- [64] Lewis EJ, Schwartz MM. Pathology of lupus nephritis. *Lupus* 2005;14:31–8.
- [65] Desai N, Cimbaluk D, Lewis EJ, Whittier WL. Proteinuria in membranous lupus nephritis: the pathology is in the podocyte. *Lupus* 2013;22:461–8. doi:10.1177/0961203313477225.
- [66] Wang G, Lai FMM, Tam LS, Li KTMKTPM, Lai KB, Chow KM, et al. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in urinary sediment of patients with lupus nephritis. *J Rheumatol* 2007;34:2358–64. doi:10.1159/000104428.

- [67] Santos M, Bringhenti RN, Rodrigues PG, Nascimento JF, Sane V, Dos Santos M, et al. Podocyte-associated mRNA profiles in kidney tissue and in urine of patients with active lupus nephritis. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:4600–13.
- [68] Lech M, Anders H-J. The pathogenesis of lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:1357–66. doi:10.1681/ASN.2013010026.
- [69] Song D, Wu L-H, Wang F-M, Yang X-W, Zhu D, Chen M, et al. The spectrum of renal thrombotic microangiopathy in lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2013;15. doi:10.1186/ar4142.
- [70] Chaudhury AR, Rajarajan T, Yousuf R, Fernando E, Kurien AA. Lupus podocytopathy: An important differential diagnosis of nephrotic syndrome in systemic lupus erythematosus. *Indian J Nephrol* 2016;26:284–7. doi:10.4103/0971-4065.169566.
- [71] Mok CC. Prognostic factors in lupus nephritis. *Lupus* 2005;14:39–44. doi:10.1191/0961203305lu2057oa.
- [72] Burgos PI, McGwin G, Pons-Estel GJ, Reveille JD, Alarcon GS, Vila LM. US patients of Hispanic and African ancestry develop lupus nephritis early in the disease course: data from LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA LXXIV). *Ann Rheum Dis* 2011;70:393–4. doi:10.1136/ard.2010.131482.
- [73] Huong DL, Papo T, Beaufile H, Wechsler B, Blétry O, Baumelou A, et al. Renal involvement in systemic lupus erythematosus. A study of 180 patients from a single center. *Medicine (Baltimore)* 1999;78:148–66.
- [74] Burgos PI, Perkins EL, Pons-Estel GJ, Kendrick SA, Liu JM, Kendrick WT, et al. Risk factors and impact of recurrent lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus undergoing renal transplantation: Data from a single US institution. *Arthritis Rheum* 2009;60:2757–66. doi:10.1002/art.24776.
- [75] Barr RG, Seliger S, Appel GB, Zuniga R, D’Agati V, Salmon J, et al. Prognosis in proliferative lupus nephritis: The role of socio-economic status and race/ethnicity. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2039–46. doi:10.1093/ndt/gfg345.
- [76] Das M, Medeiros C, Bezerra MC, Holanda F, Braga F, Da M, et al. Clinical and

- immunological aspects and outcome of a Brazilian cohort of 414 patients with systemic lupus erythematosus (SLE): comparison between childhood-onset, adult-onset, and late-onset SLE. *Lupus* 2016;25:355–63. doi:10.1177/0961203315606983.
- [77] Weening JJ, D’Agati VD, Schwartz MM, Seshan S V, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int* 2004;65:521–30. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00443.x.
- [78] Rezende G, Viana V, Malheiros D, Borba E, Silva N, Silva C, et al. Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis: distinct underlying mechanisms of proteinuria? *Lupus* 2014;23:255–62. doi:10.1177/0961203313517152.
- [79] Kraft SW, Schwartz MM, Korbet SM, Lewis EJ. Glomerular Podocytopathy in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:175–9. doi:10.1681/ASN.2004050350.
- [80] Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol* 2012;74:299–323. doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153238.
- [81] Barisoni L, Mundel P. Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *Am J Nephrol* 2003;23:353–60. doi:72917.
- [82] Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 2003;111:707–16. doi:10.1172/JCI17423.
- [83] Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases—insights from animal models. *Kidney Int* 2005;67:404–19. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.67097.x.
- [84] Mjelle JE, Rekvig OP, Van Der Vlag J, Fenton KA. Nephritogenic antibodies bind in glomeruli through interaction with exposed chromatin fragments and not with renal cross-reactive antigens. *Autoimmunity* 2011;44:373–83. doi:10.3109/08916934.2010.541170.
- [85] Perysinaki GS, Moysiadis DK, Bertias G, Giannopoulou I, Kyriacou K,

- Nakopoulou L, et al. Podocyte main slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology. *Lupus* 2011;20:781–91. doi:10.1177/0961203310397412.
- [86] Bollain-Y-Goytia JJ, González-Castañeda M, Torres-Del-Muro F, Daza-Benitez L, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C, et al. Increased excretion of urinary podocytes in lupus nephritis. *Indian J Nephrol* 2011;21:166–71. doi:10.4103/0971-4065.83029.
- [87] Aparicio-Soto M, Sánchez-Hidalgo M, Alarcón-de-la-Lastra C. An update on diet and nutritional factors in systemic lupus erythematosus management. *Nutr Res Rev* 2017;30:118–37. doi:10.1017/S0954422417000026.
- [88] Trotter K, Clark MR, Liarski VM. Overview of pathophysiology and treatment of human lupus nephritis. *Curr Opin Rheumatol* 2016;28:460–7. doi:10.1097/BOR.0000000000000319.
- [89] Kuhn A, Bonsmann G, Anders H-J, Herzer P, Tenbrock K, Schneider M. The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Dtsch Arztebl Int* 2015;112:423–32. doi:10.3238/arztebl.2015.0423.
- [90] Appel GB, Contreras G, Dooley MA, Ginzler EM, Isenberg D, Jayne D, et al. Mycophenolate mofetil versus cyclophosphamide for induction treatment of lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1103–12. doi:10.1681/ASN.2008101028.
- [91] Dall’Era M. Treatment of lupus nephritis. *Curr Opin Rheumatol* 2017;29:241–7. doi:10.1097/BOR.0000000000000381.
- [92] Kaballo B, Ahmed A, Nur M, Khalid I, Abu-Aisha H. Mycophenolate mofetil versus azathioprine for maintenance treatment of lupus nephritis. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 2016;27:717. doi:10.4103/1319-2442.185233.
- [93] Liu Z, Zhang H, Liu Z, Xing C, Fu P, Ni Z, et al. Multitarget Therapy for Induction Treatment of Lupus Nephritis. *Ann Intern Med* 2015;162:18. doi:10.7326/M14-1030.
- [94] Hui-Yuen JS, Reddy A, Taylor J, Li X, Eichenfield AH, Bermudez LM, et al. Safety and Efficacy of Belimumab to Treat Systemic Lupus Erythematosus in

- Academic Clinical Practices. *J Rheumatol* 2015;42:2288–95. doi:10.3899/jrheum.150470.
- [95] Scheinberg MA, Hislop CM, Martin RS. Blisibimod for treatment of systemic lupus erythematosus: with trials you become wiser. *Expert Opin Biol Ther* 2016;16:723–33. doi:10.1517/14712598.2016.1169270.
- [96] Isenberg DA, Petri M, Kalunian K, Tanaka Y, Urowitz MB, Hoffman RW, et al. Efficacy and safety of subcutaneous tabalumab in patients with systemic lupus erythematosus: results from ILLUMINATE-1, a 52-week, phase III, multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Rheum Dis* 2016;75:323–31. doi:10.1136/annrheumdis-2015-207653.
- [97] Kovacic P, Jacintho JD. Systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases from endogenous and exogenous agents: unifying theme of oxidative stress. *Mini Rev Med Chem* 2003;3:568–75.
- [98] Nath KA, Fischereder M, Hostetter TH. The role of oxidants in progressive renal injury. *Kidney Int Suppl* 1994;45:S111-5.
- [99] Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci* 2014;21:23. doi:10.1186/1423-0127-21-23.
- [100] Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest* 1990;62:670–9.
- [101] Cooke MS, Mistry N, Wood C, Herbert KE, Lunec J. Immunogenicity of DNA damaged by reactive oxygen species--implications for anti-DNA antibodies in lupus. *Free Radic Biol Med* 1997;22:151–9.
- [102] Poli G, Parola M. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 1997;22:287–305.
- [103] Wang H, Qian J, Zhao X, Xing C, Sun B. β -Aminoisobutyric acid ameliorates the renal fibrosis in mouse obstructed kidneys via inhibition of renal fibroblast activation and fibrosis. *J Pharmacol Sci* 2017;133:203–13. doi:10.1016/j.jphs.2016.12.005.

- [104] Houglum K, Brenner DA, Chojkier M. d-alpha-tocopherol inhibits collagen alpha 1(I) gene expression in cultured human fibroblasts. Modulation of constitutive collagen gene expression by lipid peroxidation. *J Clin Invest* 1991;87:2230–5. doi:10.1172/JCI115258.
- [105] Ricardo SD, Ding G, Eufemio M, Diamond JR. Antioxidant expression in experimental hydronephrosis: role of mechanical stretch and growth factors. *Am J Physiol* 1997;272:F789-98.
- [106] Grande JP. Mechanisms of progression of renal damage in lupus nephritis: pathogenesis of renal scarring. *Lupus* 1998;7:604–10. doi:10.1191/096120398678920721.
- [107] Li M, Gao W, Ma J, Zhu Y, Li X. Early-stage lupus nephritis treated with N-acetylcysteine: A report of two cases. *Exp Ther Med* 2015;10:689–92. doi:10.3892/etm.2015.2510.
- [108] Jimenez-Caliani AJ, Jimenez-Jorge S, Molinero P, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Rubio A, et al. Sex-dependent effect of melatonin on systemic erythematosus lupus developed in Mrl/Mpj-Faslpr mice: it ameliorates the disease course in females, whereas it exacerbates it in males. *Endocrinology* 2006;147:1717–24. doi:10.1210/en.2005-0648.
- [109] HELYER BJ, HOWIE JB. Renal disease associated with positive lupus erythematosus tests in a cross-bred strain of mice. *Nature* 1963;197:197.
- [110] Murphy ED, Roths JB. A single gene model for massive lymphoproliferation with immune complex disease in a new mouse strain MRL. 16th Int. Congr. Hematol., vol. 69, Amsterdam: Excerpta Medica; 1976.
- [111] Murphy ED, Roths JB. A Y chromosome associated factor in strain BXSB producing accelerated autoimmunity and lymphoproliferation. *Arthritis Rheum* 1979;22:1188–94.
- [112] Liu Z, Davidson A. Taming lupus-a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nat Med* 2012;18:871–82. doi:10.1038/nm.2752.
- [113] Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey

- PJ, et al. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med* 1978;148:1198–215.
- [114] Kimura J, Ichii O, Nakamura T, Horino T, Otsuka S, Kon Y. BXS^B-type genome causes murine autoimmune glomerulonephritis: pathological correlation between telomeric region of chromosome 1 and Yaa. *Genes Immun* 2014;15:182–9. doi:10.1038/gene.2014.4.
- [115] Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng Y-Y, Morel L. Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:1–19. doi:10.1155/2011/271694.
- [116] Huang L, Kong Y, Wang J, Sun J, Shi Q, Qiu Y. Reducing progression of experimental lupus nephritis via inhibition of the B7/CD28 signaling pathway. *Mol Med Rep* 2015:1–9. doi:10.3892/mmr.2015.3953.
- [117] Satoh M, Kumar A, Kanwar YS, Reeves WH. Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10934–8.
- [118] Satoh M, Reeves WH. Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. *J Exp Med* 1994;180:2341–6. doi:10.1084/jem.180.6.2341.
- [119] Zhuang H, Szeto C, Han S, Yang L, Reeves WH. Animal models of interferon signature positive lupus. *Front Immunol* 2015;6:6–11. doi:10.3389/fimmu.2015.00291.
- [120] Marunaka Y. Actions of quercetin, a flavonoid, on ion transporters: its physiological roles. *Ann N Y Acad Sci* 2017. doi:10.1111/nyas.13361.
- [121] Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol* 2012;83:6–15. doi:10.1016/j.bcp.2011.08.010.
- [122] Formica JV, Regelson W. Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids 1995;33:1061–80.
- [123] Suganthy N, Devi KP, Nabavi SMF, Braidy N, Nabavi SMF. Bioactive effects of

- quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. *Biomed Pharmacother* 2016;84:892–908. doi:10.1016/j.biopha.2016.10.011.
- [124] Hirpara K V, Aggarwal P, Mukherjee AJ, Joshi N, Burman AC. Quercetin and its derivatives: synthesis, pharmacological uses with special emphasis on anti-tumor properties and prodrug with enhanced bio-availability. *Anticancer Agents Med Chem* 2009;9:138–61. doi:10.2174/187152009787313855.
- [125] Chen S, Jiang H, Wu X, Fang J. Therapeutic Effects of Quercetin on Inflammation, Obesity, and Type 2 Diabetes. *Mediators Inflamm* 2016;2016. doi:10.1155/2016/9340637.
- [126] Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 2000;130:2765–71.
- [127] Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigné C, et al. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 1995;125:1911–22.
- [128] Hollman PC, van Trijp JM, Buysman MN, van der Gaag MS, Mengelers MJ, de Vries JH, et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* 1997;418:152–6.
- [129] Suzuki T, Hara H. Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. *J Nutr Biochem* 2011;22:401–8. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.08.001.
- [130] Day AJ, Cañada FJ, Díaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, et al. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 2000;468:166–70.
- [131] Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol* 1999;277:G120-6.
- [132] Boonpawa R, Moradi N, Spenkelink A, Rietjens IMCM, Punt A. Use of physiologically based kinetic (PBK) modeling to study interindividual human variation and species differences in plasma concentrations of quercetin and its

metabolites. *Biochem Pharmacol* 2015;98:690–702.
doi:10.1016/j.bcp.2015.09.022.

- [133] MATSUKAWA N, MATSUMOTO M, HARA H. High Biliary Excretion Levels of Quercetin Metabolites after Administration of a Quercetin Glycoside in Conscious Bile Duct Cannulated Rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73:1863–5. doi:10.1271/bbb.90031.
- [134] Noh H-J, Kim C-S, Kang J-H, Park J-Y, Choe S-Y, Hong S-M, et al. Quercetin Suppresses MIP-1 α -Induced Adipose Inflammation by Downregulating Its Receptors CCR1/CCR5 and Inhibiting Inflammatory Signaling n.d. doi:10.1089/jmf.2013.2912.
- [135] Calero CI, Beltrán González AN, Gasulla J, Alvarez S, Evelson P, Calvo DJ. Quercetin antagonism of GABA A α 1 receptors is prevented by ascorbic acid through a redox-independent mechanism. *Eur J Pharmacol* 2013;714:274–80. doi:10.1016/j.ejphar.2013.07.044.
- [136] Baghel SS, Shrivastava N, Baghel RS, Marunaka Y, Marunaka R, Sun H, et al. Participation of α 2 receptors in the antinociceptive activity of quercetin. *Int J PharmTech Res* 2014;6:529–32. doi:10.3109/13880200490893492.
- [137] Ademosun AO, Oboh G, Bello F, Ayeni PO. Antioxidative Properties and Effect of Quercetin and Its Glycosylated Form (Rutin) on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2016;21:NP11-NP17. doi:10.1177/2156587215610032.
- [138] Robaszkiewicz A, Balcerzyk A, Bartosz G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int* 2007;31:1245–50. doi:10.1016/j.cellbi.2007.04.009.
- [139] Pietta P-G. Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod* 2000;63:1035–42. doi:10.1021/np9904509.
- [140] Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 2011;82:513–23. doi:10.1016/j.fitote.2011.01.018.
- [141] Müller M, Kersten S. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat Rev Genet*

2003;4:315–22. doi:10.1038/nrg1047.

- [142] Heijnen CG, Haenen GR, van Acker FA, van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol In Vitro* 2001;15:3–6.
- [143] Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002;13:572–84.
- [144] Diaz de Barboza G, Guizzardi S, Moine L, Tolosa de Talamoni N. Oxidative stress, antioxidants and intestinal calcium absorption. *World J Gastroenterol* 2017;23:2841. doi:10.3748/wjg.v23.i16.2841.
- [145] Kawabata K, Mukai R, Ishisaka A. Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability. *Food Funct* 2015;6:1399–417. doi:10.1039/C4FO01178C.
- [146] Egert S, Bosy-Westphal A, Seiberl J, Kürbitz C, Settler U, Plachta-Danielzik S, et al. Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr* 2009;102:1065–74. doi:10.1017/S0007114509359127.
- [147] Casas-Grajales S, Vázquez-Flores LF, Ramos-Tovar E, Hernández-Aquino E, Flores-Beltrán RE, Cerda-García-Rojas CM, et al. Quercetin reverses experimental cirrhosis by immunomodulation of the proinflammatory and profibrotic processes. *Fundam Clin Pharmacol* 2017;31:610–24. doi:10.1111/fcp.12315.
- [148] Gormaz JG, Quintremil S, Rodrigo R. Cardiovascular Disease: A Target for the Pharmacological Effects of Quercetin. *Curr Top Med Chem* 2015;15:1735–42.
- [149] Li X, Jin Q, Yao Q, Xu B, Li L, Zhang S, et al. The flavonoid quercetin ameliorates liver inflammation and fibrosis by regulating hepatic macrophages activation and polarization in mice. *Front Pharmacol* 2018;9:1–14. doi:10.3389/fphar.2018.00072.
- [150] Larson AJ, Symons JD, Jalili T. Therapeutic Potential of Quercetin to Decrease Blood Pressure: Review of Efficacy and Mechanisms. *Adv Nutr An Int Rev J*

2012;3:39–46. doi:10.3945/an.111.001271.

- [151] Baghel SS, Shrivastava N, Baghel RS. A review of quercetin : Antioxidant and anticancer properties 2016.
- [152] Niedzwiecki A, Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M. Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. *Nutrients* 2016;8. doi:10.3390/nu8090552.
- [153] de Souza SRG, de Miranda Neto MH, Martins Perles JVC, Vieira Frez FC, Zignani I, Ramalho FV, et al. Antioxidant Effects of the Quercetin in the Jejunal Myenteric Innervation of Diabetic Rats. *Front Med* 2017;4:8. doi:10.3389/fmed.2017.00008.
- [154] Kaur R, Singh D, Chopra K. Participation of alpha2 receptors in the antinociceptive activity of quercetin. *J Med Food* 2005;8:529–32. doi:10.1089/jmf.2005.8.529.
- [155] Echeverry C, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Midiwo JO, Ochieng C, Kerubo L, et al. Pretreatment with Natural Flavones and Neuronal Cell Survival after Oxidative Stress: A Structure–Activity Relationship Study. *J Agric Food Chem* 2010;58:2111–5. doi:10.1021/jf902951v.
- [156] Minneman KP, Wurtman RJ. The pharmacology of the pineal gland. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1976;16:33–51. doi:10.1146/annurev.pa.16.040176.000341.
- [157] Rodella LF, Favero G, Foglio E, Rossini C, Castrezzati S, Lonati C, et al. Vascular endothelial cells and dysfunctions: role of melatonin. *Front Biosci (Elite Ed)* 2013;5:119–29.
- [158] Frungieri MB, Calandra RS, Rossi SP. Local Actions of Melatonin in Somatic Cells of the Testis. *Int J Mol Sci* 2017;18:1170. doi:10.3390/ijms18061170.
- [159] Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 2004;25:177–95. doi:10.1016/j.yfrne.2004.08.001.
- [160] Tan D, Reiter R, Manchester L, Yan M, El-Sawi M, Sainz R, et al. Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. *Curr Top Med Chem* 2002;2:181–97. doi:10.2174/1568026023394443.

- [161] Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ. Clinical aspects of melatonin in the acute coronary syndrome. *Curr Vasc Pharmacol* 2009;7:367–73.
- [162] Favero G, Rodella LF, Reiter RJ, Rezzani R. Melatonin and its atheroprotective effects: A review. *Mol Cell Endocrinol* 2014;382:926–37. doi:10.1016/j.mce.2013.11.016.
- [163] Gonzalez-Arto M, Hamilton TR dos S, Gallego M, Gaspar-Torrubia E, Aguilar D, Serrano-Blesa E, et al. Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract. *Andrology* 2016;4:163–71. doi:10.1111/andr.12117.
- [164] Basler M, Jetter A, Fink D, Seifert B, Kullak-Ublick GA, Trojan A. Urinary excretion of melatonin and association with breast cancer: meta-analysis and review of the literature. *Breast Care (Basel)* 2014;9:182–7. doi:10.1159/000363426.
- [165] Rodella L, Favero G, Foglio E, Rossini C, Castrezzati S, Lonati C, et al. Vascular endothelial cells and dysfunctions: role of melatonin. *Front Biosci (Elite Ed)* 2013:119–29.
- [166] Jockers R, Delagrangé P, Dubocovich ML, Markus RP, Renault N, Tosini G, et al. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. *Br J Pharmacol* 2016;173:2702–25. doi:10.1111/bph.13536.
- [167] Masana MI, Doolen S, Ersahin C, Al-Ghoul WM, Duckles SP, Dubocovich ML, et al. MT(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:1295–302.
- [168] Zhang H-M, Zhang Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res* 2014;57:131–46. doi:10.1111/jpi.12162.
- [169] Tengattini S, Reiter RJ, Tan D-X, Terron MP, Rodella LF, Rezzani R. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J Pineal Res* 2007;0:071031082305001–???. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00518.x.
- [170] Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST, et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 2000;29:1177–85.

- [171] Erdemli HK, Akyol S, Armutcu F, Gulec MA, Canbal M, Akyol O. Melatonin and caffeic acid phenethyl ester in the regulation of mitochondrial function and apoptosis: The basis for future medical approaches. *Life Sci* 2016;148:305–12. doi:10.1016/j.lfs.2016.01.026.
- [172] Favero G, Franceschetti L, Buffoli B, Moghadasian MH, Reiter RJ, Rodella LF, et al. Melatonin: Protection against age-related cardiac pathology. *Ageing Res Rev* 2017;35:336–49. doi:10.1016/j.arr.2016.11.007.
- [173] Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:313–6. doi:10.1016/j.biocel.2005.08.020.
- [174] Mayo JC, Sainz RM, Tan D-X, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 2005;165:139–49. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.05.002.
- [175] Satoh K, Matoba T, Suzuki J, O'Dell MR, Nigro P, Cui Z, et al. Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 2008;117:3088–98. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.756106.
- [176] Rezzani R, Favero G, Stacchiotti A, Rodella LF. Endothelial and vascular smooth muscle cell dysfunction mediated by cyclophilin A and the atheroprotective effects of melatonin. *Life Sci* 2013;92:875–82. doi:10.1016/j.lfs.2012.11.011.
- [177] Jahanban-Esfahlan R, Mehrzadi S, Reiter RJ, Seidi K, Majidinia M, Baghi HB, et al. Melatonin in regulation of inflammatory pathways in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: involvement of circadian clock genes. *Br J Pharmacol* 2017. doi:10.1111/bph.13898.
- [178] Cardinali DP, Hardeland R. Inflammaging, Metabolic Syndrome and Melatonin: A Call for Treatment Studies. *Neuroendocrinology* 2017;104:382–97. doi:10.1159/000446543.
- [179] Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Protective role of melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *Arch Toxicol* 2015;89:923–39.

doi:10.1007/s00204-015-1475-z.

- [180] Martínez-Martínez E, Jurado-López R, Valero-Muñoz M, Bartolomé MV, Ballesteros S, Luaces M, et al. Leptin induces cardiac fibrosis through galectin-3, mTOR and oxidative stress. *J Hypertens* 2014;32:1104–14. doi:10.1097/HJH.0000000000000149.
- [181] Soussia I Ben, Mies F, Naeije R, Shlyonsky V. Melatonin down-regulates volume-sensitive chloride channels in fibroblasts. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2012;464:273–85. doi:10.1007/s00424-012-1139-2.
- [182] Hu W, Ma Z, Jiang S, Fan C, Deng C, Yan X, et al. Melatonin: The dawning of a treatment for fibrosis? *J Pineal Res* 2016;60:121–31. doi:10.1111/jpi.12302.
- [183] Yeung H-M, Hung M-W, Lau C-F, Fung M-L. Cardioprotective effects of melatonin against myocardial injuries induced by chronic intermittent hypoxia in rats. *J Pineal Res* 2015;58:12–25. doi:10.1111/jpi.12190.

7. Artigos publicados

7.1. Artigo 1

Protective effects of quercetin treatment in a pristane-induced mouse model of lupus nephritis

Mariane dos Santos¹, Priscila Tamar Poletti¹, Gaia Favero², Alessandra Stacchiotti^{2,3},
Francesca Bonomini^{2,3}, Carolina Caruccio Montanari¹, Silvia Regina Bona⁴, Norma
Possa Marroni⁴, Rita Rezzani^{2,3}, Francisco Veríssimo Veronese¹

¹Graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Brazil; Laboratory of Molecular Biology Applied to Nephrology,
Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

²Anatomy and Physiopathology Division, Department of Clinical and Experimental
Sciences, University of Brescia, Brescia, Italy

³Interdipartimental University Center of Research “Adaption and Regeneration of Tissue
and Organs- (ARTO)”, University of Brescia, Brescia, Italy

⁴Laboratory of Hepatology and Experimental Gastroenterology, Hospital de Clínicas de
Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding Author: Francisco Veríssimo Veronese, Division of Nephrology, Hospital
de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St, 90035-003, Porto Alegre, RS,
Brazil. Phone: +55.51.33598295; Fax: +55.51.33598121. E-mail
address: fveronese@hcpa.edu.br

Abstract

Introduction: Lupus nephritis (LN) is one of the most severe complications of systemic lupus erythematosus. As murine models of LN are valuable tools to better understand its pathophysiology and to search for new effective treatments, we investigated the effects of the bioflavonoid quercetin on pristane-induced LN mice through also histomorphological analyses.

Methods: Immunofluorescence and biochemical assays were used to evaluate the expression of markers of inflammation (Interleukin-6, IL-6; tumor necrosis factor- α , TNF- α), oxidative stress (catalase, CAT; superoxide dismutase 1, SOD1; thiobarbituric acid reactive substances, TBARS), apoptosis (Bax), and fibrosis (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1). Glomerular and tubular ultrastructure was analyzed, and tissue messenger RNA of podocin, podoplanin and α 3 β 1-integrin were quantified using the real-time polymerase chain reaction.

Results: Pristane-induced LN mice showed severe kidney injury, characterized by increased proteinuria, glomerular mesangial expansion and inflammation, high expression of the pro-fibrotic, apoptotic and prooxidant markers, and reduction of antioxidants. In the kidney ultrastructure, foot process (FP) effacement, apoptotic mesangial cells and abnormal mitochondria with disrupted cristae were observed, along with suppressed tissue mRNA of podocin, podoplanin and α 3 β 1-integrin. Treatment with quercetin in the pristane-induced LN mice model was nephroprotective, decreasing proteinuria levels and significantly lowering tissue expression of IL-6, TNF- α , TGF- β 1, Bax, and TBARS. Simultaneously, quercetin significantly increased CAT and SOD1 expressions in these mice. In addition, it was observed improvement of the kidney ultrastructure, and tissue mRNA of podocin, but not podoplanin and α 3 β 1-integrin, was restored to the levels found in the control mice.

Conclusion: In conclusion, these findings provide experimental evidence of the renoprotective effects of quercetin in the pristane-induced LN mice model. We suggest that quercetin effectively ameliorates the kidney damage caused by pristane, a bioflavonoid to be further evaluated as a new therapeutic strategy in this disease.

Key words: lupus nephritis, pristane, quercetin, inflammation, oxidative stress, podocyte

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multisystemic disease that can affect any organ, and is associated with significant morbidity and mortality. It is an autoimmune condition characterized by loss of tolerance to nuclear self-antigens, B and T cells hyperactivity, production of autoantibodies which deposit in tissues as immune complexes causing injury, failure in the apoptotic and clearance mechanisms, and overproduction of oxidative stress [1,2].

Lupus nephritis (LN) affects approximately half of SLE patients, with a wide spectrum of clinical presentations including hematuria, proteinuria and loss of renal function, potentially leading to end-stage kidney disease if renal fibrosis is not prevented by effective therapies that induce disease remission [2–4]. Full successful management of LN is an unattained goal, considering both immunosuppressive drugs (corticosteroids, cyclophosphamide, azathioprine, mycophenolate) and new biological agents (rituximab, belimumab) that have been tested, at the cost of substantial toxicity to patients [5]. Thus, the search for more effective and less toxic therapeutic alternatives to treat LN has to be explored.

Spontaneous and induced murine models of SLE have provided a better understanding of autoimmunity in this disease. Specifically, the pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane) induced model reported by Satoh et al [6] demonstrated that Balb/c female mice, after the injection of pristane into the peritoneal cavity, developed SLE-like features in the kidney. It was described proteinuria, IgG and complement glomerular deposits, tissue inflammation, mesangial expansion, endocapillary and tubular cell proliferation, and overproduction of interferon- α and β and other pro-inflammatory cytokines [6,7]. Other findings were glomerular podocyte fusion and effacement, with altered podocyte phenotype, cytoskeleton reorganization, disrupted slit diaphragm with

enlarged pores, and apoptosis which induce proteinuria and later chronic kidney damage [8].

Natural compounds are being reported as promising alternatives to control and reverse kidney injuries, protecting against kidney failure as seen in animal models [9,10]. Quercetin, a polyphenolic bioflavonoid found in many consumed foods, has multifaceted therapeutic applications. It has been extensively tested in animal models and in humans for its antiallergic, anti-inflammatory, antioxidative, antitumoral, antiviral, and angioprotective properties [11]. In rats with induced diabetic nephropathy, oral quercetin showed to be renoprotective as it has anti-oxidative, anti-fibrotic and anti-apoptotic effects [12–14]. Quercetin inhibits enzyme systems that induce reactive oxygen species (ROS), binds to superoxide anions and singlet oxygen radicals reducing lipid peroxidation and preventing oxidant injury. Among others, these protective actions were demonstrated in diabetic nephropathy [14] and in obesity-induced oxidative stress and inflammation, both in humans [15] and in experimental models [16]. Quercetin also inhibits proliferation and migration of aortic smooth muscle cells, acting as vasodilator in blood vessels [17].

In SLE murine models, other antioxidants have been tested such as N-acetylcysteine and cysteamine [18] and quercitrin [19], demonstrating kidney protection through suppression of anti-DNA antibody formation and reduced tissue inflammation and fibrosis. Recently, we have demonstrated the protective effects of melatonin on the pristane-induced LN where inflammation, oxidative stress and pro fibrotic markers significantly improved [20]. However, there is a paucity of studies evaluating the potential beneficial effects of quercetin in the pristane-induced LN mice model. In this study we evaluated the protective and modulating effects of quercetin on kidney of the pristane-induced LN mice model, assessing renal morphology and ultrastructure together

with biochemical and immunofluorescence evaluations of specific markers of inflammation, oxidative stress, apoptosis and fibrosis.

Materials and Methods

Animals

Female mice BALB/c at 8 weeks of age were obtained from the Federal University of Pelotas (Pelotas, RS, Brazil). The animals were housed in the Animal Experimentation Unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil) and maintained in a standard 12-hour light/dark cycle, with controlled temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) and free access to food and water. The present study was approved by the Animal Ethics Committee of HCPA and was conducted in accordance with National Institutes of Health guidelines.

Experimental design

Forty female BALB/c mice were randomly divided into following four groups (ten animals per group): 1) Control mice: received 500 μl of saline 0.9% intraperitoneally injected once (pristane vehicle) and received daily carboxymethylcellulose 1% (quercetin vehicle) by gavage for five months; 2) Pristane-induced LN mice: received a single dose of 500 μl of pristane (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) intraperitoneally injected, according to Satoh et al. [6], and received daily carboxymethylcellulose 1% by gavage for five months; 3) Control + quercetin mice: received daily quercetin (50 mg/kg/day), suspended in carboxymethylcellulose 1%, by gavage for five months [21]; 4) Pristane-induced LN + quercetin mice: received a single dose of 500 μl of pristane (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) intraperitoneally injected and received daily quercetin (50 mg/kg/day), suspended in carboxymethylcellulose 1%, by gavage for five months,

starting one month after pristane injection. Six months after pristane administration, all mice were killed and the kidneys were removed for morphometrical, ultrastructural, immunofluorescence and biochemical analysis.

Quantification of urinary protein

At the first, third and sixth months of pristane induction the animals were placed in individual metabolic cages for urine collection for a period of 2 to 3 hours. Urine samples were analyzed using urine test strips (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) to measure total protein level. The results were expressed as mg/dL.

Sample processing

One kidney of each mouse was processed for morphometrical and immunofluorescence assays and a part of the second kidney was treated for ultrastructural analysis. Briefly, one kidney of each experimental animal model was fixed in 10% buffered paraformaldehyde, dehydrated in ethanols and then embedded in paraffin wax. Serial kidney paraffin sections (7 μm thick) of each sample were cut with a microtome and then used for morphometrical evaluations and immunofluorescences analyses [20,22].

For the ultrastructural investigation, a part of the other kidney samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde in cacodilate buffer 0.1 M (pH 7.4) for 3 hours and post-fixed in 2% osmium tetroxide in cacodilate buffer for 1 hour, dehydrated in ethanol and embedded in Epon resin. Finally, these samples were cut with an ultramicrotome (Ultracut E, Reichert-Jung, Germany) using glass or diamond blades (Microstar, USA) obtaining both semithin (1 μm thick) and ultrathin (800 nm thick) sections [9,23].

Kidney injury score and morphometrical analyses

Kidney embedded-paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin, according to standard protocol, and then were observed with an optical microscopy (Olympus, Hamburg, Germany) at a final magnification of 400x. Two independent observers, blinded to the treatment, defined the kidney injury scores through the glomerular and tubular morphometrical analyses of inflammatory cells infiltration, glomerular hypercellularity, epithelial tubules alterations, tubular lumen narrowing and proximal tubules brush border detachment. Details about glomerular and tubular injury scores assessment have been previously reported by dos Santos et al. [20].

Ultrastructural analysis

Semithin sections were stained with toluidine blue and then observed with an optical microscopy (Olympus, Hamburg, Germany) at final magnification of 1000X. Whereas, ultrathin sections were double stained with uranyl acetate and lead citrate solutions [24] and observed using a transmission electron microscopy (CM10 FEI, Boston, MA, USA) set at 80 kV.

Immunofluorescence analyses of pro-fibrotic, pro-inflammatory, pro-apoptotic and antioxidant markers

Kidney embedded-paraffin sections were dewaxed, rehydrated using graded ethanols and then incubated in 1% bovine serum albumin in phosphate buffered saline for 1 hour in a humid chamber. Subsequently, the kidney sections were incubated 1 hour at room temperature and overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-mouse transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) diluted 1:250; anti-goat interleukin-6 (IL-6) diluted 1:200; anti-tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) diluted 1:200; anti-rabbit Bax

diluted 1:200; anti-rabbit superoxide dismutase1 (SOD1) diluted 1:200 and anti-goat catalase (CAT) diluted 1:200 (all primary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA). After rinsing with phosphate buffered saline, the kidney sections were labelled using specific Alexa Fluor 488 or 543 conjugated secondary antibodies (diluted 1:200). Finally, the sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), mounted and observed with a fluorescent microscope (i50 Eclipse, Nikon, Germany) at a final magnification of 400x, according to Agabiti-Rosei et al. [25] and Favero et al. [22]. Fifteen fields (area of which was 0.04 mm²), randomly selected, from each kidney section were analyzed and the immunopositivity for each primary antibody was quantified using an imaging analyser program (Image Pro Premier 9.1; Media Cybernetics Inc., Rockville, USA) and finally expressed as arbitrary unit (AU). All quantitative analyses were performed by two independent observers blinded to the treatments, whose evaluation was assumed to be correct if the values were not significantly different.

Enzymatic analysis of lipid peroxidation

The amount of aldehyde products generated by lipid peroxidation was quantified in kidney tissue by the enzymatic reaction of thiobarbituric acid through determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [26]. A small fragment of the kidney (100 mg) was separated, added to 0.9 ml of buffer (140 mM KCl, 20 mM phosphate, pH 7.4) and homogenized the microtubes IKA T10 basic (IKA Works, Inc., Wilmington, USA). After centrifugation at 2150.4 G for 10 minutes in a cooled (4° C) centrifuge, the pellet was discarded and the supernatant was used for analysis. The absorbance was determined in the supernatant at 535 nm, and the results of TBARS were expressed as nmol/mg protein.

Quantification of podocyte-associated mRNAs in kidney tissue

Podocyte-associated messenger RNA (mRNA) of podocin, podoplanin and $\alpha 3\beta 1$ -integrin were quantified using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in mice tissue. The expression of these mRNAs in kidney tissue was defined in relation to the mRNA levels detected in control mice. As described previously [27], mRNA was extracted from tissue samples using the QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc. Chatsworth, CA, USA), and the reverse RNA transcription was performed using the High-Capacity cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in accordance with manufacturer's instructions. The final volume of 20 μ L purified RNA was stored at -20°C . RT-qPCR was performed using a TaqMan® Universal PCR Master Mix. Specific primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to the following genes were used: NPHS2, podocin (ID: Mm01292252_m1); podoplanin (ID: Mm00494716_m1); $\alpha 3\beta 1$ -integrin (ID: Mm00442910_m1). Additionally, 18s rRNA (TaqMan® PDAR, Foster City, CA, USA) was used as an endogenous control to assess variations in the samples. RT-qPCR was performed in duplicate in 48-well plates containing 2 μ L cDNA. Data were collected in a Step One™ real Time PCR systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the following cycling parameters: 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 60°C for 60 seconds. Relative quantification of target gene expression was performed using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ comparative method, in which threshold cycle numbers (CT) were determined by the point at which a statistically significant increase in fluorescence was detected.

Statistical Analysis

Normality for continuous variables was determined by the Shapiro-Wilk test, and data are expressed as median and interquartile intervals. The data about morphometrical and immunohistomorphometrical evaluations were pooled to represent a mean value±standard deviation and statistical significance of differences among the experimental groups was evaluated by one-way analysis of variance corrected by Bonferroni test. Mann Whitney test was used for pairwise comparisons of mRNA values of podocyte proteins which were log-transformed to reduce asymmetry. The change in proteinuria levels at three time points was compared using the generalized estimating equation (GEE) model with normal distribution, by group, time point and group-time point interaction. These results were expressed as mean±standard error (95% confidence interval) and p values determined by post hoc Bonferroni test. All analyses were performed using SPSS for Windows (version 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The level of significance was set at $p<0.05$.

Results

Proteinuria

As there were no statistical differences in proteinuria levels comparing control mice and control + quercetin groups, only control mice were considered in this analysis. At the three time points of measurement, proteinuria remained stable for control mice (1st month $7,1\pm3,4$ vs. 6th month $6,6\pm2,4$; $p=1.00$), as shown in **Figure 1**. For pristane-LN mice proteinuria increased significantly comparing the first and sixth months ($25,0\pm2,4$ vs. $57,0\pm17,2$; $p=0.002$), suggesting injury to the glomerular filtration barrier induced by pristane. In contrast, for pristane-LN + quercetin, it was observed a significant reduction in urinary protein comparing the first and sixth months ($13,3\pm2,8$ vs. $3,4\pm2,0$; $p<0.001$), indicating that quercetin induced a protective effect, improving the permeability of the

glomerular filtration barrier. In the pairwise comparisons between groups at each time point, pristane-LN mice had higher urinary protein levels compared to control mice at the first ($p < 0.001$), third ($p = 0.046$) and sixth ($p = 0.012$) months; compared to pristane-LN + quercetin, pristane-LN mice showed higher proteinuria at the first ($p = 0.005$) and sixth months ($p = 0.006$), but not at the third month ($p = 1.00$) (**Figure 1**). These results demonstrate that the behavior of the groups differs over time.

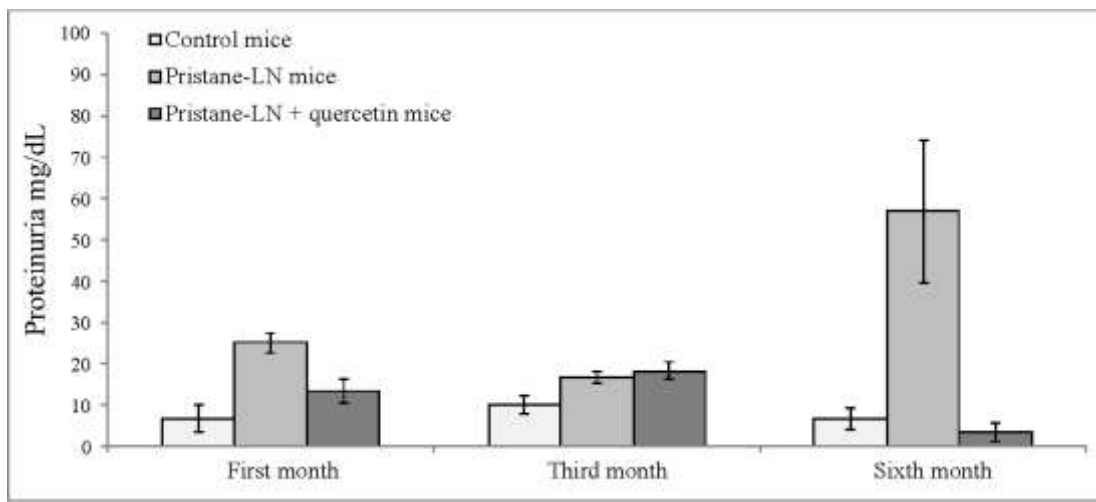


Figure 1. The graph shows proteinuria levels at first, third and sixth months after pristane induction of control, pristane-LN and pristane-LN + quercetin groups. Comparisons between groups at the three time points: pristane-LN vs control mice: $p < 0.001$ (1st month), $p = 0.046$ (3th month), and $p = 0.012$ (6th month); pristane-LN vs pristane-LN + quercetin: $p = 0.005$ (1st month), $p = 1.00$ (3th month), and $p = 0.006$ (6th month). Intragroup comparison in the first vs third month, in the third vs sixth month, and in the first vs sixth month respectively: control mice: $p = 1.00$; $p = 0.867$ and $p = 1.00$; pristane-LN: $p = 0.069$, $p < 0.001$ and $p = 0.002$; and pristane-LN + quercetin: $p = 0.401$, $p < 1.00$ and $p < 0.001$.

Kidney injury score and morphometrical analyses

As for proteinuria level analyses, also the renal morphological and ultrastructural evaluations showed no significant difference between control mice and control treated with quercetin mice, so these experimental groups are defined generically as “control mice” for the following analysis.

As recently reported by dos Santos et al. [20], control mice showed almost normal features of glomeruli, proximal and distal tubules; in particular, intra-glomerular mesangial cells and proximal and distal tubular epithelial cells were well organized and intact brush borders are maintained in the proximal tubules (**Figure 2A,D**). Conversely,

pristane-LN mice presented severe kidney damage characterized by glomerular mesangial cell proliferation and matrix expansion, inflammatory cell infiltration, podocyte hypertrophy, enlarged tubular epithelium and proximal tubules filled with brush border debris in the lumen (**Figure 2B, E**). Interestingly, quercetin treatment of pristane-LN mice significantly reduced the glomerular and tubular alterations demonstrating a significant improvement of the renal cytoarchitecture (**Figures 2C, F**). All these observations were confirmed also by kidney injury scores summarized in **Table 1**.

Table 1. Glomerular and tubular kidney injury scores and percentage of renal inflammation of all experimental groups.

Experimental Group	Inflammation (%)	Glomeruli	Tubules
Control	0.51(0.35-2.42) ^{1,2}	+/-	-
Control + quercetin	0.82 (0.0–1.36)	+/-	+/-
Pristane-LN	7.42 (5.31–8.43) ³	+++	+++
Pristane-LN + quercetin	4.23 (2.12–6.94) ⁴	++	++

Morphological injury score: (-): no change; (+/-) weak change, (+): mild change, (++) moderate change, (+++) marked change. ¹Median and interquartile range. ²p<0.001 vs pristane-LN mice; ³p=0.041 vs pristane-LN + quercetin mice; ⁴p=0.012 vs control mice.

Furthermore, as showed previously by dos Santos et al. [20], the ultrastructural analyses confirmed that control mice presented a well-defined renal ultrastructure (data not shown) respect to pristane-LN mice that showed foot process effacement, a typical morphological hallmark of proteinuria, glomerular basement membrane thickening (**Figure 2G**), apoptotic mesangial cells and abnormal mitochondria with disrupted cristae in proximal tubules (**Figure 2I**). Remarkably, the ultrastructural evaluation of pristane-LN mice treated with quercetin showed recovered podocytes foot processes with scarce focal fusion (**Figure 2H**), and proximal tubule with scattered small mitochondria with regular cristae and inner matrix density (**Figure 2J**).

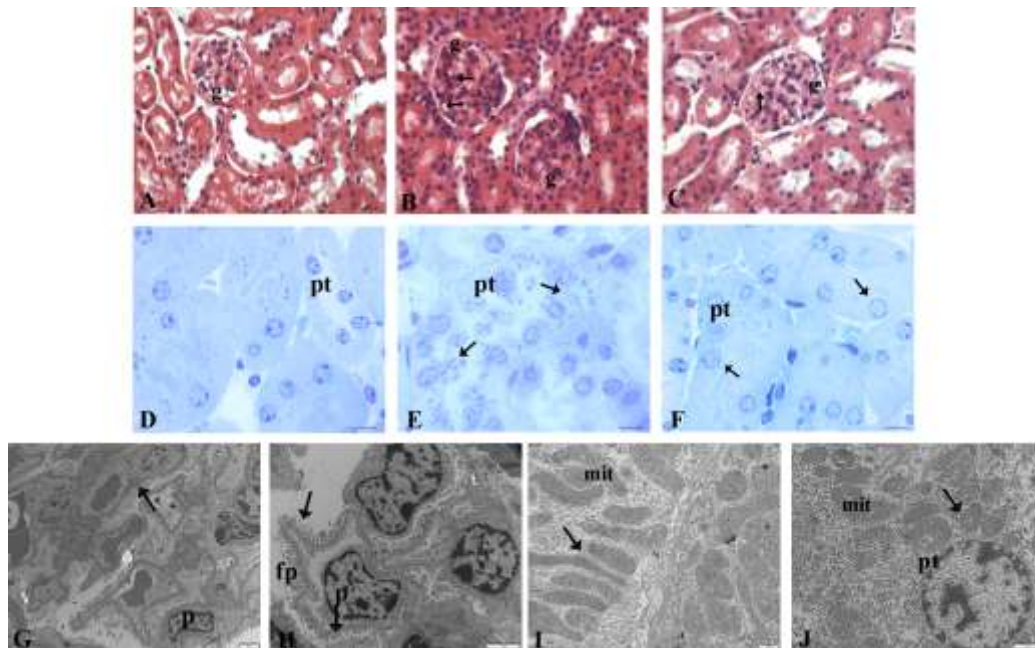


Figure 2. Photomicrographs show glomeruli (hematoxylin-eosin) and proximal tubules (toluidine blue staining) of control mice (A, D), pristane-LN mice (B, E) and pristane-LN mice treated with quercetin (C, F). In detail, pristane-LN mice shows mesangial matrix expansion, mesangial hypercellularity, capillary wall thickening, and podocyte hypertrophy (B), and proximal tubules with cell detachment, cytoplasm engulfed by numerous lysosomal dense bodies, and brush border detachment (E). After quercetin treatment, reduced mesangial hypercellularity and mild expansion were observed (C), and more preserved proximal tubules brush border (F). (g): glomerulus; (pt): proximal tubule. Bars A-C: 20 μ m, D-F: 10 μ m. Photomicrographs show kidney ultrastructure of pristane-LN mice (G, I) and pristane-LN mice treated with quercetin (H, J). In detail, diffuse podocyte foot process effacement and basement membrane thickening (G); well preserved podocytes with scarce focal fusion (H). Abnormal mitochondria with disrupted cristae (I); proximal tubule with scattered small mitochondria with regular cristae (J). (p): podocyte; (fp): foot processes; (mit): mitochondria; (pt): proximal tubule. Bars: 500 nm (I); 1 μ m (J); 2 μ m (G, H).

Immunofluorescence analysis of the pro-fibrotic transforming growth factor-beta1 marker

Control mice showed an absent/very weakly TGF- β 1 expression (**Figure 3A**) respect to kidney of pristane-LN mice that showed a significant increased expression (moderate/strong) ($p=0.009$) (**Figure 3B**). In pristane-LN treated with quercetin, it was observed a significant reduction of renal TGF- β 1 expression ($p=0.003$ compared to pristane-LN mice), showing a weak expression (**Figure 3C**) that was still higher than in control mice ($p=0.028$). Relative immunopositivity evaluation of each experimental group is plotted in **Figure 3D**.

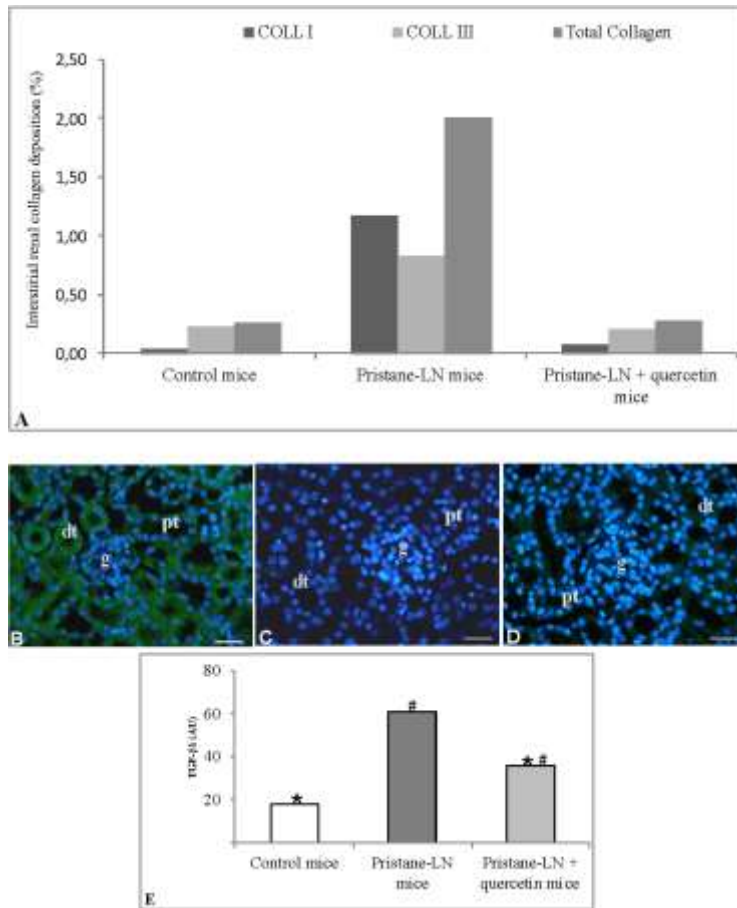


Figure 3. Photomicrographs showing transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) (green staining) immunofluorescence of control mice (A), pristane-LN mice (B) and pristane-LN mice treated with quercetin (C). Bar equals 20 μ m. The graph (D) summarizes TGF- β 1 immunohistomorphometrical analysis of all experimental groups. *p=0.009 (control mice vs pristane-LN mice); #p=0.003 (pristane-LN vs pristane-LN + quercetin mice); §p=0.028 (control mice vs pristane-LN treated with quercetin mice).

Immunofluorescence analysis of the pro-inflammatory interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha markers

IL-6 and TNF- α (green stainings) were evaluated as pro-inflammatory markers involved in LN pathogenesis [28]. In particular, kidney of control mice showed absent/very weak expression of IL-6 (**Figure 4A**) compared with a moderate/strong expression in pristane-LN mice (p=0.009) (**Figure 4B**). In pristane-LN mice treated with quercetin, the IL-6 expression was very weak and so significantly lowered compared to pristane-LN mice (p=0.016), as shown in **Figure 4C**. Furthermore, the evaluation of the pro-inflammatory TNF- α marker showed a trend similar to that observed for IL-6. In other words, kidney of control mice showed a very low TNF- α expression (**Figure 4D**) respect to pristane-LN mice that presented a moderate/strong expression (**Figure 4E**). Kidney of pristane-LN mice treated with quercetin showed a significant reduced expression of TNF-

α (**Figure 4F**), respect to untreated pristane-LN mice ($p=0.007$). Relative immunopositivity evaluations of kidney IL-6 and TNF- α are respectively plotted in **Figures 4G** and **4H**.

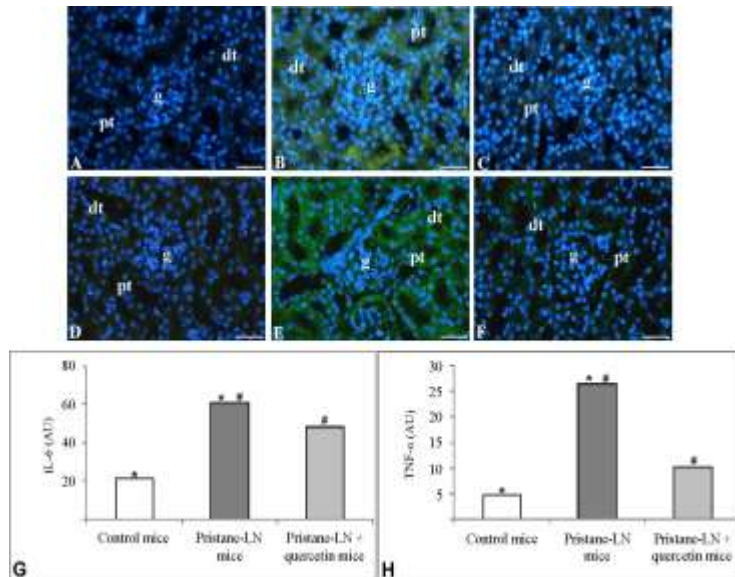


Figure 4. Photomicrographs showing interleukin-6 (IL-6, green staining) (A-C) and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α , green staining) (D-F) immunofluorescence of control mice (A, D), pristane-LN mice (B, E) and pristane-LN mice treated with quercetin (C, F). Bar equals 20 μ m. The graphs summarize IL-6 (G) and TNF- α (H) immunohistomorphometrical analysis of all experimental groups. IL-6: * $p=0.009$ (control vs pristane-LN mice); # $p=0.016$ (pristane-LN vs pristane-LN + quercetin mice); § $p=0.021$ (control mice vs pristane-LN treated with quercetin mice). TNF- α : * $p=0.013$ (control vs pristane-LN mice); # $p=0.007$ (pristane-LN vs pristane-LN + quercetin mice); § $p=0.039$ (control mice vs pristane-LN treated with quercetin mice).

Immunofluorescence analysis of the pro-apoptotic Bax marker

The analyses of the pro-apoptotic marker Bax (red staining) showed that control mice presented an absent/very weak expression (**Figure 5A**) compared to a higher and moderate/strong kidney expression of pristane-LN mice ($p=0.009$) (**Figure 5B**). Remarkably, after quercetin treatment of pristane-LN mice Bax expression was significantly reduced, showing a weak expression (**Figure 5C**), reaching value similar to control mice ($p=0.006$ vs. pristane-LN; $p=0.117$ vs. control mice). Relative immunopositivity evaluation of each experimental group is plotted in Figure 5D.

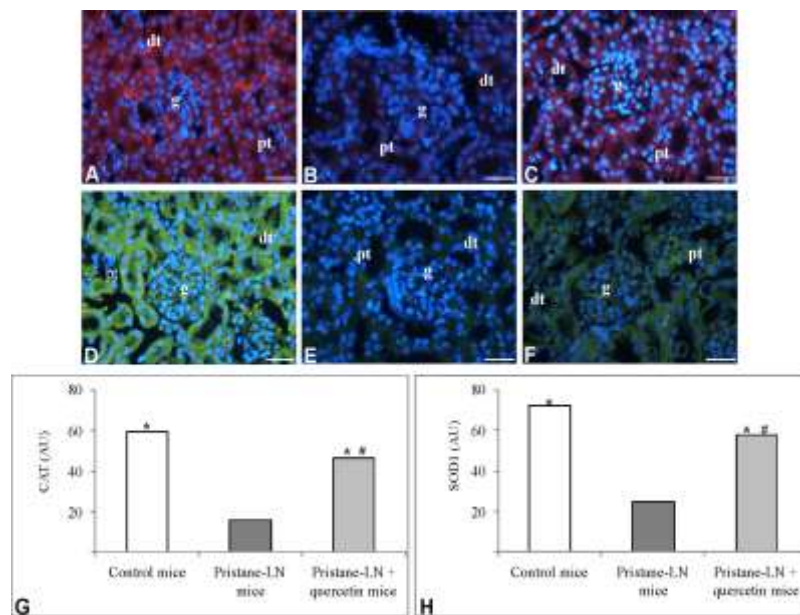


Figure 5. Photomicrographs showing Bax (red staining) immunofluorescence of control mice (A), pristane-LN mice (B) and pristane-LN mice treated with quercetin (C). Bar equals 20 μ m. The graph (D) summarizes the Bax immunohistomorphometrical analysis of all experimental groups. *p=0.009 (control vs pristane-LN mice); #p=0.006 (pristane-LN vs pristane-LN + quercetin mice).

Oxidative stress evaluation

Immunofluorescence analyses of the superoxide dismutase1 and catalase antioxidant markers

The expression of the endogenous antioxidant enzymes SOD1 (identified in green, **Figures 6A-C**) and CAT (identified in red, **Figures 6D-F**) showed that control mice presented a moderate/strong renal expression of both enzymes (**Figures 6A, D**). Kidney of pristane-LN mice showed, compared to control mice, a significant reduction in the expression of both SOD1 (p=0.001) and CAT (p=0.001) (weak expressions), as shown in **Figures 6B, E**. After quercetin treatment of pristane-LN mice, the expression of both antioxidants increased significantly compared with pristane-LN mice (SOD1: p=0.001; CAT: p=0.003) reaching value similar to control mice (**Figures 6C, F**). Relative immunopositivity evaluations of kidney SOD1 and CAT are respectively plotted in **Figures 6G and 6H**.

Prooxidant TBARS

Evaluation of lipid peroxidation by the expression of TBARS in kidney tissue showed in control mice and pristane-LN mice respectively: 0.27(0.24-0.34) and 0.55(0.42-0.65) nmol/mg protein ($p=0.001$) (**Figure 6I**). Treatment with quercetin lowered this expression to 0.29(0.22-0.32) nmol/mg protein that was statistically different from pristane-LN mice ($p=0.002$), and did not differ from control mice ($p=0.894$).

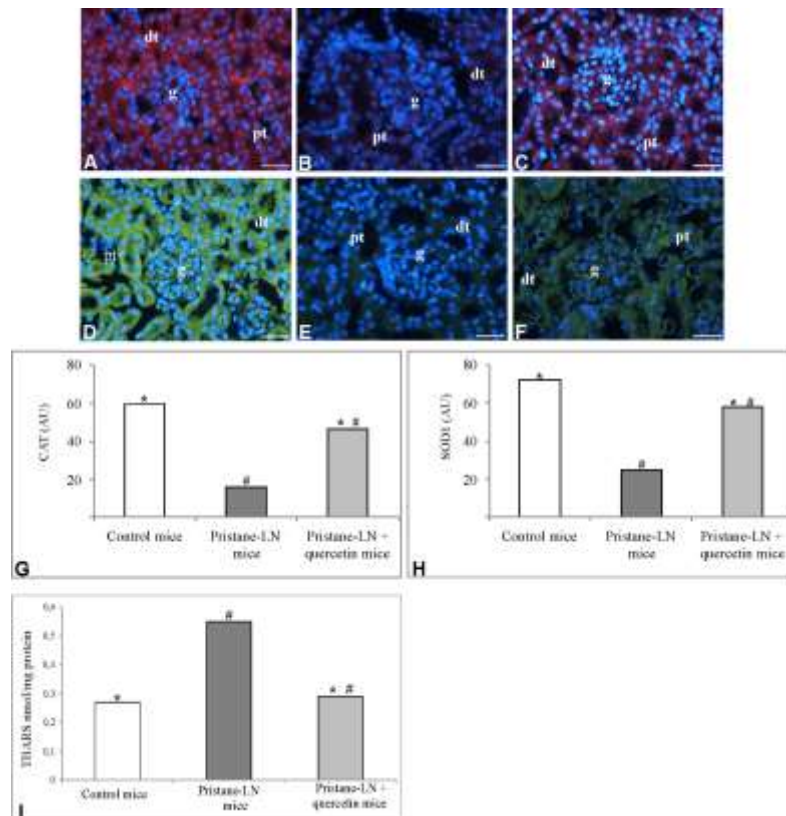


Figure 6. Photomicrographs showing superoxide dismutase1 (SOD1) (A-C; red staining) and catalase (CAT) (D-F; green staining) immunofluorescence of control mice (A, D), pristane-LN mice (B, E), pristane-LN mice treated with quercetin (C, F). Bar equals 20 μm . The graphs summarize SOD1 (G) and CAT (H) immunohistomorphometrical analysis of all experimental groups. SOD1: * $p=0.001$ (control vs pristane-LN mice); # $p=0.003$ (pristane-LN vs pristane-LN + quercetin mice). CAT: * $p=0.001$ (control vs pristane-LN mice); # $p=0.001$ (pristane-LN vs pristane-LN + quercetin mice). The differences in the expression of TBARS (I) in kidney tissue were: * $p=0.001$ (control vs pristane-LN mice); # $p=0.002$ (pristane-LN vs pristane-LN + quercetin mice).

Expression of podocyte-associated mRNAs in kidney tissue

Glomerular podocyte mRNA expression was measured for podocin, podoplanin and $\alpha 3\beta 1$ -integrin genes in the kidneys of the three mice groups. Comparing control mice to pristane-LN mice, a significant difference was found in the expression of the podocyte-associated mRNAs, in that the injury induced by pristane on glomerular epithelial cells significantly suppressed mRNA expression of podocin ($p<0.001$), podoplanin ($p=0.009$), and $\alpha 3\beta 1$ -integrin ($p=0.005$), as shown in **Figure 7**. These findings suggest the loss of podocyte cytoarchitecture integrity and function in pristane induced mice, similarly to

what was described in the ultrastructural analysis of the glomerular podocytes. After the treatment with quercetin, there was a significant increase in podocin mRNA expression compared to pristane-LN mice ($p < 0.001$); however, no difference was found in the mRNA of podoplanin ($p = 0.514$) and of $\alpha 3\beta 1$ -integrin ($p = 0.102$). Comparing pristane-LN + quercetin to control mice, mRNA levels of $\alpha 3\beta 1$ -integrin, podoplanin, and podocin in kidney tissue were similar ($p > 0.05$) (**Figure 7**).

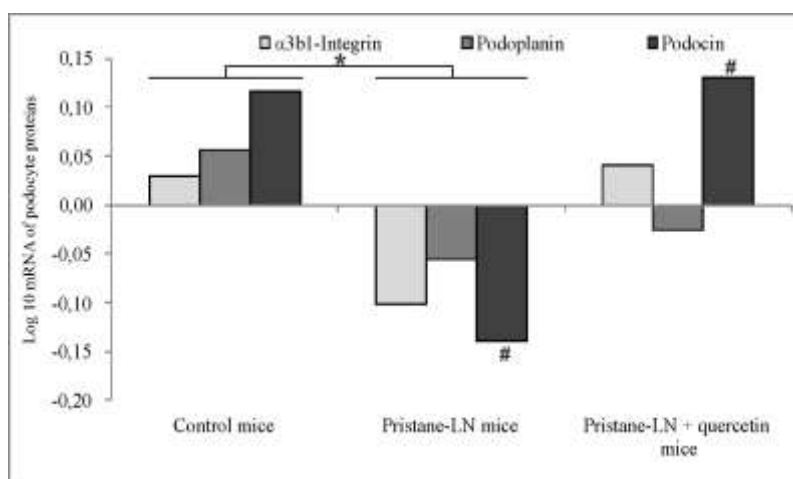


Figure 7. Expression of podocyte-associated messenger RNA in kidney tissue of pristane-induced LN compared to control mice and pristane-induced LN treated with quercetin. Podocin: * $p < 0.001$ (control vs pristane-LN mice); # $p < 0.001$ (pristane-LN vs pristane-LN + quercetin mice). Podoplanin: * $p = 0.009$ (control vs pristane-LN mice); $p = 0.514$ (pristane-LN vs pristane-LN + quercetin mice). $\alpha 3\beta 1$ integrin: * $p = 0.005$ (control vs pristane-LN mice); $p = 0.102$ (pristane-LN vs pristane-LN + quercetin mice).

Discussion

In this pristane-induced LN mice model, the administration of the bioflavonoid quercetin was protective against the induced kidney damage, showing anti-inflammatory, anti-oxidative, anti-apoptotic, and anti-fibrotic effects. Histomorphometrical and immunofluorescence findings in this pristane model revealed glomerular and tubular cell inflammation, exacerbated oxidative stress, activation of apoptosis and of pro-fibrotic markers as seen in human proliferative LN. As reviewed by Reeves et al [29], primarily IgG autoantibodies induced by pristane intra-peritoneal injection can promote kidney injury through direct or indirect pathways. Autoantibodies are directly targeted to a variety of nuclear components including dsDNA, single-stranded DNA, chromatin, Sm, U1 small nuclear RNP (U1snRNP), Su, and ribosomal P. A single dose of pristane leads to autoantibodies against the U1snRNP, RNP, Sm, and Su antigens in 50– 90% of these

mice over 4– 6 months, and against dsDNA at 6–10 months [6,30]. However, the mechanisms behind the anti-inflammatory properties of quercetin are poorly understood. Although there is no evidence for a local renal effect of quercetin to inhibit autoantibody production and immune complex deposition, we can speculate that quercetin protection might be related to indirect actions that modulate inflammation. Quercetin and its metabolites suppress cytokine production (ie, IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α) and downregulate adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) involved in monocyte/macrophage recruitment [11,14,16,28,30]. This bioflavonoid also inhibits enzymes usually induced by inflammation like cyclooxygenase and lipoxygenase, as well as lipopolysaccharide induced nitric oxide synthase expression and nitric oxide production, that acts as a pro-inflammatory mediator [31,32]. Recently, toll-like receptors 7 and 8 (TLR7, -8) have received attention for their ability to recognize endogenous nucleic acids and to produce type I interferon [29]; TLR7, -8 are activated by Fc γ receptors on plasmacytoid dendritic cells mediating the transport of DNA- or RNA-containing immune complexes into endosomes, with generation of autoantibodies against anti-RNA containing auto-antigens [33]. Quercetin action on this pathway was not yet investigated.

We did not evaluate serum or tissue levels of autoantibodies in the pristane mice model, as we focused our investigation primarily on markers of kidney damage in response to immune complexes deposition, such as inflammation, oxidative stress, apoptosis, and tissue fibrosis to search for potential protective effects of quercetin on the pristane-LN mice model. Previous studies used the pristane-induced LN mice model to demonstrate the protective effects of different therapeutic interventions, reporting reduced production of autoantibodies and immune complex deposition, less inflammation and fibrosis [20,30,34,35]. Dos Santos et al [20] showed that oral supplementation of

melatonin partially restored the kidney cytoarchitecture related to tubular degeneration, glomerular hypercellularity, mesangial expansion, and interstitial inflammation in the pristane-induced LN mice model. Treating female BALB/c mice with melatonin, Zhou et al [34] also demonstrated reduced production of IgM anti-ssDNA and histone autoantibodies, decreased IL-6 and IL-13, and attenuation of the renal lesions induced by pristane. In an interesting study with resveratrol, an activator of silent mating type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1) whose deficiency induces immune complex glomerulonephritis, Wang et al [35] showed attenuation of proteinuria, of immunoglobulin IgG and IgM deposition, and of induced CD4+ T cell apoptosis; moreover, a significant reduction in proliferative glomerular lesions and mononuclear cell infiltration was observed.

In the present study, we reproduced the set of kidney injuries of the pristane-induced LN mice model, both at glomerular and tubular level. In mice and in humans with active LN, IL-6, TNF- α and IFN- γ are overexpressed in kidney tissue, correlating with inflammatory injury scores relative to glomerular mesangial and proximal tubular epithelial cells [36]. Giving oral quercetin, we found a significant reduction in proteinuria, in the percentage of glomerular and tubular inflammation, and in the tissue expression of IL-6 and TNF- α . These findings were not previously described using quercetin for renal protection in LN, as they have been for other substances [30].

As emphasized by Hsieh et al [37] not only glomerular but tubulointerstitial inflammation and fibrosis determine prognosis and patient outcomes in LN, being an independent predictor of progressive loss of renal function and end-stage renal disease. Tubular epithelial-mesenchymal transition is induced by TGF- β 1 and perhaps by ROS through the phosphorylation of Smad proteins and mitogen-activated protein kinases, inducing the expression of collagens I, III, and IV [38]. In our study the pristane-induced

LN mice model showed a marked overexpression of TGF- β 1 in kidney tissue that was attenuated by quercetin. It is important to note that quercetin ameliorated renal fibrosis not only in SLE but also in diabetic nephropathy, either by inhibiting mTORC1/p70S6K signaling-mediated renal tubular epithelial-mesenchymal transition in diabetic renal cortex [39] or by reducing the expressions of pro-fibrotic TGF- β 1 and connective tissue growth factor in streptozocin-induced diabetic rats [13].

Lupus nephritis has been associated with intraglomerular cell apoptosis in which apoptotic nucleosomes bind to the glomerular basement membranes, being inducers and at the same time targets for the circulating autoantibodies to deposit in kidney tissue [40]. Furthermore, obesity and ROS are also potent mediators of apoptosis as both induce renal mitochondrial dysfunction and consequent release of cytochrome C, Bax and caspases which result in apoptotic cell death. As demonstrated by Stacchiotti et al [9] these mitochondrial alterations were modulated by melatonin supplementation in obese mice, changing mitochondria shape and cristae organization of proximal tubules and enhancing the expression of mitofusin-2, which in turn modulated the progression of the mitochondria-driven intrinsic apoptotic pathway. Our results with the pristane-induced LN model are in line with Stacchiotti's findings, where quercetin partially restored the cytoarchitecture of mitochondria, proximal and distal tubules as seen in the ultrastructural images of quercetin treated mice.

Pro apoptotic Bax and Fas-L are constitutively expressed in normal tubular epithelium, but in human LN the mRNA transcription of both proteins are increased in glomerular cells in correlation with higher inflammatory activity indexes [41]. Similar findings were described by Cui et al [42] who reported in LN increased expression of FasL, Bax and caspase-3 and apoptosis in glomerular, tubular epithelial, and inflammatory cells. We found an overexpression of Bax in the kidney tissue of pristane-

induced LN mice which was significantly reduced after administration of quercetin, in agreement with other authors treating alloxan-induced diabetic nephropathy with quercetin in dyslipidemic rats [12] and also in streptozocin-induced diabetic nephropathy in the C57BL/6J mice model [14].

Quercetin reduced the increase of oxidative stress mediated by pristane, restoring both higher levels of the antioxidants CAT and SOD1 in kidney tissue, and at the same time reducing lipid peroxidation, as measured by lower levels of TBARS. As a bioflavonoid, quercetin prevents the formation of ROS and consequent oxidant injury by diverse mechanisms, such as direct interaction with superoxide anions, by forming hydroxyl radicals chelating metal ions, and by scavenging oxygen radicals during lipid peroxidation [43]. Moreover, quercetin may increase the activity of SOD, CAT and glutathione peroxidase thus promoting radical scavenging, as demonstrated in experimental models of streptozocin-induced diabetic nephropathy [10,11,14], and in drug-induced renal injury in rats [44].

In pristane-induced lupus mice severe alterations in the kidney ultrastructure were found, and we highlight podocyte fusion and podocytopenia, damaged mitochondria, mesangial cell apoptosis and tubular oxidative damage. As compared to control mice, we found reduced tissue mRNA of podocyte proteins after pristane induction, however after quercetin treatment podocin mRNA expression was close to the levels found in control mice. Messenger RNA of podoplanin and of $\alpha 3\beta 1$ -integrin was also higher expressed in quercetin treated mice compared to pristane-induced mice, but these differences were not statistically significant. Growing evidence suggests that biomarkers of podocyte stress are associated with the progression of glomerular diseases, including LN, as observed in experimental [45] and clinical studies [46]. In both proliferative and non-proliferative forms of LN tissue mRNAs of podocyte proteins decrease in parallel with the increased

excretion of podocyte byproducts in urine [27], even in the early stages of LN [47], which are strong evidence of severe glomerular epithelial cell disarrangement. An abnormal release of pro inflammatory cytokines from aberrant T cells with a cytokine-related injury intrinsic to SLE was postulated as a pathogenic mechanism [48].

The wide spectrum of quercetin protective actions in animal models and in human disease have been extensively investigated in several scenarios [11]. Despite this, we did not found studies testing the effects of quercetin on pristane-induced LN mice model which emphasizes the need to further explore the potential of quercetin in this disease. To conclude, in this pristane-induced LN model quercetin treatment ameliorated kidney inflammatory cell infiltration, oxidative stress, apoptosis, fibrosis, and produced a significant recovery of glomerular podocytes, abnormal mitochondria, and mesangial cell apoptosis. Not only the therapeutic applications of quercetin have to be further evaluated, but also its metabolism, the interaction with other drugs, and the potential toxicity it may have in the long term.

Ethics approval and consent to participate

The present study was approved by the Animal Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil) and was conducted in accordance with National Institutes of Health guidelines.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) and by the Federal University of Rio Grande do Sul

(UFRGS), Brazil. We acknowledge the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil, for a scholarship offered to Mariane dos Santos, and for a grant provided by the CAPES-PSDE (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, number 88881.134006/2016-01).

Acknowledgements

We thank Luciano Pinto Guimarães for expert statistical assistance. The authors also thank Lorena Giugno for her precious technical support.

References

- [1] Zharkova O, Celhar T, Cravens PD, et al. Pathways leading to an immunological disease: systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2017;56:i55–66.
- [2] Borchers AT, Leibushor N, Naguwa SM, et al. Lupus nephritis: a critical review. *Autoimmun Rev*. 2012;12:174–194.
- [3] Almaani S, Meara A, Rovin BH. Update on Lupus Nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;825–835.
- [4] Chen YE, Korbet SM, Katz RS, et al. Value of a complete or partial remission in severe lupus nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:46–53.
- [5] Parikh S V., Rovin BH. Current and Emerging Therapies for Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27:2929–2939.
- [6] Satoh M, Kumar A, Kanwar YS, et al. Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:10934–10938.
- [7] Zhuang H, Szeto C, Han S, et al. Animal models of interferon signature positive lupus. *Front Immunol*. 2015;6:6–11.
- [8] dos Santos M, Poletti PT, Milhoransa P, et al. Unraveling the podocyte injury in lupus nephritis: Clinical and experimental approaches. *Semin Arthritis Rheum*. 2017;46:632–641.
- [9] Stacchiotti A, Favero G, Giugno L, et al. Mitochondrial and metabolic dysfunction in renal convoluted tubules of obese mice: protective role of melatonin. *PLoS One*. 2014;9:e111141.
- [10] Stacchiotti A, Li Volti G, Lavazza A, et al. Different role of Schisandrin B on mercury-induced renal damage in vivo and in vitro. *Toxicology*. 2011;286:48–57.
- [11] D’Andrea G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*. 2015;106:256–271.
- [12] Alam MM, Meerza D, Naseem I. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. *Life Sci*. 2014;109:8–14.
- [13] Lai PB, Zhang L, Yang LY. Quercetin ameliorates diabetic nephropathy by reducing the expressions of transforming growth factor- β 1 and connective tissue growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats. *Ren Fail*. 2012;34:83–87.
- [14] Gomes IBS, Porto ML, Santos MCLFS, et al. Renoprotective, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy. *Lipids Health Dis*. 2014;13:184.
- [15] Egert S, Bosy-Westphal A, Seiberl J, et al. Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr*. 2009;102:1065–1074.
- [16] Seo M-J, Lee Y-J, Hwang J-H, et al. The inhibitory effects of quercetin on obesity and obesity-induced inflammation by regulation of MAPK signaling. *J Nutr Biochem*. 2015;26:1308–1316.
- [17] Ishizawa K, Izawa-Ishizawa Y, Ohnishi S, et al. Quercetin Glucuronide Inhibits Cell Migration and Proliferation by Platelet-Derived Growth Factor in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Pharmacol Sci*. 2009;109:257–264.
- [18] Suwannaroj S, Lagoo A, Keisler D, et al. Antioxidants suppress mortality in the female NZB \times NZW F1 mouse model of systemic lupus erythematosus (SLE). *Lupus*. 2001;10:253–257.
- [19] Li W, Li H, Zhang M, et al. Quercitrin ameliorates the development of systemic

- lupus erythematosus-like disease in a chronic graft-versus-host murine model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;311:F217-F226.
- [20] Dos Santos M, Favero G, Bonomini F, et al. Oral supplementation of melatonin protects against lupus nephritis renal injury in a pristane-induced lupus mouse model. *Life Sci*. 2018;193:242-251.
- [21] Marcolin E, Forgiarini LF, Rodrigues G, et al. Quercetin decreases liver damage in mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2013;112:385–391.
- [22] Favero G, Trapletti V, Bonomini F, et al. Oral Supplementation of Melatonin Protects against Fibromyalgia-Related Skeletal Muscle Alterations in Reserpine-Induced Myalgia Rats. *Int J Mol Sci*. 2017;18:1389.
- [23] Stacchiotti A, Favero G, Lavazza A, et al. Hepatic Macrosteatosis Is Partially Converted to Microsteatosis by Melatonin Supplementation in ob/ob Mice Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One*. 2016;11:e0148115.
- [24] Rezzani R, Favero G, Stacchiotti A, et al. Endothelial and vascular smooth muscle cell dysfunction mediated by cyclophylin A and the atheroprotective effects of melatonin. *Life Sci*. 2013;92:875–882.
- [25] Agabiti-Rosei C, Favero G, De Ciuceis C, et al. Effect of long-term treatment with melatonin on vascular markers of oxidative stress/inflammation and on the anticontractile activity of perivascular fat in aging mice. *Hypertens Res*. 2017;40:41–50.
- [26] Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302–310.
- [27] Dos Santos M, Bringham RN, Rodrigues PG, et al. Podocyte-associated mRNA profiles in kidney tissue and in urine of patients with active lupus nephritis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:4600–4613.
- [28] Panickar KS, Jewell DE. The beneficial role of anti-inflammatory dietary ingredients in attenuating markers of chronic low-grade inflammation in aging. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2015;23:59–70.
- [29] Reeves WH, Lee PY, Weinstein JS, Satoh M, Lu L. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends Immunol*. 2009;30:455–464.
- [30] Freitas EC, de Oliveira MS, Monticeli OA. Pristane-induced lupus: considerations on this experimental model. *Clin Rheumatol*. 2017:1–12.
- [31] Lee KM, Hwang MK, Lee DE, et al. Protective effect of quercetin against arsenite-induced COX-2 expression by targeting PI3K in rat liver epithelial cells. *J Agric Food Chem*. 2010;58:5815–5820.
- [32] Angeloni C, Hrelia S. Quercetin reduces inflammatory responses in LPS-stimulated cardiomyoblasts. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:837104.
- [33] Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, et al. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med*. 2005;202:1575–1585.
- [34] Zhou L-LL, Wei W, Si J-FF, et al. Regulatory effect of melatonin on cytokine disturbances in the pristane-induced lupus mice. *Mediators Inflamm*. 2010;2010.
- [35] Wang Z-L, Luo X-F, Li M-T, et al. Resveratrol possesses protective effects in a pristane-induced lupus mouse model. *PLoS One*. 2014;9:e114792.
- [36] Yung S, Cheung KF, Zhang Q, et al. Mediators of inflammation and their effect on resident renal cells: implications in lupus nephritis. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:317682.
- [37] Hsieh C, Chang A, Brandt D, et al. Predicting outcomes of lupus nephritis with

- tubulointerstitial inflammation and scarring. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63:865–874.
- [38] Rhyu DY, Yang Y, Ha H, et al. Role of Reactive Oxygen Species in TGF- 1-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Activation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Renal Tubular Epithelial Cells. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:667–675.
- [39] Lu Q, Ji X-J, Zhou Y-X, et al. Quercetin inhibits the mTORC1/p70S6K signaling-mediated renal tubular epithelial–mesenchymal transition and renal fibrosis in diabetic nephropathy. *Pharmacol Res*. 2015;99:237–247.
- [40] Kalaaji M, Mortensen E, Jørgensen L, et al. Nephritogenic lupus antibodies recognize glomerular basement membrane-associated chromatin fragments released from apoptotic intraglomerular cells. *Am J Pathol*. 2006;168:1779–1792.
- [41] Badillo-Almaráz I, Daza L, Avalos-Díaz E, et al. Glomerular expression of Fas ligand and Bax mRNA in lupus nephritis. *Autoimmunity*. 2001;34:283–289.
- [42] Cui J-H, Qiao Q, Guo Y, et al. Increased apoptosis and expression of FasL, Bax and caspase-3 in human lupus nephritis class II and IV. *J Nephrol*. 2012;25:255–261.
- [43] Pereira Braga C, Momentti AC, Barbosa Peixoto F, et al. Influence of treatment with quercetin on lipid parameters and oxidative stress of pregnant diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013;91:171–177.
- [44] Elbe H, Dogan Z, Taslidere E, et al. Beneficial effects of quercetin on renal injury and oxidative stress caused by ciprofloxacin in rats: A histological and biochemical study. *Hum Exp Toxicol*. 2016;35:276–281.
- [45] Fukuda A, Wickman LT, Venkatareddy MP, et al. Urine podocin:nephrin mRNA ratio (PNR) as a podocyte stress biomarker. *Nephrol Dial Transpl*. 2012;27:4079–4087.
- [46] Wickman L, Afshinnia F, Wang SQ, et al. Urine podocyte mRNAs, proteinuria, and progression in human glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24:2081–2095.
- [47] Perysinaki GS, Moysiadis DK, Bertias G, et al. Podocyte main slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology. *Lupus*. 2011;20:781–791.
- [48] Kraft SW, Schwartz MM, Korbet SM, et al. Glomerular Podocytopathy in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:175–179.

7.2. Artigo 2

Oral supplementation of melatonin protects against lupus nephritis renal injury in a pristane-induced lupus mouse model

Mariane dos Santos^{a,1}, Gaia Favero^{b,1}, Francesca Bonomini^{b,c}, Alessandra Stacchiotti^{b,c},
Luigi Fabrizio Rodella^{b,c}, Francisco Veríssimo Veronese^a, Rita Rezzani^{b,c,*}

^aGraduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; Laboratory of Molecular Biology Applied to Nephrology, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^bAnatomy and Physiopathology Division, Department of Clinical and Experimental Sciences, University of Brescia, Viale Europa 11, 25123 Brescia, Italy

^cInterdipartimental University Center of Research “Adaption and Regeneration of Tissues and Organs- (ARTO)”, University of Brescia, Italy

*Corresponding author at: Anatomy and Physiopathology Division, Department of Clinical and Experimental Sciences, University of Brescia, Viale Europa 11, 25123 Brescia, Italy. E-mail address: rita.rezzani@unibs.it (R. Rezzani).

¹ These authors contributed equally to the present work.

Key words: Apoptosis Fibrosis Lupus, Mesangial cells, Oxidative stress Proximal tubule

Abstract

Aims: Since lupus nephritis (LN) etiopathogenesis is not fully understood, herein we investigated the morphological basis of LN in mice induced with pristane.

Main methods: To evaluate the melatonin effects in these animals, we studied the renal cytoarchitecture by means of morphological analyses, immunofluorescence expression of specific markers related to fibrosis, oxidative stress, inflammation and apoptosis.

Key findings: We observed that pristane-LN mice have serious alterations in the kidney cytoarchitecture, i.e. tubular degeneration, glomerular hypercellularity, matrix mesangial expansion and interstitial inflammation. The pristane-induced LN mice treated with melatonin exhibited a well preserved cytoarchitecture.

Significance: Our results document that LN etiopathogenesis is related to both tubular damage and glomerular lesions. We suggest that it is essential to take in consideration both these lesions for LN diagnosis and classification. Clearly, we show that the use of melatonin may be a possible therapeutic strategy for improvement the renal injury in this disorder.

Introduction

Lupus nephritis (LN) is one of the most severe complications of systemic lupus erythematosus (SLE), occurring in approximately half of SLE patients with high morbidity and mortality [1]. LN is characterized by proteinuria, hematuria and cellular casts, potentially leading to end-stage renal failure and to the requirement for dialysis or renal transplantation [2,3]. LN without treatment damages the kidney parenchyma which is then replaced by fibrotic tissue [4]. Moreover, LN has also been associated with an imbalance between oxidative and anti-oxidative activities leading to oxidative stress as a result of reactive oxygen species and reactive nitrogen species overproduction [5].

The current therapies used to treat SLE, including glucocorticoids and cyclophosphamide, suppress humoral immunity and the production of autoantibodies as well as helper T cells and B lymphocytes [6]. The objective of recent studies has been to treat patients in a personalized strategic manner that ameliorates long-term outcomes. Thus, efforts to identify and promote new therapeutic strategies that improve the course of disease or reverse its activity period, without causing collateral damage to unaffected tissues and organs, are urgently needed [7]. There are several SLE animal models that play an important role in investigating the mechanisms of this disease. One model is the pristane-induced lupus mouse model; these animals exhibit many clinical features of human lupus [8,9], developing significant proteinuria and kidney alterations consistent with the diffuse proliferative form of LN [9–11]. These symptoms observed in pristane-induced LN animal model lead to a significant alteration of renal function [12,13]. In detail, these mice have disparate T cell requirements of two subsets of lupus-specific autoantibodies as well as the toll-like receptor 7 (TLR7)-dependent and Fcγ receptor-independent production of type I interferon [7,10]. TLR7 is strictly involved in the production of autoantibodies and the development of LN [6,11]. Moreover, consistent

with the findings in humans, CD41 T cells and cytokines, play a pro-inflammatory role in pristane- induced LN [14]. Furthermore, a wide variety of autoantibody re- activity has been detected in patients with SLE [15] and the pristane- induced LN mice showed elevations in autoantibodies against many RNA-associated antigens, such as U1-snRNP complexes and RiboP [9]. Therefore, the pristane-LN mice model has important relevance to human disease [8,15].

Melatonin is a suitable and useful therapy for many conditions because of its multitasking properties [16]. Melatonin is a proven safe and remarkably well-tolerated indolamine particularly known for its antioxidant properties [16–18]. In addition to its antioxidant properties, melatonin also is antifibrotic and modulates apoptosis [19,20]. Melatonin has been used for the treatment of various experimental fibrotic diseases, including fibrotic renal diseases [21–23], pulmonary hypertension [24], liver fibrosis [22] and hypertrophic scar [21]. Interestingly, melatonin not only significantly attenuates fibrosis, but also improves organ physiology [21]. Accompanying the inhibition of renal fibrosis, melatonin also reduced leukocyte infiltration, via reduction in the expression of pro-inflammatory markers [23], and significantly reduces the apoptotic mechanisms after an acute unilateral ureteral obstruction [25] and in cardiorenal syndrome [26]. Ramamoorthy et al. observed that melatonin pretreatment inhibited NF- κ B and protected against tenofovir disoproxil fumarate-induced renal damage [18].

Since the LN etiopathogenesis is not fully understood, we investigated its morphological basis; to do so, we examined the involvement of fibrosis, oxidative stress, inflammation and apoptosis in this disease at the level of the kidney. Then, we evaluated whether melatonin is effective and its possible mechanism(s) of action in LN treatment.

The findings provide evidence that melatonin restores renal morphological alterations preventing induction of fibrosis, oxidative stress and inflammation.

Interestingly, regarding the effect of melatonin on apoptosis, we demonstrate that it modulates differently the apoptotic pathway in glomerular and tubular cells. Thus, we suggest that melatonin may be a valuable therapeutic alternative strategy for minimizing the kidney injury related to LN pathological processes.

Materials and methods

2.1. Experimental design

Fifty female mice BALB/c, at 8 weeks of age, were obtained from Federal University of Pelotas (Pelotas, Brazil). The care of animals used in the present study followed local and international guidelines in accordance also with the recommendations by the Research and Ethics Committee on Health Research Group and Graduate Studies of Clinical Hospital of Porto Alegre (Brazil).

BALB/c mice were randomly divided into the following five groups (ten animals per group): 1) Pristane-induced LN mice, which received 500 μ l of pristane (Sigma Aldrich, MO, USA) intraperitoneally [11–13]; 2) Control mice, which received 500 μ l of saline intraperitoneally (pristane vehicle); 3) Melatonin vehicle mice treated for six months with 1% ethanol dissolved in drinking water; 4) Melatonin control mice treated for six months with melatonin (10 mg/kg/day) dissolved in 1% ethanol and then in drinking water; 5) Pristane-induced LN mice treated for six months with melatonin (10 mg/kg/day) dissolved in 1% ethanol and then in drinking water; melatonin treatment began one day after pristane induction.

Animals were killed and the kidneys were removed for the following morphological, immunofluorescence, immunoenzymatical and ultra- structural analysis. For morphological and immunofluorescence analyses, the kidneys were dehydrated in

ethanol and embedded in paraffin wax, following standard protocol. Then, the samples were sectioned using a microtome (7 μm of section thick). Moreover, for the ultrastructural analysis pieces of renal tissue were removed and fixed in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer 0.1 M and post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in graded ethanol, incubated in propylene oxide and finally embedded in Epon mixture resin.

2.2. Hematoxylin staining

Histomorphological analysis of kidneys can be used to confirm and characterize nephritis severity [15,27]. Alternate paraffin-embedded sections were deparaffined, rehydrated and finally stained with hematoxylin-eosin staining, according to standard procedures. The stained sections were observed with a light microscopy (Olympus, Germany) at a final magnification of 400 \times , then the histopathological glomerular injury score was obtained, as reported by Furumoto et al. [28]. To this score we added also the assessment of tubular alterations. A minimum of 30 random kidney areas for each experimental animal were analyzed and for each section a score from (-) to (+++++) was assigned separately for glomeruli, proximal and distal tubules: (-): no alteration; (+/-) weak alteration, (+): mild alteration, (++) moderate alteration, (+++) marked alteration and (++++): extreme alteration. Scores from each individual mouse were averaged to yield the glomerular, proximal and distal tubules morphological injury scores of each experimental group.

The percentage of inflammatory infiltration at 100 random kidney fields was also calculated for each experimental animal. Furthermore, the glomerular cellularity was quantified by counting the total cell nuclei per glomerulus (at least 30 glomeruli for 5 sections for each experimental animal) and also a minimum of 50 randomly chosen

glomeruli were evaluated to detect the class of LN lesion, following the LN classification proposed by Weening et al. [29]. All measurements and analyses were performed in a blind fashion and using an image analyzer (Image Pro Premier 9.1, MediaCybernetics Inc., Rockville USA). Finally, pristane induction of LN was monitored histomorphologically in each experimental groups assigning an histological grade of progression from 0 to 4, as previously reported also by Bender et al. [15]. Key points of the histomorphological grading system were as follows: grade 0–1: normal renal cytoarchitecture; grade 2: minimal change characterized by weak glomerular hypercellularity, mesangial matrix broadening, capillary alterations and inflammatory cell infiltration; grade 3: moderate to marked change of much greater severity than grade 2, often affecting the majority of glomeruli together with moderate tubular dilatation and protein casts and grade 4: severe changes affecting the majority of glomeruli (often accompanied by glomerulosclerosis) and tubules.

2.3. Picrosirius red staining

Picrosirius red staining was used to quantify renal interstitial collagen deposition [30]. Randomly chosen 50 renal fields for each experimental animal were observed with a light microscopy (Olympus, Germany) at a final magnification of $400\times$ and in a blind manner. The determination of the different types of collagen content (percentage of area) was calculated using a computerized image analysis system (Image Pro Premier 9.1, Media Cybernetics Inc., Rockville USA), as previously reported by Bonomini et al. [31] and Rizzoni et al. [32].

2.4. Periodic acid Schiff (PAS) staining

Alternate embedded-paraffin sections were stained with PAS staining to detect intraglomerular mesangial proliferation and also proximal tubule brush boarder alterations [30,33]. For each experimental animal, a minimum of 50 randomly chosen renal fields were analyzed with a light microscopy (Olympus, Germany) at final magnification of 400 × and, using a computerized image analysis system (Image Pro Premier 9.1, Media Cybernetics Inc., Rockville USA), we measured the pink staining separately at glomerular and proximal tubules level. All measurements and analysis were performed in a blind fashion.

2.5. Immunofluorescence analysis

Kidney sections were processed for the immunofluorescence analyses of these primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA): anti-rabbit superoxide dismutase1 - SOD1 (diluted 1:200), anti-goat catalase - CAT (diluted 1:200), anti-mouse tumor growth factor-beta 1 - TGF-β1 (diluted 1:250), anti-goat interleukin-6 - IL-6 (diluted 1:200) and anti-rabbit Bax (diluted 1:200), following the immunofluorescence protocol and the histomorphometrical analysis reported previously by Agabiti-Rosei et al. [34] and Oliveira et al. [35].

2.6. Kidney interleukin-6 (IL-6) evaluation

The kidneys were homogenized, lysated and so subjected also to analyses of the levels of IL-6 using a specific ELISA assay kit and following the manufacturer's instruction (Abcam, Cambridge, UK).

2.7. Ultrastructural analysis

Ultrathin sections (70–80 nm of section thick) were processed for ultrastructural analyses using a transmission electron microscopy (TEM CM10 FEI), as previously reported by Favero et al. [36] and Stacchiotti et al. [37].

2.8. Statistical analysis

The data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Data for multiple variable comparisons were analyzed by one- way analysis of variance (ANOVA corrected Bonferroni test). $p \leq 0.05$ is considered significant for all statistical analysis performed in this study.

3. Results

3.1. Hematoxylin staining

We detected pathologic nephritic features at both the glomerular and tubular level, through the assessment of glomerular hypercellularity, renal inflammation and tubular degeneration characterized by also loss of epithelial cells or by proteins and/or mononuclear cells deposition in and narrowing the tubular lumen.

In the control groups treated with saline (vehicle of pristane) or treated with melatonin or melatonin vehicle (1% ethanol) there were no obvious kidney alterations. These results underline that these experimental groups are similar, so they are defined generically as “control mice” for the following morphological, histomorphometrical, immunoenzymatical and ultrastructural analysis.

There were also no differences in the renal cytoarchitecture between pristane-LN mice treated or not with 1% ethanol. So, both experimental groups are considered generically as “pristane-LN mice” for the following morphological, histomorphometrical, immunoenzymatical and ultrastructural analysis.

Pristane-LN mice exhibited kidney morphological damage relative to control mice. The damage observed in kidneys of pristane-LN mice involved inflammatory infiltration, glomerular mesangial cell proliferation, sclerosis of glomerular tuft (Fig. 1A), enlarged tubular epithelium, tubular lumen filled with protein aggregates and proximal tubules were often devoid of a brush border (Fig. 1B) with respect to kidneys of control mice (Fig. 1C, D). Kidneys of pristane-LN mice treated with melatonin showed a significant improvement of the cytoarchitecture, at both glomerular (Fig. 1E) and proximal and distal tubular (Fig. 1F) level.

The glomerular and tubular morphological injury scores are summarized in Table 1. Since there are no significant morphological differences between proximal and distal tubules, we show the overall scores titled generically as “tubules”.

Kidney of pristane-LN mice showed also a significant percentage of inflammatory cell infiltration (Fig. 1A, B) relative to those in kidneys of control mice (Fig. 1C, D); the latter showed absent/very weak inflammatory infiltration. Kidneys of pristane-LN mice treated with melatonin had a significant reduction of inflammatory infiltration (Fig. 1E, F). These observations are summarized in Table 2.

Pristane-LN mice showed significant increased of glomerular cellularity after 6 months of LN induction with compared to control mice. The treatment of pristane-LN mice with melatonin reduced significantly the glomerular hypercellularity. These observations are summarized in Fig. 1G.

Kidneys of pristane-LN mice exhibited mesangial broadening followed by global endo- or extra-capillary glomerulonephritis involving > 50% of total glomeruli. These observations consisted of diffuse proliferative LN, identify as Class IV-G LN. Interestingly, kidneys of pristane-LN mice treated with melatonin showed only mild mesangial broadening and few isolated subendothelial deposits, as typical of Class II LN.

Remarkably, pristane-LN mice exhibited a histomorphological profile of nephritis progression characterized by marked renal alterations, identified with grade 3, significant higher respect the degree of injury observed in the control mice (grade 0). The treatment with melatonin of pristane-LN mice showed a significant reduction of this histomorphological score, showing a histomorphological degree of LN progression < 2.

3.2. Sirius red staining

Sirius red morphometrical evaluation revealed that kidneys of pristane-LN mice exhibited a significant increase of tubular interstitial collagen deposition relative to kidneys of control mice, which showed absent/very weak interstitial collagen deposition. Kidneys of pristane- LN mice treated with melatonin had a significant reduction of tubular interstitial collagen deposition, restoring the “normal” kidney collagen deposition. Furthermore, we observed that type I collagen was significantly greater in kidneys of pristane-LN mice with respect to kidneys of control mice and, as for total collagen deposition, melatonin treatment showed a significant reduction of renal type I collagen.

Type III collagen amount was not significantly different among the experimental groups studied. The Fig. 2 summarizes the data reported above.

3.3. PAS staining

PAS staining revealed that kidneys of pristane-LN mice had an intense intraglomerular mesangial cell broadening (Fig. 3A) and proximal tubules devoid of brush border. Moreover, both proximal and distal tubules showed a reduction of epithelial cells (Fig. 3B). Kidneys of control mice exhibited absent/very weak mesangial matrix expansion (Fig. 3C) and normal cytoarchitecture of proximal and distal tubules; in detail, proximal tubules showed regular PAS-positive brush border (Fig. 3D). Interestingly, mesangial cell expansion was significantly reduced in kidneys of pristane-LN mice treated with melatonin (Fig. 3E). Melatonin prevented also the major alterations in proximal tubules, preserving the brush border that had a moderate PAS-positive staining like normal structures. Moreover, melatonin decreased the reduction of epithelial cells both in proximal and distal tubules (Fig. 3F). The Fig. 3G summarizes the morphometrical analysis of both intraglomerular mesangial matrix and proximal tubules brush border PAS-positive stainings.

Kidney expression of TGF- β 1 (green staining) was evaluated to better investigate the pro-fibrotic pathway involved in LN kidney injury. Kidneys of pristane-LN mice showed a moderate/strong expression of TGF- β 1, respectively, at glomerular and both proximal and distal tubules level (Fig. 4A), compared to kidneys of control mice that showed absent/very weak expression at glomerular, proximal and distal tubules (Fig. 4B).

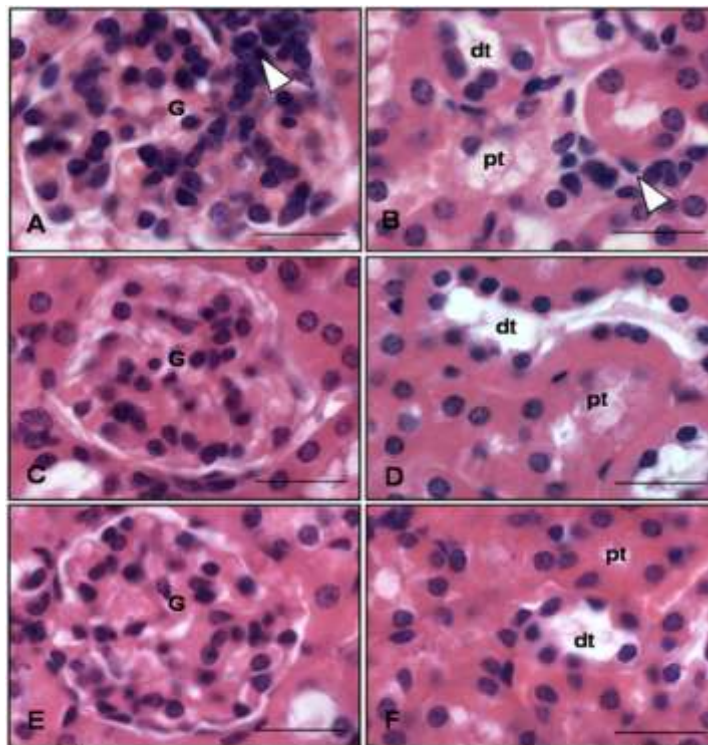


Fig. 1. Kidney morphology. Photomicrographs showing glomeruli, proximal and distal tubules hematoxylin-eosin staining of pristane-LN mice (A, B), control mice (C, D), pristane-LN mice treated with melatonin (E, F). Bar equals 20 μ m. (G): glomerulus; (pt): proximal tubule; (dt): distal tubule and arrowheads indicate inflammatory cells infiltration. The graph (G) summarizes the glomerular cellularity evaluation. $p \leq 0.05$ vs pristane-LN mice.

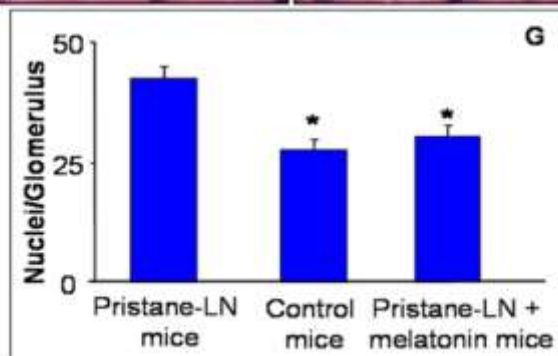


Table 1
Glomerular and tubular morphological injury scores. (-): no alteration; (+/-): weak alteration, (+): mild alteration, (++) moderate alteration and (+++): marked alteration.

Experimental group	Glomeruli	Tubules
Control	-	-
Control + melatonin	-	-
Control + melatonin vehicle	-	-
Pristane-LN	+++	+++
Pristane-LN + melatonin	+	+
Pristane-LN + melatonin vehicle	+++	+++

Table 2
Percentage of kidney inflammatory infiltration.

Experimental group	Inflammation (%)
Control	0.83
Control + melatonin	0.82
Control + melatonin vehicle	0.84
Pristane-LN	3.49
Pristane-LN + melatonin	1.2
Pristane-LN + melatonin vehicle	3.38

On the other hand, melatonin treatment of pristane- LN mice induces a significant renal reduction of the expression of this pro-fibrotic marker, showing very weak/weak expression at glomerular, proximal and distal tubular level (Fig. 4C).

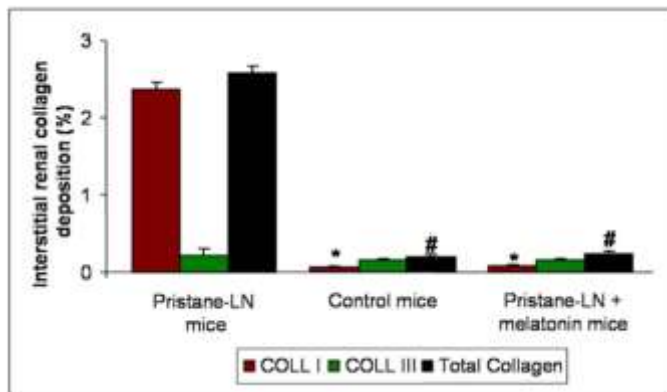


Fig. 2. Kidney interstitial fibrosis. The graph summarizes the morphometrical analysis of interstitial renal collagen deposition. COLL I: type I collagen fibers; COLL III: type III collagen fibers; $p \leq 0.05$ vs pristane-LN mice COLL I and # $p \leq 0.05$ vs pristane-LN mice total collagen.

These observations were confirmed also by the histomorphometrical analysis at glomerular, proximal and distal tubular level (Fig. 4D). Since there were no significant differences between TGF- β 1 proximal and distal tubular expressions, we show in the graph the mean value define generically as “tubules”.

Immunofluorescence analysis of CAT (identified in green) showed a significant reduction of its expression in kidneys of pristane-LN mice at glomerular, proximal and distal tubules level (weak expression) (Fig. 5A) with respect to kidneys of control mice showing weak/moderate expression at glomerular level and strong expression at both proximal and distal tubular level (Fig. 5B). Furthermore, kidneys of pristane-LN mice treated with melatonin showed a significant increase of CAT expression at glomerular, proximal and distal tubular level (Fig. 5C).

We investigated also the antioxidant enzyme SOD1 (identified in red) and we observed a trend similar to that observed for CAT. In other words, kidneys of pristane-LN mice had a weak SOD1 expression at glomerular and tubular level (both proximal and distal tubules) (Fig. 5D) with respect to kidneys of control mice showing weak/moderate expression at glomerular level and strong expression at both proximal and distal tubular level (Fig. 5E). Kidneys of pristane-LN mice treated with melatonin showed a significant increase of SOD1 expression at glomerular, proximal and distal tubular level (Fig. 5F). CAT (Fig. 5G) and SOD1 (Fig. 5H) at glomerular, proximal and distal tubular level. Since there were no significant differences between both CAT and SOD1 proximal

and distal tubular expressions, we display in the graphs the mean values define generically as “tubules”.

To investigate also inflammation and apoptosis in LN pathogenesis, the kidney expression of IL-6 (green staining) and Bax (red staining) are evaluated. Kidneys of pristane-LN mice showed a moderate/strong expression of IL-6 inflammatory enzyme at glomerular and both proximal and distal tubules level (Fig. 6A) with respect to kidneys of control mice (absent/very weak expression) (Fig. 6B). Melatonin treatment of pristane-LN mice exhibited a significant reduction of the renal expression of IL-6 at glomerular and tubular level (both proximal and distal tubules), (Fig. 6C).

Kidneys of pristane-LN mice also had a moderate/strong expression of the proapoptotic marker Bax at glomerular and tubular level (both proximal and distal tubules) (Fig. 6D), with respect to kidneys of control mice that showed absent/weak expression at glomerular, proximal and distal tubules level (Fig. 6E). Interestingly, kidneys of pristane-LN mice treated with melatonin showed a weak expression of Bax at both proximal and distal tubular level, but a moderate expression at glomerular level (Fig. 6F).

These observations were confirmed also by the histomorphometrical analysis of renal IL-6 (Fig. 6G) and Bax (Fig. 6H) at glomerular, proximal and distal tubular level. Since there were no significant differences between both IL-6 and Bax proximal and distal tubular expressions, we show in the graphs the mean values define generically as “tubules”.

3.4. Kidney interleukin-6 (IL-6) evaluation

As summarized in Fig. 7, the ELISA evaluation of kidney IL-6 confirmed the data obtained through the histomorphometrical analyses. In brief, pristane-LN mice showed a

higher IL-6 kidney concentration respect to control mice, that had weak renal IL-6 level. Remarkably, melatonin treatment of pristane-LN mice reduced significantly kidney IL-6, reaching concentration value comparable to kidney of control mice.

3.5. Ultrastructural analysis

Using ultrastructural analysis, we evaluated glomerular, proximal and distal tubular features in different experimental groups. Kidneys of pristane-LN mice showed important glomerular damage: evident foot process effacement, basal membrane thickening, apoptotic mesangial cells with condensed nuclei, typically of apoptotic cells, and matrix broadening (Fig. 8A). Ultrastructural features of tubular oxidative damage and interstitial fibrosis were apparent in kidneys of pristane-LN mice together with apoptotic cells in both proximal and distal tubules (Fig. 8B). In the proximal tubules we noted also brush border detachment and, in particular, abnormal mitochondria with disrupted cristae, as it is evident in Fig. 8C. Also, distal tubules showed basal labyrinth folding often filled with round mitochondria devoid of cristae and an amorphous matrix (data not showed). On the other hand, kidneys of control mice presented well-defined renal ultrastructure showing also, in proximal and distal tubules, that the mitochondrial shape was elongated and the cristae were well preserved (data not showed). When we analyze kidney of pristane-LN mice treated with melatonin the glomerular tuft showed almost regular organization, well preserved foot processes of podocytes, limited mesangial matrix broadening, but also apoptotic mesangial nuclei (Fig. 8D). Remarkably, proximal and distal tubules showed a “normal” ultrastructure features and, in particular, proximal tubules have a regular and continuous brush border (Fig. 8E). Furthermore, proximal and distal tubules showed numerous, well preserved and elongated

mitochondria with clear cristae. Fig. 8F shows restored proximal tubular mitochondria.

4. Discussion

The renal alterations induced by pristane in this mouse model were severe and were significantly reduced by melatonin co-treatment. We evaluated the renal alterations caused by a single intraperitoneal pristane injection, through morphological analyses and immunohistochemical expression of specific markers related to fibrosis, oxidative stress, inflammation and apoptosis.

We observed that pristane-LN mice have serious alterations in the kidney cytoarchitecture and confirmed that these animals exhibit many features of human LN [8]. Similar results have been recorded in previous studies in which LN mice had morphological alterations such as glomerulonephritis, characterized by mesangial broadening, hyper-segmentation and sclerosis of glomerular tufts [9,33,34]. In particular, according to Gardet et al. the lesions are related to prominent kidney interstitial inflammation and fibrosis, which were both associated with poor prognosis in human LN [38]. These data confirm the sharing of many histopathologic features of human LN [8,39].

Significant tubular injury, ranging from enlarged epithelial cells to interstitial fibrosis, was observed in the current study. Tubular epithelial cells interact with inflammatory cells secreting pro-inflammatory mediators, including monocyte chemo-

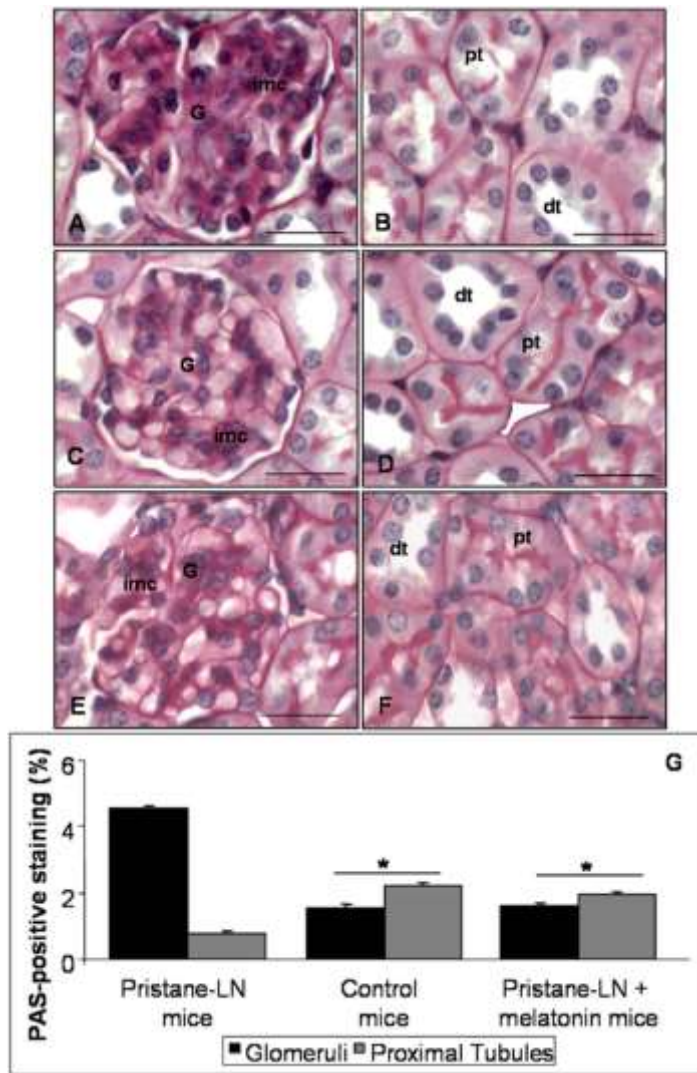


Fig. 3. Intraglomerular mesangial matrix and proximal tubules brush border. Photomicrographs showing glomeruli, proximal and distal tubules PAS staining of pristane-LN mice (A, B), control mice (C), pristane-LN mice treated with melatonin (E, F). Bar equals 20 μ m. The graph (G) summarizes the morpho- metrical analysis of intraglomerular mesangial matrix and proximal tubules brush border PAS-positive stainings. $p \leq 0.05$ vs pristane-LN mice. (G): glomerulus; (imc): intraglomerular mesangial cell; (pt): proximal tubule; (dt): distal tubule.

attractant protein 1, CD40, and Toll-like receptor 9 [40] eliciting a variety of responses to protein overload. In fact, an increasing amount of data supports that tubular lesions are predictive of progression in renal disease strongly indicating the decline in the function of the organ [41,42]. Further, these latter authors highlighted the importance of interstitial processes in determining prognosis of this disease. Paradoxically, these tubular lesions are not considered in the current classification of Weening et al. [29], as also previously reported [43]. So, we suggest that it is very important to take in consideration not only glomerular lesions, but also tubulointerstitial alterations in predicting renal outcome.

LN involves the release of pathogenic mediators which worsen glomerular mesangial and tubular epithelial cell damage, such as inflammatory cytokines and reactive

oxygen species [5,40]. The role of these pathological processes in the triggering of the LN disease is yet to be determined. Regarding these findings, we observed a significant reduction of the expression of CAT and SOD1 antioxidants in pristane- LN mice, these data are in agreement with human clinical evidences that showed an increase of reactive oxygen species production and an inadequate endogenous antioxidant defense of patients with LN [44]. Furthermore, we noted in pristane-LN mice a significant rise of TGF- β 1 and IL-6 expressions at both glomerular and tubular levels, as also previously observed also in human [45–47]. These authors demonstrated that, in chronic progressive renal disease, TGF- β 1 and IL-6 signaling are part of a conceptual framework consolidating patho-mechanisms of the progression of glomerular and tubulointerstitial disease.

It is known that TGF- β 1 is considered as a main factor in the promotion of epithelial-to-mesenchymal transdifferentiation, which induces renal fibrosis [48]. Moreover, glomerular morphological injury is a potent inducer for IL-6 generation in tubular epithelial cells, which presents one aspect of glomeruli-tubules cross talk [49]. The inflammatory infiltration in the tubular interstitium and in the glomeruli, a prominent feature in both human and mice LN, induces the secretion of inflammatory cytokines and chemokines that contribute to the apoptosis of both glomerular mesangial cells and tubular epithelial cells [10,50,51].

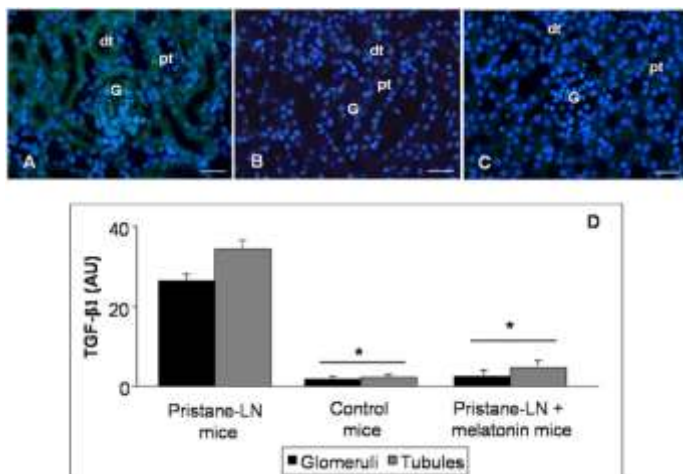


Fig. 4. Kidney tumor growth factor-beta1 (TGF- β 1) evaluation. Photomicrographs showing renal TGF- β 1 (green staining) immunofluorescence of pristane-LN mice (A), control mice (B) and pristane-LN mice treated with melatonin (C). Bar equals 20 μ m. The graph (D) summarizes the TGF- β 1 histomorphometrical analysis of all experimental groups. $p \leq 0.05$ vs pristane-LN mice. (G): glomerulus; (pt): proximal tubule; (dt): distal tubule. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Considering the critical role of apoptosis in the development and outcomes of kidney diseases [50,52], we investigated also Bax, a pro- apoptotic marker [53,54]. In pristane-LN mice Bax expression was elevated in renal tubular epithelial cells and moderately in glomerular mesangial cells, with respect to control mice who showed very weak renal Bax expression. These data are in agreement with the previous study of Cui et al. who observed a Bax expression in glomerular parenchymal cells and tubular epithelial cells of LN patients [55].

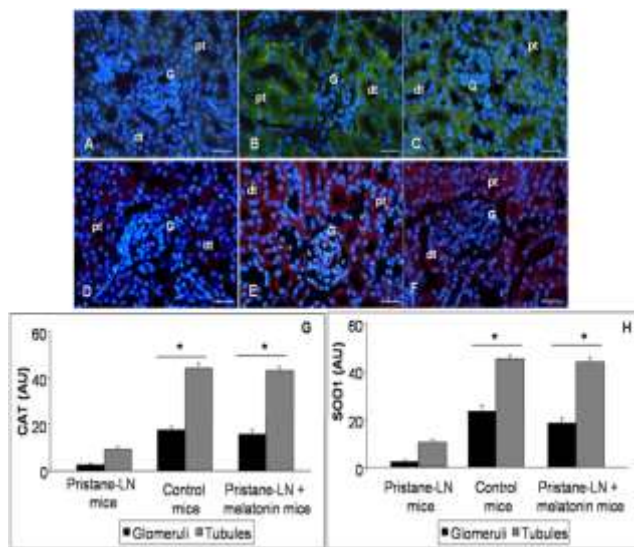


Fig. 5. Kidney catalase (CAT) and superoxide dismutase1 (SOD1) evaluation. Photomicrographs showing renal CAT (A- C; green staining) and SOD1 (D-F; red staining) immunofluorescence of pristane- LN mice (A, D), control mice (B, E), pristane-LN mice treated with melatonin (C, F). Bar equals 20 μ m. (G): glomerulus; (pt): proximal tubule; (dt): distal tubule. The graphs summarize the CAT (G) and SOD1 (H) histomorphometrical analysis of all experimental groups. $p \leq 0.05$ vs pristane-LN mice. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

In addition to an adequate LN animal model that is needed for the identification of markers related to pathogenesis, increasing research efforts are required to understand the molecular mechanisms underlying kidney injury to identify new therapeutic approaches. Thus, the present study also evaluated the effects of melatonin treatment against kidney injury induced by LN. Melatonin treatment of pristane-LN mice lessened morphological lesions caused by LN pathogenesis, restoring a “normal” renal morphology and cytoarchitecture. In fact, pristane-LN mice treated with melatonin showed a significant increase of the expression of CAT and SOD1 at proximal and distal tubular level. We suggest that the treatment suppressed kidney LN alterations through indirect inhibition

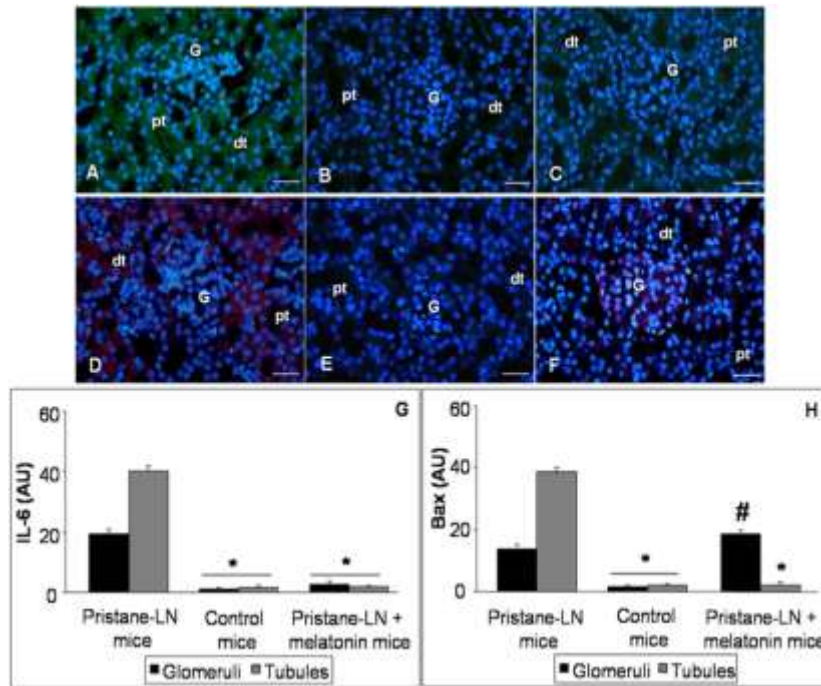


Fig. 6. Kidney interleukin-6 (IL-6) and Bax evaluation. Photomicrographs showing renal IL-6 (green staining) and Bax (red staining) immunofluorescence of pristane- LN mice (A, D), control mice (B, E), pristane-LN mice treated with melatonin (C, F). Bar equals 20 μ m. The graphs summarize the IL-6 (G) and Bax (H) histomorphometrical analysis of all experimental groups. $p \leq 0.05$ vs pristane-LN mice and $\#p \leq 0.05$ vs control mice. (G): glomerulus; (pt): proximal tubule; (dt): distal tubule. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

oxidative injury of tubules, due to the well-known antioxidant melatonin ability [13,14,56].

Melatonin treatment also significantly lowered TGF- β 1 expression and, consequently, reduced the mesangium broadening and hampered tubular apoptosis and interstitial fibrosis. These observations are in agreement with previous reports indicating that melatonin has important antifibrotic effect in various experimental fibrotic conditions [21,22].

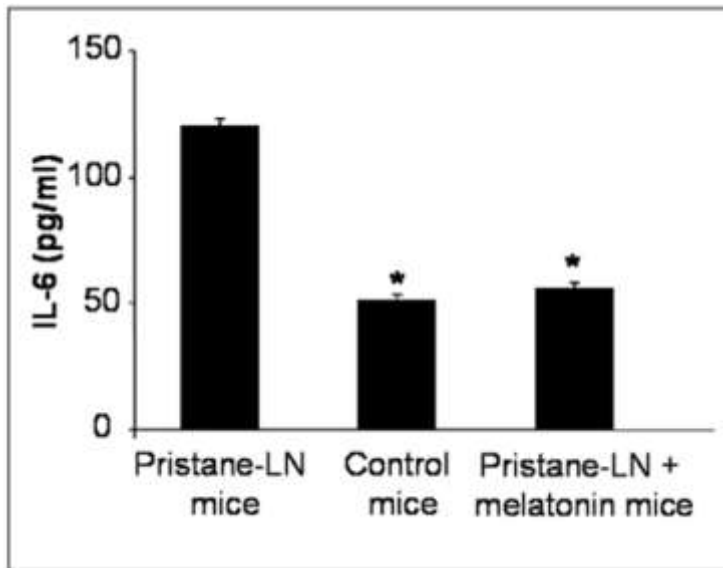


Fig. 7. Kidney interleukin-6 (IL-6) concentration. The graph summarized the IL-6 renal concentrations expressed in pg/ml. $p \leq 0.05$ vs pristane-LN mice.

We observed also that melatonin treatment determined a significant renal decrease of the IL-6 expression and a specific Bax modulation. These results are consistent with a previous report of Zhou et al., which showed that pristane-induced lupus mice display an imbalance of cytokine network with increasing level of IL-6 that, in turn, induces B cells to secrete more antibodies and promote the development of nephritis [57]. Furthermore, these authors showed that the downregulation of IL-6 production by melatonin was helpful in inhibiting renal damage in this animal model. The effect on Bax expression could be due to its direct anti-apoptotic properties [20,25,26,33,56] or to its indirect action in counteracting, as previously reported, inflammation and fibrosis that, in turn, does not promote the apoptotic pathway. It is important to underline that melatonin treatment of pristane-LN mice showed, also, a moderate expression of Bax at glomerular level. This is important because the defective clearance of apoptotic debris may sustain and accelerate autoimmunity, mesangial broadening and kidney inflammation [18,28]. In particular, the observation on Bax glomerular expression may be related on the melatonin attempt to eliminate activated and proliferating mesangial cells through apoptosis, allowing the return of the “normal” renal cytoarchitecture due to the multitasking melatonin properties [16,58].

Recently other novel approaches for the management of LN using antioxidant compounds, such as salvianolic acid A and resveratrol, have been studied in the same LN animal model [6,11]. These studies suggested the potential effects of these compounds in alleviating LN renal dysfunction and histological damages mainly at glomerular level. The current study provides convincing evidence about the efficacy of melatonin treatment in attenuating and ameliorating the progression kidney LN-induced injury, showing that, together with the important antioxidant melatonin mechanism of action, part of the beneficial effects of this indolamine are due to the protection of also tubular epithelial

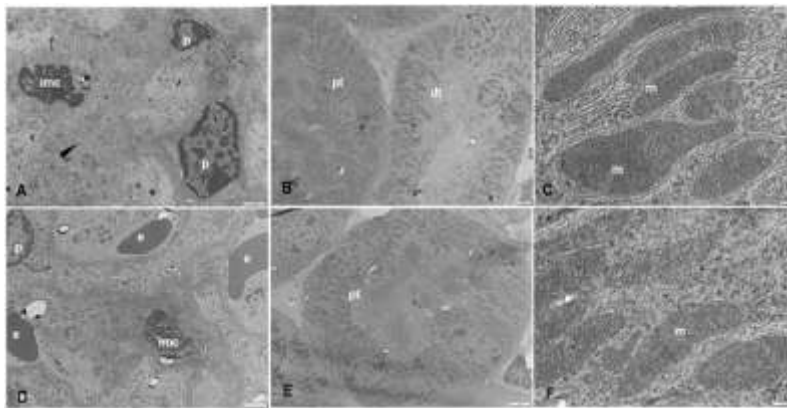


Fig. 8. Kidney ultrastructural evaluation. Photomicrographs showing glomeruli, proximal and distal tubules and proximal tubular mitochondria of pristane-LN mice (A–C) and pristane-LN mice treated with melatonin (D–F). (dt): distal tubule; (e): erythrocyte; (imc): intraglomerular mesangial cell; (m) mitochondria; (p): podocyte; (pt): proximal tubule and arrowhead indicates mesangial matrix broadening. Bars A, D: 1 μ m; B, E: 2 μ m; C, F: 200 nm.

cells and to its particular pro- and anti-apoptotic effects. This was especially obvious considering that melatonin-induced apoptosis at mesangial cell level may be a response to counteract mesangium proliferation in LN. These results underline the fundamental opposite pro- and anti-apoptotic melatonin effects as previously reported by also Bizzarri et al. [59] and Reiter et al. [16]. These authors suggest that melatonin has a pro-apoptotic action against cancer cells but also a diametrically opposite anti-apoptotic function in normal cells.

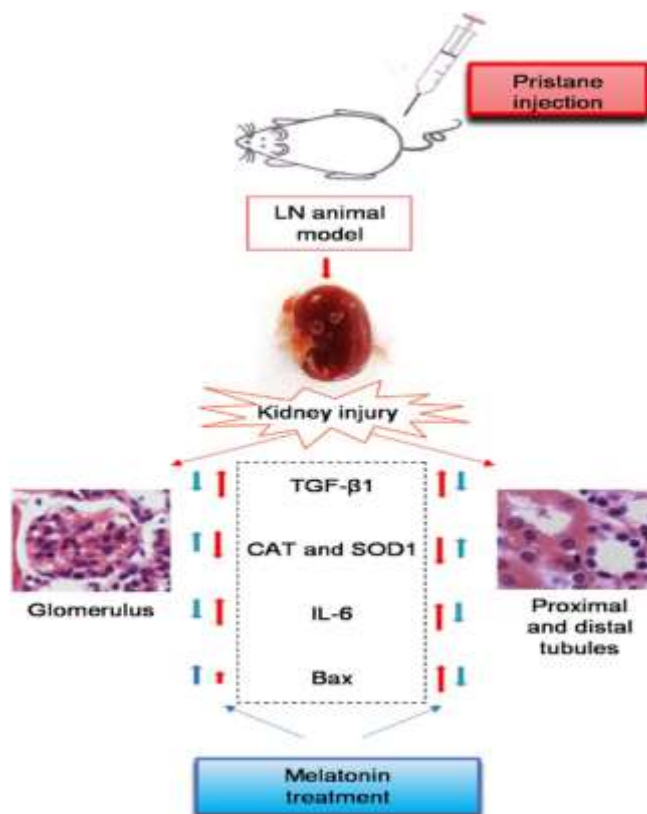


Fig. 9. Lupus nephritis kidney injury and melatonin effects. Schematic representation of lupus nephritis kidney injury at glomerular, proximal and distal tubules and of melatonin effects against lupus nephritis renal alterations. It is important to underline that this indolamine is able to modulate differently the apoptotic pathway in glomerular and tubular cells. The red arrows indicate the effect of pristane injection, whereas the blue arrows denote the significant melatonin treatment effects. CAT: catalase; IL-6: interleukin-6; LN: lupus nephritis; SOD1: superoxide dismutase1; TGF- β 1: tumor growth factor-beta1. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Conclusions

In summary, we suggest that melatonin oral treatment, at the final dose of 10 mg/kg/day, via its important antifibrotic, antioxidative, anti-inflammatory and dual and opposite pro- and anti-apoptotic effects may block LN-related kidney injury (Fig. 9). However, further studies are necessary to establish the more effective dose of melatonin and to better understand the melatonin mechanism(s) of action and regulating processes.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by Fundo de incentivo à Pesquisa (FIPE/ HCPA) of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS, Brazil), Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - CAPES (Brazil) grant and CAPES-PDSE (Brazil) grant (number: 88881.134006/ 2016-01).

The authors sincerely thank also FLAMMA S.p.A. (Italy) for courteously providing melatonin.

References

- [1] J.G. Hanly, A.G. O'Keeffe, L. Su, et al., The frequency and outcome of lupus nephritis: results from an international inception cohort study, *Rheumatology (Oxford)* 55 (2016) 252–262.
- [2] A.T. Borchers, N. Leibushor, S.M. Naguwa, et al., Lupus nephritis: a critical review, *Autoimmun. Rev.* 12 (2012) 174–194.
- [3] O.P. Kulkarni, H.J. Anders, Lupus nephritis. How latest insights into its pathogenesis promote novel therapies, *Curr. Opin. Rheumatol.* 24 (2012) 457–465.
- [4] S. Yung, T.M. Chan, Mechanisms of kidney injury in lupus nephritis - the role of anti-dsDNA antibodies, *Front. Immunol.* 6 (2015) 1–11.
- [5] U. Minhas, P. Das, A. Bhatnagar, Role of reactive intermediates in the immunopathogenesis of the pristane-induced Balb/c model of lupus, *Lupus* 20 (2011) 1421–1425.
- [6] Z.L. Wang, X.F. Luo, M.T. Li, et al., Resveratrol possesses protective effects in a pristane-induced lupus mouse model, *PLoS One* 9 (2014) e114792.
- [7] M. Aparicio-Soto, M. Sánchez-Hidalgo, C. Alarcón-de-la-Lastra, An update on diet and nutritional factors in systemic lupus erythematosus management, *Nutr. Res. Rev.* 30 (2017) 118–137.
- [8] L. Bossaller, A. Christ, K. Pelka, et al., TLR9 deficiency leads to accelerated renal disease and myeloid lineage abnormalities in pristane-induced murine lupus, *J. Immunol.* 197 (2016) 1044–1053.
- [9] W.H. Reeves, P.Y. Lee, J.S. Weinstein, et al., Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons, *Trends Immunol.* 30 (2009) 455–464.
- [10] L. Huang, Y. Kong, J. Wang, et al., Reducing progression of experimental lupus nephritis via inhibition of the B7/CD28 signaling pathway, *Mol. Med. Rep.* 12 (2015) 1–9.
- [11] Y. Lin, Y. Yan, H. Zhang, et al., Salvianolic acid A alleviates renal injury in systemic lupus erythematosus induced by pristane in BALB/c mice, *Acta Pharm. Sin. B* 7 (2017) 159–166.
- [12] C. Liu, Y. Kanamaru, T. Watanabe, et al., Targeted IgA Fc receptor I (Fc α RI) therapy in the early intervention and treatment of pristane-induced lupus nephritis in mice, *Clin. Exp. Immunol.* 181 (2015) 407–416.

- [13] M. Satoh, A. Kumar, Y.S. Kanwar, et al., Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 10934–10938.
- [14] D. Odobasic, R.C. Muljadi, K.M. O'Sullivan, et al., Suppression of autoimmunity and renal disease in pristane-induced lupus by myeloperoxidase, *Arthritis Rheum.* 67 (2015) 1868–1880.
- [15] A.T. Bender, Y. Wu, Q. Cao, et al., Assessment of the translational value of mouse lupus models using clinically relevant biomarkers, *Transl. Res.* 163 (2014) 515–532.
- [16] R.J. Reiter, D.X. Tan, A. Galano, Melatonin: exceeding expectations, *Physiology (Bethesda)* 29 (2014) 325–333.
- [17] A. Leibowitz, A. Volkov, K. Voloshin, et al., Melatonin prevents kidney injury in a high salt diet-induced hypertension model by decreasing oxidative stress, *J. Pineal Res.* 60 (2016) 48–54.
- [18] H. Ramamoorthy, P. Abraham, B. Isaac, et al., Role for NF- κ B inflammatory signalling pathway in tenofovir disoproxil fumarate (TDF) induced renal damage in rats, *Food Chem. Toxicol.* 99 (2017) 103–118.
- [19] J. Hrenak, L. Paulis, K. Repova, et al., Melatonin and renal protection: novel perspectives from animal experiments and human studies (review), *Curr. Pharm. Des.* 21 (2015) 936–949.
- [20] A. Hosseinzadeh, S.K. Kamrava, M.T. Joghataei, et al., Apoptosis signaling pathways in osteoarthritis and possible protective role of melatonin, *J. Pineal Res.* 61 (2016) 411–425.
- [21] W. Hu, Z. Ma, S. Jiang, et al., Melatonin: the dawning of a treatment for fibrosis? *J. Pineal Res.* 60 (2016) 121–131.
- [22] J.W. Kang, J.M. Hong, S.M. Lee, Melatonin enhances mitophagy and mitochondrial biogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis, *J. Pineal Res.* 60 (2016) 383–393.
- [23] E. Ozbek, Y.O. Ilbey, M. Ozbek, et al., Melatonin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal injury by reducing oxidative stress, iNOS, MAPK, and NF- κ B expression, *J. Endourol.* 23 (2009) 1165–1173.
- [24] G. Maarman, D. Blackhurst, F. Thienemann, et al., Melatonin as a preventive and curative therapy against pulmonary hypertension, *J. Pineal Res.* 59 (2015) 343–353.

- [25] M.E. Yildirim, H. Badem, M. Cakmak, et al., Melatonin protects kidney against apoptosis induced by acute unilateral ureteral obstruction in rats, *Cent. Eur. J Urol.* 69 (2016) 225–230.
- [26] S. Chua, F.Y. Lee, H.J. Chiang, et al., The cardioprotective effect of melatonin and exendin-4 treatment in a rat model of cardiorenal syndrome, *J. Pineal Res.* 61 (2016) 438–456.
- [27] C. Molino, F. Fabbian, C. Longhini, Clinical approach to lupus nephritis: recent advances, *Eur. J. Intern. Med.* 20 (2009) 447–453.
- [28] Y. Furumoto, C.K. Smith, L. Blanco, et al., Tofacitinib ameliorates murine lupus and its associated vascular dysfunction, *Arthritis Rheum.* 69 (2017) 148–160.
- [29] J.J. Weening, V.D. D'Agati, M.M. Schwartz, et al., The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited, *Kidney Int.* 65 (2004) 521–530.
- [30] P. Nakagawa, J.X. Masjoan-Juncos, H. Basha, et al., Effects of N-acetyl-seryl-asparyl-lysyl-proline on blood pressure, renal damage, and mortality in systemic lupus erythematosus, *Phys. Rep.* 5 (2017) e13084.
- [31] F. Bonomini, S. Taurone, P. Parnigotto, et al., Role of parnaparin in atherosclerosis, *Int. J. Exp. Pathol.* 97 (2016) 457–464.
- [32] D. Rizzoni, E. Porteri, C. De Ciuceis, et al., Effect of treatment with candesartan or enalapril on subcutaneous small artery structure in hypertensive patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus, *Hypertension* 45 (2005) 659–665.
- [33] A. Stacchiotti, G. Favero, L. Giugno, et al., Mitochondrial and metabolic dysfunction in renal convoluted tubules of obese mice: protective role of melatonin, *PLoS One* 9 (2014) e111141.
- [34] C. Agabiti-Rosei, G. Favero, C. De Ciuceis, et al., Effect of long-term treatment with melatonin on vascular markers of oxidative stress/inflammation and on the anticontractile activity of perivascular fat in aging mice, *Hypertens. Res.* 40 (2017) 41–50.
- [35] V.A. Oliveira, G. Favero, A. Stacchiotti, et al., Acute mercury exposition of virgin, pregnant, and lactating rats: histopathological kidney and liver evaluations, *Environ. Toxicol.* 32 (2017) 1500–1512.
- [36] G. Favero, A. Stacchiotti, S. Castrezzati, et al., Melatonin reduces obesity and restores adipokine patterns and metabolism in obese (ob/ob) mice, *Nutr. Res.* 35 (2015) 891–900.

- [37] A. Stacchiotti, G. Favero, A. Lavazza, et al., Hepatic macrosteatosis is partially converted to microsteatosis by melatonin supplementation in ob/ob mice non-alcoholic fatty liver disease, *PLoS One* 11 (2016) e0148115.
- [38] A. Gardet, W.C. Chou, T.L. Reynolds, et al., Pristane-accelerated autoimmune disease in (SWR X NZB) F1 mice leads to prominent tubulointerstitial inflammation and human lupus nephritis-like fibrosis, *PLoS One* 11 (2016) e0164423.
- [39] L.M. Ortega, D.R. Schultz, O. Lenz, et al., Review: lupus nephritis: pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions, *Lupus* 19 (2010) 557–574.
- [40] M. Faurschou, M. Penkowa, C.B. Andersen, et al., The renal metallothionein expression profile is altered in human lupus nephritis, *Arthritis Res. Ther.* 10 (2008) R76.
- [41] J.L. Gorriz, A. Martinez-Castelao, Proteinuria: detection and role in native renal disease progression, *Transplant. Rev. (Orlando)*. 26 (2012) 3–13.
- [42] C. Hsieh, A. Chang, D. Brandt, et al., Predicting outcomes of lupus nephritis with tubulointerstitial inflammation and scarring, *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. 63 (2011) 865–874.
- [43] F. Yu, Wu L-H, Y. Tan, et al., Tubulointerstitial lesions of patients with lupus nephritis classified by the 2003 International Society of Nephrology and Renal Pathology Society system, *Kidney Int.* 77 (2010) 820–829.
- [44] G. Moroni, C. Novembrino, S. Quaglini, et al., Oxidative stress and homocysteine metabolism in patients with lupus nephritis, *Lupus* 19 (2010) 65–72.
- [45] E.P. Böttinger, M. Bitzer, TGF-beta signaling in renal disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (2002) 2600–2610.
- [46] Q. Ouyang, Z. Huang, Z. Wang, et al., Effects of pristane alone or combined with chloroquine on macrophage activation, oxidative stress, and Th1/Th2 skewness, *J Immunol Res* 2014 (2014) 1–9.
- [47] S. Yung, C.Y. Ng, S.K. Ho, et al., Anti-dsDNA antibody induces soluble fibronectin secretion by proximal renal tubular epithelial cells and downstream increase of TGF- β 1 and collagen synthesis, *J. Autoimmun.* 58 (2015) 111–122.
- [48] M. Kitai, N. Fukuda, T. Ueno, et al., Effects of a spleen tyrosine kinase inhibitor on progression of the lupus nephritis in mice, *J. Pharmacol. Sci.* 134 (2017) 29–36.
- [49] H. Su, C.T. Lei, C. Zhang, Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: an update, *Front. Immunol.* 8 (2017) 405.

- [50] T. Jiang, F. Tian, H. Zheng, et al., Nrf2 suppresses lupus nephritis through inhibition of oxidative injury and the NF- κ B-mediated inflammatory response, *Kidney Int.* 85 (2014) 333–343.
- [51] S. Yung, K.F. Cheung, Q. Zhang, et al., Mediators of inflammation and their effect on resident renal cells: implications in lupus nephritis, *Clin. Dev. Immunol.* 317682 (2013) 2013.
- [52] N. Ueda, G.P. Kaushal, S.V. Shah, Apoptotic mechanisms in acute renal failure, *Am. J. Med.* 108 (2000) 403–415.
- [53] D. Liu, N. Zhang, J. Zhang, et al., miR-410 suppresses the expression of interleukin-6 as well as renal fibrosis in the pathogenesis of lupus nephritis, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 43 (2016) 616–625.
- [54] S. Yamagishi, Y. Inagaki, T. Okamoto, et al., Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 20309–20315.
- [55] J.H. Cui, Q. Qiao, Y. Guo, et al., Increased apoptosis and expression of FasL, Bax and caspase-3 in human lupus nephritis class II and IV, *J. Nephrol.* 25 (2012) 255–261.
- [56] R.J. Reiter, J.C. Mayo, D.X. Tan, et al., Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers, *J. Pineal Res.* 61 (2016) 253–278.
- [57] L.L. Zhou, W. Wei, J.F. Si, et al., Regulatory effect of melatonin on cytokine disturbances in the pristane-induced lupus mice, *Mediat. Inflamm.* 2010 .
- [58] J. Reiter, D.X. Tan, L. Fuentes-Broto, Melatonin: a multitasking molecule, *Prog. Brain Res.* 181 (2010) 127–151.
- [59] M. Bizzarri, S. Proietti, A. Cucina, et al., Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review, *Expert Opin. Ther. Targets* 17 (2013) 1483–1496.

7.3. Artigo 3

Unraveling the podocyte injury in lupus nephritis: Clinical and experimental approaches

Mariane dos Santos^{1,2}, Priscila Tamar Poletti², Patrícia Milhoransa^{1,2}, Odirlei André Monticielo³, Francisco Veríssimo Veronese^{1,2*}.

¹Graduate Program in Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2400 Ramiro Barcelos Street, Zip Code: 90035-003, Porto Alegre, Brazil.

²Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil and Laboratory of Molecular Biology Applied to Nephrology, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos Street, Zip Code: 90035-003, Porto Alegre, Brazil.

³Division of Rheumatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos Street, Zip Code: 90035-003, Porto Alegre, Brazil.

Correspondence to:

*Francisco Veríssimo Veronese, Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, RS, ZIP 90035-003, Brazil.

E-mail address: fveronese@hcpa.edu.br (FV Veronese)

Keywords: systemic lupus erythematosus; lupus nephritis; podocytes; lupus mice model; immunosuppressive drugs

Abstract

Objectives: Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune inflammatory disease with renal involvement in over half of the cases. In lupus nephritis (LN), podocytes are injured at the structural and molecular level. Spontaneous or induced animal models of SLE can reproduce the glomerular damage, similar to what is observed in humans. In this review, murine models focusing the podocyte injury were summarized, and therapeutic strategies to protect the podocyte cell were explored.

Methods: Using the PubMed and MEDLINE databases from 1950 to 2015, literature search was conducted by article title and abstract, combining the following key words: “systemic lupus erythematosus”, “lupus nephritis”, “animal model”, “podocyte injury”, and “treatment”.

Results: Published or in-press eligible studies that were published as full-length articles in English-language journals were considered. Articles were summarized according to podocyte structure and function, the podocyte injury resulting from spontaneous (NZB/W F1 hybrid, MRL/lpr, BXSB-Yaa mice) or induced (chronic graft-versus-host disease, pristane) mice models of LN, and the protective effects of drug treatments on podocyte cell structure and function reported in these models.

Conclusions: Murine models of SLE have proven useful for better comprehension of the multiple mechanisms involved in systemic autoimmunity that leads to LN. These critical tools should be considered when target therapies are designed to control this disorder.

Introduction

Podocytes play an important role in the development and maintenance of the glomerular barrier. The glomerular filter has selectivity to macromolecules based on electric charge and molecular size, but we now know that this process is more complex and involves podocyte cells to maintain the integrity of the barrier, thus avoiding urinary protein loss [1].

Podocytes are terminally and highly differentiated epithelial cells unable to undergo cell division *in vivo*, except under special conditions. Embryologically, they derive from mesenchymal cells, and the mature podocyte cell body lies at the luminal side of the glomerular tuft. From the cell body, primary foot processes (FP) split into secondary and tertiary processes, which are microtubule-rich structures containing an actin-based cytoskeleton. The apical and basal membrane domains and the slit diaphragm are structurally and functionally connected to the cytoskeleton, and any disarrangement in one of these domains will remodel the parallel contractile actin bundles into a dense network as a defense reaction [2,3]. Many signaling pathways take part in the reorganization of the cytoskeleton, which ultimately leads to podocyte effacement, loss of the interdigitating pattern, and proteinuria. Three major pathological podocyte phenotypes are described in proteinuric glomerular diseases: effacement, apoptosis, and proliferation [4,5].

Different injuries to podocytes result in glomerular pathology, as in primary diseases minimal change disease (MCD), focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), membranous nephropathy, or secondary forms when associated with systemic diseases, such as diabetes mellitus, systemic lupus erythematosus (SLE), obesity or virus infections [6]. Several experimental models of glomerular injury have shown the central role of the epithelial cells in the pathophysiology of many glomerulopathies [7]. In this review, we

will focus on animal models of lupus nephritis, presenting the molecular targets that were used, the main pathophysiological mechanisms involved and the final outcomes that in conjunction help provide a better understanding of the pathophysiology of lupus nephritis and provide tools for discovering new therapeutic targets to induce disease remission.

Literature search

Original and review articles including clinical research and spontaneous or induced experimental mice models of SLE and lupus nephritis (LN) assessing podocyte injury and immune and non-immune mechanisms of glomerular damage were identified. We conducted electronic literature searches of PubMed and MEDLINE from 1950 to 2015 by article title and abstract. Published or in-press eligible studies that were published as full-length articles in English-language journals were considered. If the paper was retained, the full text was assessed in details.

Two authors (MS and FVV) performed data extraction and independently assessed methodological quality. Data about quantification of podocyte messenger RNA (mRNA) or protein expression in kidney tissue and urine in LN, analysis of inflammatory mediators, immune complex tissue deposition and podocyte damage, and newer stress biomarkers of LN were extracted. In experimental mice models, the search included data on development of spontaneous (NZB/W, MRL/lpr, and BXSB-Yaa) and induced (cGVHD and pristane-exposed) murine models of SLE and LN, expression of podocyte-specific proteins, cytokines and other inflammatory mediators, and drug treatment approaches to induce podocyte protection, antioxidant, and anti-inflammatory effects in the spontaneous and induced models.

1. The podocyte cell and its components

Podocytes are polarized and negatively charged cells, the peculiar shape of which is dynamically modifiable due to a cytoskeleton rich in microfilaments of F-actin and myosin. They perform an important role in the glomerular filtration and formation of glomerular filtrate on urinary Bowman's space. Podocytes' complex architecture of proteins is required for these highly specialized cells to perform the following functions: barrier integrity maintenance in size and charge to proteins, maintenance of the shape of the glomerular capillary loop, opposition to the pressure produced inside the glomerulus, synthesis and maintenance of the glomerular basement membrane (GBM) and production and secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) required to maintain the integrity of epithelial cells in glomerular capillaries [2,3,8]. Changes in one or more of these functions after podocyte injury results in proteinuria, nephritic syndrome and the loss of renal function. Several proteins, such as synaptopodin, which is located on the luminal membrane and alpha-actinin-4 near the basement membrane, maintain the podocyte architecture via connections with actin, as illustrated in Figure 1 [9].

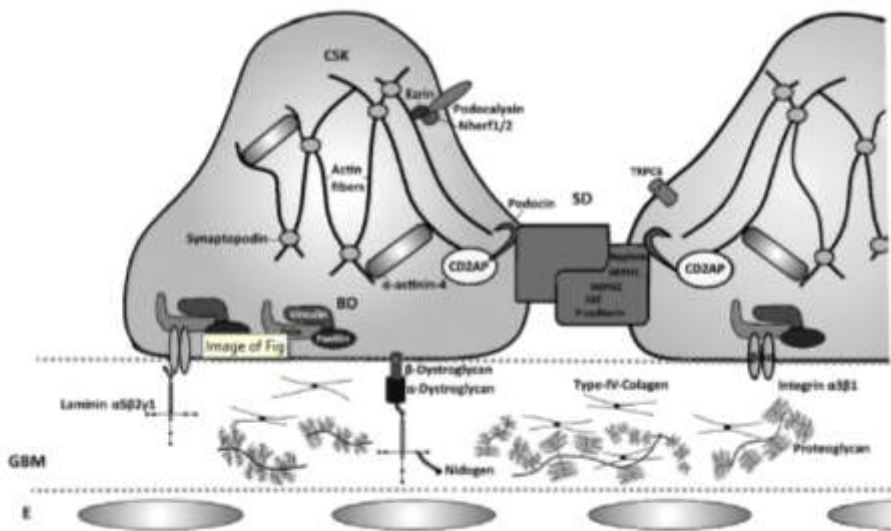


Figure 1. Podocyte complex architecture and the diversity of receptors, membrane proteins, and ion channels that are connected to actin via adaptor and effector proteins, which preserve their normal structure. CSK: cytoskeleton; SD: slit diaphragm; GBM: glomerular basal membrane; BD: basal domain; E: endothelium; TRPC6: transient receptor potential channel 6; CD2AP: CD2-associated protein; FAT: nonclassical giant protocadherin.

The slit diaphragm (SD) is an electron-dense membrane that spans the 30-50 nm space between interdigitating FP, forming a bridge that connects two podocytes, and has pores that likely constitute the limiting barrier structure to macromolecules. Slit diaphragm proteins such as nephrin, podocin, CD2-associated protein (CD2AP), FAT, Neph-1, and P-cadherin, function as a complex acting in intracellular signaling and mechanosensation, adapting FP shape and length [10,11]. Nephrin is a transmembrane protein that interacts with the actin cytoskeleton through Nck adapter proteins and the Neph-1 activating the Arp2/3 complex, a major regulator of actin dynamics [12]. Podocin is a hairpin-like protein associated with the lipid component of the SD that interacts with nephrin and CD2AP facilitating nephrin, signaling to the actin filaments and stabilizing the structure of the SD (Figure 1) [13].

Transient receptor potential canonical (TRPC) is a transmembrane protein of ion channels that is located in the podocyte cell membrane adjacent to the SD. TRPC5 and TRPC6 are channels potentially associated with the nonselective cationic conductance in podocyte plasma membrane that increase intracellular Ca^{2+} and stabilize the podocyte actin cytoskeleton [14,15].

The apical membrane domain of the podocyte is negatively charged due to the presence of anionic sialoproteins such as podocalyxin, podoplanin and podoendin. These proteins retain the negative charge of the GBM, limiting the passage of albumin, maintaining the physical separation of adjacent podocytes and preventing the adhesion of parietal cells of the Bowman's capsule to the capillary wall [16]. Another molecule in the luminal membrane is GLEPP-1, which plays a role in regulating glomerular pressure and filtration through an effect on podocyte structure and function [17].

The podocyte is anchored to the GBM through its basal domain, where cell adhesion proteins $\alpha_3\beta_1$ -integrin, $\alpha_v\beta_3$ -integrin, and α - β -dystroglycan are tightly connected to

basement membrane components such as collagen IV, fibronectin, laminin and endactin, and proteoglycans. This complex structure of the GBM restricts the passage of macromolecules through the glomerular capillary wall into the Bowman's space [2,3,18,19]. Cell adhesion and remodeling of the extracellular matrix involve bidirectional signaling physical linkage between the extracellular matrix, integrins, and the actin cytoskeleton [20].

Podocytes have specialized functions owing to their complex architecture and the diversity of receptors, membrane proteins, and ion channels that are connected to actin via adaptor and effector proteins, which preserve their normal structure. Podocyte architecture can be restored after initial damage if the actin cytoskeleton is repaired. As recently reviewed by Reiser and Altintas [21], many pathways of injury can directly or indirectly target the podocytes to cause damage at the molecular level. On the background, genetic mutations and deletions, direct toxicity, immunologic events inducing inflammation, charge distortion, and signaling pathway activation, among others, operate individually or in conjunction to alter podocyte morphology, function, and survival. The effects of many soluble and cellular products, including toxins, reactive oxygen species, complements, and antibodies lead to structural changes in podocytes, as well as glomerular epithelial cell differentiation, phenotypic conversion, and death. As examples, angiopoietin-like3 (ANGPTL3) [22], B7-1/CD80 [23], and TRPC5/TRPC6 [15] induce podocyte foot process effacement and disruption and reorganization of actin cytoskeleton. Angiotensin-II is related to podocyte autophagic processes [24], and both endothelin-1 [25] and TGF β ₁ [26] can lead to phenotypic conversion of podocyte cells, inducing epithelial-mesenchymal transition. ANGPTL3 is also involved in the puromycin aminonucleoside-induced podocyte loss by affecting detachment and apoptosis in vitro [27] and TGF β ₁ also can promote apoptosis in conditionally immortalized podocytes

derived from CD2AP^{-/-} mice, as CD2AP is a selective mediator of anti-apoptotic phosphatidylinositol 3-kinase [28].

Persistent injuries to podocyte cells lead to permanent glomerular loss through dysregulation, inflammation or degeneration [6]. In the former, podocytes suffer a process of cell dedifferentiation, reacquiring the proliferative capacity of the embryonic period by inhibiting the mechanisms responsible for preventing cell mitosis. In some specific conditions, such as in human immunodeficiency virus 1 infection, the negative factor protein (NEF) induces a podocyte proliferative response with loss of differentiation markers, including synaptopodin, WT-1, and GLEEP-1. Subsequently, proliferation markers are expressed in podocytes, such as G₁ cyclin, cyclin A, cyclin D1, and Ki-67 [29]. The dedifferentiation and consequent uncontrolled proliferation leads to hypercellularity, as seen in collapsing and crescentic glomerulonephritis [6,30].

Inflammatory pathways lead to fixation of podocytes to the Bowman's capsule, where they proliferate with the parietal cells, resulting in cellular crescents that become fibrotic and segmental glomerulosclerosis [6]. In the degenerative form podocyte cell body, attenuation and hypertrophy, podocyte detachment from GBM and synechia formation are commonly observed, which ultimately leads to glomerulosclerosis and kidney failure [6,31].

Epithelial-mesenchymal transition is another process that follows podocyte injury, where the podocyte cells suffer a phenotypic conversion losing their epithelial expression of nephrin, P-cadherin, and ZO-1. In turn, these cells begin to express matrix-producing fibroblasts and myofibroblasts which induce renal fibrosis, such as desmin, fibroblast-specific protein-1, α -smooth muscle actin, vimentin, type I collagen, and fibronectin [32].

2. Podocyte injury in lupus nephritis: clinical approaches

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a disease characterized by loss of immune tolerance, and its etiology is associated with different factors such as environment, hormones, genetics, and epigenetics [33]. Several factors are involved in the pathophysiology of SLE, including failure in the apoptotic mechanisms [34], failure in removing autoreactive B [35] and T cells [36], increased production and release of pro-inflammatory cytokines [37] and deposition of immune complexes in various tissues [38].

Lupus nephritis (LN) is one of the most severe visceral complications of SLE, occurring in approximately half of SLE patients. LN occurred in 38.8% of SLE patients in a large multicenter and multi-ethnic inception cohort from Europe, North America, and Central America, and was associated with end-stage renal disease and death in almost 5 years of follow-up [39]. In Brazil, 50 and 70% of SLE adults and children, respectively, presented with nephritis in a retrospective cohort survey [40]. Clinically, LN is characterized by proteinuria, hematuria, cellular casts, and renal failure, potentially leading to end-stage kidney disease and the need for dialysis or renal transplantation [39–41].

Immune complex deposits in the kidney activate complement, pro-inflammatory pathways and resident renal cells triggering tissue damage and the development of nephritis. Inflammatory cells are recruited via engagement of Fc and Toll-like receptors in the background of cytokine, chemokine and growth factor overexpression [42]. Specific patterns of glomerular injury occur depending on the site of immune complex binding. Mesangial and subendothelial deposits are associated with a vigorous inflammatory response and consequent tissue infiltration of immune cells, endocapillary proliferation, and segmental necrosis, whereas subepithelial and podocyte deposits result in a non-exudative and non-proliferative lesion, with foot process effacement and detachment, and immune deposits predominating in the subepithelial space of the

glomerular basement membrane. Thus, the site of accumulation of immunoglobulins, and also their antigenic specificity, their capacity to bind complement proteins, and their ability to induce an anti-inflammatory response lead to different patterns of renal tissue damage [41-43].

In SLE, self-reactive T- and B-cells produce proinflammatory cytokines and antibodies to specific nuclear antigens, which have cross-reactivity to podocyte antigens such as alpha-actinin [43]. It has been demonstrated that anti-dsDNA antibodies bind to glomerular structures in vivo, including podocytes [44]. Clinical [45,46] and experimental [47] studies correlate the activity of LN to structural damage of SD and other podocyte components, even in the early stages of the disease. The clinical presentation of LN is likely to correlate with the severity of histopathology, but at the molecular level, our understanding of the extent of podocyte damage is less clear. Recent investigations suggest a correlation between more severe histology (i.e., proliferative forms of LN) and greater intensity of podocyte injury where inhibition of renal tissue mRNA of podocyte molecules, podocyturia, and distorted SDs on electron microscopy (EM) are found [47–50].

Two patterns of podocyte lesions are suggested in LN: injuries involving immune complex deposition with structural podocyte damage, as is found in focal and diffuse proliferative LN, where endocapillary proliferation, necrosis and inflammation are predominant; and injuries presenting with diffuse podocyte FP effacement and dysfunction without inflammation, as in non-proliferative forms of LN [48]. The latter represents a lupus-related podocytopathy manifesting as nephrotic proteinuria and diffuse visceral epithelial cell FP effacement in the absence of peripheral glomerular immune aggregate deposition [51,52], as reported in minimal change, mesangial proliferative and pure membranous LN [48,51–54]. It is probable that in these forms of LN podocyte

functional alterations predominate rather than structural damage induced by immune complex deposits in the kidney. An abnormal release of cytokines from aberrant T cells with a cytokine-related injury intrinsic to SLE was postulated as a pathogenic mechanism [51].

The diagnostic and prognostic potential of podocyte stress biomarkers for the activity and progression of LN may be greater than traditional parameters, such as proteinuria and glomerular filtration rate, as suggested by previous experimental [55] and clinical studies [56]. In both proliferative and non-proliferative forms of LN, diffuse podocyte FP effacement [51,53,54], reduced expression of podocyte proteins in the kidney as detected by immunohistochemistry [48], and/or decreased podocyte-associated tissue mRNAs in parallel with increased excretion of podocyte byproducts in urine [45,46,49,50] are strong evidence of glomerular epithelial cell disarrangement. Reorganization of actin cytoskeleton and SD complex dysfunction, followed by failure of intracellular signaling and altered podocyte phenotype, are consequences of podocyte injury, leading to severe loss of function, distorted cell architecture, and apoptosis [4].

Other less-investigated kidney tissue and urine biomarkers are being studied in LN [57]. Growth factors such as VEGF and transforming growth factor β (TGF β), the T regulatory cell gene forkhead box P3 (FOXP-3), and chemokines (CXCR3) have been correlated with podocyte damage, histological class activity and the severity and the prognosis of LN [49,58–60]. Recently, microarrays have also been studied. For example, microRNA 26a (miR-26a) regulates podocyte differentiation and cytoskeletal integrity, and in a mouse model of autoimmune glomerulonephritis, the silencing of miR-26a decreased the expression of genes linked to podocyte differentiation and cytoskeleton formation [61]. Furthermore, overexpression of miR-150 in renal biopsy of patients with LN significantly reduced the expression of the antifibrotic protein suppressor of cytokine

signaling 1 (SOCS1) through the upregulation of profibrotic proteins such as TGF β , a cytokine that promotes renal fibrosis [62]. These new biomarkers may be useful in clinical practice for monitoring disease activity and evaluate the clinical response to therapeutic protocols.

3. Podocyte injury in mice models of lupus nephritis: experimental approaches

Spontaneous murine models of SLE include the F1 hybrid between the New Zealand Black (NZB) and New Zealand White (NZW) strains (NZB/W F1) [63], the MRL/lpr [64], and BXSB/Yaa strains [65], as shown in Table 1. The pristane-exposed model [66] and the chronic graft-versus-host-disease models (cGVHD) [67] are induced models. These mice have uncontrolled proliferation of T cells and an impaired response to T cell mitogen, and they produce autoantibodies against nuclear antigens, including DNA [68–70]. Several kidney alterations have been reported in these animals, such as podocyte loss, FP effacement, and GBM thickening [71–73].

Table 1: Main characteristics of the mice models of lupus nephritis currently studied

Mice model	Type of disease development	Autoantibody profile	Main clinical manifestations
NZB/W F1	Spontaneous	ANA, anti-dsDNA, anti-Ro, anti-La, anti-Sm and anti-RBC	Severe LN, lymphadenopathy, hemolytic anemia, Hypergammaglobulinemia, and splenomegaly
MRL/lpr	Spontaneous	ANA, anti-Sm/RNP, anti-dsDNA, anti-ssDNA, anti-Ro, anti-La, rheumatoid factor and anti-RBC	Severe LN, dermatitis, serositis, sialoadenitis, lymphadenopathy, polyarthritis, vasculitis, hypergammaglobulinemia, splenomegaly, neuropsychiatric features, conjunctivitis, and band keratopathy
BXSB-Yaa	Spontaneous	ANA, anti-dsDNA and anti-erythrocyte antibody	Severe LN, lymphoid tissue hyperplasia, monocytosis, leukocytosis, hypergammaglobulinemia, splenomegaly, and neuropsychiatric features
Chronic GVHD	Induced	ANA, anti-dsDNA, anti-chromatin, anti-Sm and anti-RBC	Proteinuria and glomerulonephritis
Models induced by pristane	Induced	ANA, anti-Sm/RNP, anti-ribosomal P, anti-dsDNA, anti-Chromatin, anti-U1RNP and anti-histone	Proteinuria, glomerulonephritis, arthritis, anemia, serositis, and lung hemorrhage

Abbreviations: ANA (antinuclear antibodies); dsDNA (double-stranded DNA); LN (lupus nephritis); RBC (red blood cell); ssDNA (single-stranded DNA).

3.1. The NZB/W mice model

Developed in the early 1960s, the NZB/W F1 hybrid is a reliable model for studying SLE and its renal lesions [63]. They show susceptibility to autoimmunity, high

serum levels of antinuclear, anti dsDNA, anti-Ro, anti-La, and anti-Sm antibodies, that are characteristic in human SLE. These mice develop progressive proteinuria and glomerulonephritis with immune complex deposits in mesangium, tubular casts and crescent formation, besides of diffuse proliferation of glomerular cells (Table 1). Overall, NZB/W F1 strain has been used to study the genetics underpinning of SLE and its characteristics, and also to study the etiopathogenesis of immune complex mediated glomerulonephritis involving the deposition of anti-dsDNA and other autoantibodies [74].

In 1- to 3-month-old NZB/W mice, glomerular protein expression of nephrin and podocin are significantly reduced, and the histological presentation is equivalent to the human mild mesangial LN. This alteration becomes more pronounced in older animals (6-9 months old) with advanced histological alterations, corresponding to the focal or diffuse proliferative LN [47]. It has been demonstrated that treatments with glucocorticoids and cyclophosphamide in experimental LN increase mRNA levels and expression of nephrin and podocin. Daily treatment with dexamethasone during 3 or 6 consecutive months resulted in a significant increase of nephrin and podocin tissue mRNA levels, as well as post-translational protein expression. Pharmacological treatment halted the histological alterations associated with LN, preserving podocyte FP effacement as found in EM, as shown in Table 2. These findings in EM and mRNA expression were inversely associated with both nephrin and podocin expression. Similar results were obtained with intraperitoneal injection of cyclophosphamide every 10 days for 3 or 6 consecutive months [75].

In addition to cyclophosphamide, other immunosuppressive or anticancer drugs have protective effects against podocyte damage in the NZB/W mice model. The urokinase receptor (uPAR) is expressed in podocytes, and its signaling induces FP

effacement, loss of podocyte-associated proteins, and proteinuria by promoting epithelial cell motility and GBM permeability in the glomerulus [76]. Daily oral administration of mycophenolate mofetil (60 mg/kg) for 30 weeks in NZB/W mice model downregulated the mRNA and protein tissue levels of uPAR (Table 2) [77]. In another study, the administration of the proteasome inhibitor bortezomib, a drug used to treat multiple myeloma, in NZB/W F1 hybrid mice led to protection against podocyte injury. The treatment was given in two different stages: at 18 weeks of life (before the onset of proteinuria) and at 23 weeks of life (when proteinuria was detectable). When both groups were compared to PBS-treated animals, increased preservation of nephrin and synaptopodin and a higher number of Wilms' Tumor (WT-1)-positive podocytes indicating viable cells were detected, indicating preventive and protective effects of bortezomib against damage to the glomerular structure, as described in Table 2 [71].

Table 2: Immunosuppressive and experimental drug approach for podocyte protection in animal models of systemic lupus erythematosus

Mice model	Drug/dose	Treatment protocol	Outcomes	Reference
	Dexamethasone 0.4 mg/kg	Daily in drinking water for 3 or 6 consecutive months	Tissue protein expression of nephrin and podocin were higher after 3 and 6 months and after 3 months of treatment, respectively. In addition, podocytes FP and SD were well maintained with less effacement. Nephrin and podocin mRNAs increased after 3 and 6 months of dexamethasone administration, respectively.	Moysiadis et al [75]
NZB/W	Cyclophosphamide 50 mg/kg	Every 10 days for 3 or 6 consecutive months	Tissue protein expression of nephrin and podocin were higher after 3 and 6 months of treatment, respectively. Podocytes FP and SD were morphologically regular with sporadic effacements. Nephrin and podocin mRNAs increased after 3 and 6 months of cyclophosphamide administration, respectively.	Moysiadis et al [75]
	Mycophenolate mofetil/ 60 mg/kg	Daily oral administration during 30 weeks	In immunofluorescence staining, the rate between uPAR intensity and synaptopodin level decreased in the treated group. uPAR mRNA expression in the kidney was reduced.	Cheng et al [77]
	Bortezomib 0.75 mg/kg	Twice a week at age 18 weeks and at 23 weeks	The podocyte markers nephrin, WT-1 and synaptopodin were preserved in this model compared to PBS-treated mice. There was a higher number of podocytes in the treated group.	Hainz et al [71]
	SD3651 (NOS inhibitor) 30 mg/kg	Daily treatment for 60 days in slow release subcutaneous pellets from 10 to 24/25 weeks of age	There was no foot process effacement or capillary endothelial cell tumescence in the NOS2 ^{-/-} SD-3651-treated mice.	Njoku et al [82]
MRL/lpr	Tacrolimus 0.1 mg/kg	Daily intragastric administration for 8 weeks	Tacrolimus improved the synaptopodin expression and podocyte number. In addition, in the treated groups, podocyte apoptosis was reduced, and FP effacement was inhibited	Liao et al [85]
	Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) 60 mg/kg	Twice weekly intraperitoneal injections for up to 14 weeks	PDTC reduced the podocyte foot process effacement in pretreated groups	Zhai et al [86]
Model induced by pristane	Recombinant B7-1 short hairpin (B7-1 ShRNA)	Injection in tail vein on days 1 and 60	Podocyte fusion and formation of a false chorion on the surface of podocytes combined with GBM thickening	Huang et al [98]

PDTC: Pyrrolidine dithiocarbamate; FP: foot process; SD: slit diaphragm; uPAR: urokinase receptor; WT1: Wilms' tumor gene; B7-1 ShRNA: Recombinant B7-1 short hairpin; IC: immune-complex; IgG: immunoglobulin G; dsDNA: double-stranded DNA.

3.2. *The MRL/lpr mice model*

Developed in the 1970s, the MRL/lpr mice strain model is a spontaneous recessive mutation *lpr* (lymphoproliferation) and presents several features that reproduce the alterations commonly found in patients with SLE, like glomerulonephritis mediated by immune complex deposition, besides of B and T cells hyperactivity [74,78]. These animals spontaneously develop autoantibodies such as anti-nuclear antibodies, anti-DNA (dsDNA and ssDNA), anti-Ro, and anti-La (Table 1); they also experience lymphadenopathy, damage to different organs, and premature death, but they have 50 percent mortality after 24 weeks of life [74].

The MRL/lpr mice strain, as well as other SLE murine models, allows the study of specific pathogenic mechanisms of kidney involvement in SLE [78]. It was hypothesized that the cell membrane components of bacteria would aggravate LN because these molecules are able to trigger and modulate innate and adaptive immune responses. This hypothesis was tested in MRL/lpr mice immunologically challenged by pam3cys (P₃C) and lipopolysaccharide (LPS) exposure. A reduction of nephrin levels in kidney tissue and a redistribution of its localization from the FP of podocytes to the perinuclear area was detected in these animals. Moreover, an increase in serum pro-inflammatory cytokines levels, dsDNA antibodies, and the density of the cellular infiltrate into the glomerular and interstitial compartments was noticed. Tumor necrosis factor alfa (TNF α) and interferon-gamma (IFN- γ) activated by bacterial lipopeptide induced Toll-like receptor 2 (TLR2) mRNA expression in cultured podocytes and glomerular endothelial cells, increasing membrane permeability to albumin [72].

Several studies have demonstrated increased production of oxidative stress markers in the renal tissue of SLE patients. In experimental lupus, the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor NG-monomethyl-L-arginine led to amelioration of proteinuria

and glomerular inflammation in the MRL/lpr mice model [79,80]. Considering this evidence, it was hypothesized that the lack of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene in MRL/lpr mice would prevent the development of proliferative glomerulonephritis, but this hypothesis was proven to be incorrect because these animals were not different from their wild type littermates [81]. Later, it was demonstrated that the NOS inhibitor SD-3651 could prevent the FP effacement and endothelial cell swelling in MRL/lpr lacking iNOS (Table 2), suggesting that the protective effects of this compound are independent of an iNOS-mediated mechanism [82].

Activation of the type 1a angiotensin receptor (AT1a) by angiotensin II induces both hemodynamic and pressure-independent effects in glomeruli, resulting in FP effacement and detachment, protein leakage, and the progression to FSGS [83]. However, these data were not entirely reproduced in the MRL/Fas^{lpr}/lpr mice lacking AT1a because an AT1a deficiency did not protect these animals against renal disease, manifested as increasing proteinuria and worse renal pathology with higher mortality. Additionally, AT1a-deficient lpr mice presented exaggerated AT1b receptor activation, which was associated with podocyte injury and overexpression of inflammatory mediators. These animals presented 80% of positive staining for desmin, a podocyte injury marker, while the controls showed only 9% [84].

Different therapeutic approaches have been tested in these mouse models to ameliorate LN-like features. Tacrolimus (TAC) was given to female MRL/lpr mice by intragastric administration at a dosage of 0.1 mg/kg per day for 8 weeks. Whereas synaptopodin expression significantly decreased in MRL/lpr disease control mice that showed increases in 24-h proteinuria and serum creatinine, in TAC-treated mice, an in vitro decrease in TGF- β 1-induced podocyte apoptosis, inhibition of FP fusion, and preservation of podocyte numbers was observed. TAC administration reduced

proteinuria, improved renal function, and restored synaptopodin expression (Table 2) [85].

Drugs with antioxidant effects have also been tested in female MRL/lpr mice. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) exerted a protective effect in MRL/lpr mice kidney pre-treated with this drug by reducing the number of infiltrating inflammatory cells, the severity of autoimmune injury, the serum levels of anti-dsDNA, and podocyte FP effacement (Table 2) These effects were mediated at least in part by the inhibition of the NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways. PDTC may prove efficacious for preventing kidney fibrosis in lupus-prone mice [86].

3.3. The BXSB-Yaa mice model

The BXSB strain was developed in the 1970s from crossing C57BL/6J female and SB/Le male mice. These animals present the Y-linked autoimmune accelerator (Yaa), leading to increased autoimmunity and acute glomerulonephritis in males, which is different from other models that affect females in a more pronounced way [65]. Clinically, like in NZB/W strain, the BXSB model presents serum anti-DNA antibodies and severe glomerulonephritis, as shown in Table 1. Moreover, they also have been used to study genetic lupus and to investigate T-cell dependent pathways of injury [87,88].

In this lupus model, BXSB-Yaa mice presented overexpression of the TLR8 in the glomerulus, inducing autoimmune responses. TLR8 mRNA expression was positively correlated with urinary albumin levels but negatively correlated with mRNA levels of the podocyte markers nephrin, podocin and synaptopodin, indicating structural damage to epithelial cells. In this study, it was also shown that serum and glomerular levels of miR-21, a ligand of TLR8 and another biomarker of glomerular damage, were expressed in higher amounts in the BXSB-Yaa mice [89].

Urinary mRNA podocyte markers such as nephrin, podocin, WT-1 and actinin-4 are upregulated in BXSB-Yaa mice and are associated with severe kidney damage [90]. This strain also develops membranoproliferative lupus nephritis (MPLN), podocyte damage and FP effacement. Moreover, when BXSB-Yaa animals were compared to BXSB, a decrease was detected in the mRNA expression of nephrin, podocin, synaptopodin, actin-4, CD2ap, and podocalyxin [73]. Although severe glomerulonephritis is reported only in male BXSB/MpJ-Yaa, female BXSB/MpJ mice without Yaa can develop glomerular lesions in correlation with increased autoantibody production and albuminuria, as demonstrated by Kimura et al. [87]. In BXSB/MpJ female mice, these authors reported a mixed pattern of membranous and membranoproliferative nephritis in association with T-cell infiltration and evidence of podocyte injury.

3.4. Induced mice models

Murine chronic graft-versus-host disease (cGVHD) is another induced murine model of SLE in which the transfer of major histocompatibility complex (MHC) mismatched cells results in an SLE phenotype (Table 1) [91]. Unfractionated peripheral immune cells are adoptively transferred into non-irradiated host mice, and the balance between CD4⁺ and CD8⁺ T cells actually determines the cGVHD phenotype. This phenotype arises from the generation of autoantibodies directed against dsDNA, ssDNA, and chromatin, inducing an immune-complex glomerulonephritis in humans and mice. This animal model is characterized by lupus-like auto-immunity, with anti-DNA antibody production, glomerulonephritis, and consequent proteinuria [92]. These autoantibodies are detectable between 2 to 6 weeks after immune cells transfer, and proteinuria begins to increase 7 weeks afterwards. More specifically, the peak of production of autoantibodies against the SD protein nephrin occurs at week 2 or 4, before and during proteinuria development. Microscopic analyses reveal a co-localization of IgG and

nephrin along the glomerular capillary walls of these animals [93]. Histologically, the cGVHD model induces mesangial proliferative glomerulonephritis with focal crescent formation, and also membranous or membranoproliferative nephritis as observed in patients, being a good model where autoreactivity and autoimmunity associated with B and T cell activation play a central role [94].

Pristane (2,6,10,14 - tetramethylpentadecane) is a hydrocarbon oil that causes chronic inflammation in mice when introduced into the abdominal cavity [95]. In 1994, Satoh et al. [66] reported that Balb/c female mice exposed to pristane presented several SLE-like features. Since then, the pristane model has been used to study the pathophysiology of this disease. Kidney damage is usually detectable 6 months after pristane intraperitoneal injection, with mice developing proteinuria and tissue alterations such as glomerular IgG and complement deposits, other immune complex deposition, cellular proliferation, and podocyte FP fusion and effacement, as shown in Table 1. These findings are consistent with the diffuse proliferative form of LN [96–98]. Pristane also induces IgG autoantibody production in association with active SLE, including ANA, dsDNA, ssDNA, chromatin, Sm, RNP, Su, and ribosomal P. Moreover, clinical manifestations of SLE have been found in this animal model, such as immune complex-mediated glomerulonephritis, and polyclonal hypergammaglobulinemia [66]. In addition, overproduction of interferon- α and β , pro-inflammatory cytokines involved in SLE, also can be detected in pristane lupus-like induced model as in serum of active SLE patients [99].

The pristane model is an important tool that also allows the testing of novel approaches to treat LN-like target organ manifestations, and differently from the spontaneous models, it allows the study of the mechanisms involved at the onset of the disease and the influence of an environmental trigger. Recently, treatment with

resveratrol, a natural polyphenol, inhibited CD4⁺ T cells and B cell proliferation in pristane-exposed animals. This compound also reduced the production of antibodies (IgG1, IgG2, IgG2b, IgG3, and IgA). The mechanism of action of resveratrol is not completely understood, but its antioxidant and anti-inflammatory properties, as well as its capacity to activate the silent mating type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1), are indicated as possible factors [100].

Melatonin is secreted by the pineal gland and has potent antioxidant activity by scavenging free radicals, such as reactive oxygen species, and by inducing the activity of endogenous antioxidants [101]. Zhou et al. [102] evaluated the effects of melatonin on the BALB/c mice pristane model, showing a reduction of IgM anti-ssDNA and histone autoantibodies, downregulation of interleukin-6 (IL-6) and IL-13 secretion, and amelioration of the renal lesions such as the thickening of capillary walls, mesangial expansion, and the interstitial inflammatory cell infiltrate. Despite these potential beneficial effects in experimental LN, this substance deserves further investigation as a novel therapy for inflammatory conditions such as SLE. Melatonin has been investigated more often in models of experimental obesity [103,104], but in such models, the protection against podocyte injury has not yet been explored.

4. Future directions

The availability of animal models for SLE allowed for better comprehension of the etiopathogenesis of this complex disease that affects more than half of SLE patients, with the potential to progress to chronic kidney disease and the need for renal replacement therapy. A key issue in the understanding of the pathogenesis of SLE is how intracellular antigens become exposed and targeted by the immune system. In this scenario, podocytes

are a main glomerular target in lupus nephritis and have been the focus of intensive research.

Animal models of SLE developed for these purposes have been the cornerstone to the pathway of translational medicine. These strategies allowed the investigation of novel therapies to target critical immune cells to effectively control disease activity, with the potential for reducing chronic organ damage and offering better clinical outcomes to patients with SLE.

Substances other than the conventional immunosuppressive drugs are being reported as promising alternatives in the therapeutic management of NL, as they have been shown to alleviate the damage to podocyte cells with complete or partial recovery of morphology and function of the glomerular filtration barrier [71,82,86]. Similar to resveratrol, quercetin has important properties, such as anti-oxidative and anti-apoptotic effects [105]. It has been demonstrated that this bioflavonoid is renoprotective and attenuates nephropathy in rats [106], but it remains to be tested in an SLE model.

The histamine receptor 4 (H4R), a member of the histamine receptor family with selectivity over H1, H2, and H3 receptors, is involved in various inflammatory conditions. The expression of HR4 mRNA was found to be significantly increased in patients with SLE compared with controls [107]. Its antagonists, such as JNJ7777120, have shown therapeutic potential in chronic inflammatory diseases by blocking histamine-induced chemotaxis and calcium influx of bone marrow-derived mast cells and migration of tracheal mast cells in an experimental mice model [108]. Considering the involvement of H4R in immune regulatory functions, including chemotaxis and cytokine secretion [109], this receptor and its antagonists should receive attention in further experimental studies assessing LN and podocyte damage.

New perspectives in the treatment of glomerular diseases have emerged focusing

on the podocyte as a therapeutic target. In a recent review [21] some treatment options have been explored. Rituximab, besides recognizing CD20 on B-lymphocytes, might also binds sphingomyelin phosphodiesterase-acid-like-3b and regulates acid-sphingomyelinase activity, decreasing podocyte injury [110]. Abatacept, blocking the transmembrane protein B7-1 associated with FP effacement, was demonstrated to protect the podocyte [111]. Both drugs have been studied in lupus nephritis, but primary end points in randomized clinical trials have not yet been achieved. Bis-T-23, a small molecule that interferes with the regulation of actin cytoskeleton emerges as a potential therapy, as Bis-T-23 restored the normal ultrastructure of podocyte foot processes, lowered collagen IV deposits in the mesangial matrix, diminished mesangial matrix expansion, and lowered proteinuria in renal disease models [112]. Nevertheless, information about the effects of new therapies is limited to experimental kidney disease and cell culture, and their potential clinical efficacy after recovery of podocyte architecture and function is not yet known.

In addition to these targets, others molecules may be further explored, especially in the context of lupus nephritis, such as TGF β , CXCR3 chemokine receptor, AT1a receptor, TNF α and VEGF. Drugs recently studied in clinical trials of lupus nephritis, such as Anifrolumab, Atacicept, Belimumab, Blisibimod, Epratuzumab, Ixazomib, Laquinimod, Obinutuzumab, and Sirukumab still have an unknown role to protect podocyte from injury and/or to induce morphological and functional cell recovery, and they should be better studied.

5. Summary

Podocytes are glomerular epithelial cells that play an important role in the glomerular filtration to urinary Bowman's space. Glomerular damage of different

etiologies leads to injury to these cells in primary and secondary glomerular diseases. Systemic lupus erythematosus is an autoimmune systemic inflammatory disease characterized by renal involvement in over half of the cases. In lupus nephritis, podocytes are damaged at the structural and molecular level, showing fusion and widening, with foot process effacement and reduced expression of podocyte-specific proteins. Spontaneous or induced animal models of SLE have been used to study the organ-specific lesions that characterize this disease, and several kidney alterations, similar to what is observed in humans, can be reproduced in these animals.

Spontaneous murine models of SLE include the NZB/W F1, MRL/lpr, and BXSB/Yaa strains. The pristane-exposed model and chronic graft-versus-host disease are induced models. These mice have uncontrolled proliferation of T cells and an impaired response to T cell mitogen. Autoantibodies are produced against nuclear antigens resulting in morphologic alterations in the glomerular filtration barrier, such as podocyte cell loss, FP effacement, and GBM thickening. The NZB/W F1 model induces high serum levels of antinuclear, anti dsDNA, anti-Ro, anti-La, and anti-Sm antibodies, like in human SLE. These mice develop progressive proteinuria and glomerulonephritis with immune complex deposits. In the MRL/lpr model, autoantibodies such as anti-DNA, anti-Ro, and anti-La are produced, and the animals exhibit lymphadenopathy, glomerulonephritis, damage to different organs, and premature death. The BXSB model presents serum anti-DNA antibodies and severe glomerulonephritis, and BXSB also have been used to study genetic lupus. Murine cGVHD is an induced model of SLE in which the transfer of major histocompatibility complex (MHC) mismatched cells results in an SLE phenotype. This animal model is characterized by lupus-like auto-immunity, with anti-DNA antibody production, glomerulonephritis, and proteinuria. Pristane model is featured by IgG autoantibody production, including ANA, dsDNA, ssDNA, chromatin, Sm, RNP, Su, and

ribosomal P. Moreover, clinical manifestations of SLE have been found, such as immune complex-mediated glomerulonephritis and polyclonal hypergammaglobulinemia.

These experimental models have contributed to the current understanding of the podocyte role in the pathophysiology of LN, shedding light on underpinning mechanisms involved in the onset of this disease. Furthermore, exploration of these models to search for novel therapeutic approaches for SLE and its systemic manifestations opens new avenues to disease control. In addition to the conventional immunosuppressive drugs, new substances are being tested as promising alternatives for the therapeutic management of LN as they may protect podocytes and other kidney structures from damage.

Conflict of interest: the authors declare no conflicts of interest.

References

- [1] Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006;69:2131–47. doi:10.1038/sj.ki.5000410.
- [2] Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol* 2012;74:299–323. doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153238.
- [3] Barisoni L, Mundel P. Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *Am J Nephrol* 2003;23:353–60. doi:72917.
- [4] Chuang PY, He JC. Signaling in regulation of podocyte phenotypes. *Nephron Physiol* 2009;111:p9–15. doi:10.1159/000191075.
- [5] Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. Advances in the biology and genetics of the podocytopathies: implications for diagnosis and therapy. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:201–16. doi:10.1043/1543-2165-133.2.201.
- [6] Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int* 2005;67:404–19. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.67097.x.
- [7] Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int* 2007;71:1205–14. doi:10.1038/sj.ki.5002222.
- [8] Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 2003;111:707–16. doi:10.1172/JCI17423.
- [9] Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 2007;17:428–37. doi:10.1016/j.tcb.2007.06.006.
- [10] Patrakka J, Tryggvason K. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396:164–9. doi:10.1016/j.bbrc.2010.04.069.
- [11] Johnstone DB, Holzman LB. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nat Clin Pr Nephrol* 2006;2:271–82. doi:10.1038/ncpneph0180.
- [12] Jones N, Blasutig IM, Eremina V, Ruston JM, Bladt F, Li H, et al. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 2006;440:818–23. doi:10.1038/nature04662.
- [13] Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001;108:1621–9. doi:10.1172/JCI12849.
- [14] Reiser J, Polu KR, Möller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 2005;37:739–44. doi:10.1038/ng1592.
- [15] Tian D, Jacobo SMP, Billing D, Rozkalne A, Gage SD, Anagnostou T, et al. Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Sci Signal* 2010;3:ra77. doi:10.1126/scisignal.2001200.
- [16] Takeda T, McQuistan T, Orlando RA, Farquhar MG. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest* 2001;108:289–301. doi:10.1172/JCI12539.

- [17] Wharram BL, Goyal M, Gillespie PJ, Wiggins JE, Kershaw DB, Holzman LB, et al. Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptpro)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *J Clin Invest* 2000;106:1281–90. doi:10.1172/JCI7236.
- [18] Dedhar S, Jewell K, Rojiani M, Gray V. The receptor for the basement membrane glycoprotein entactin is the integrin $\alpha 3/\beta 1$. *J Biol Chem* 1992;267:18908–14.
- [19] Kojima K, Nosaka H, Kishimoto Y, Nishiyama Y, Fukuda S, Shimada M, et al. Defective glycosylation of α -dystroglycan contributes to podocyte flattening. *Kidney Int* 2011;79:311–6. doi:10.1038/ki.2010.403.
- [20] Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong J-P. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:381–410. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.090704.151217.
- [21] Reiser J, Altintas MM. Podocytes. *F1000Research* 2016;5:1–19. doi:10.12688/f1000research.7255.1.
- [22] Lin Y, Rao J, Zha X-L, Xu H. Angiopoietin-like 3 induces podocyte F-actin rearrangement through integrin $\alpha(V)\beta_3$ /FAK/PI3K pathway-mediated Rac1 activation. *Biomed Res Int* 2013;2013:135608. doi:10.1155/2013/135608.
- [23] Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, Oh J, Asanuma K, Giardino L, et al. Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 2004;113:1390–7. doi:10.1172/JCI20402.
- [24] Yadav A, Vallabu S, Arora S, Tandon P, Slahan D, Teichberg S, et al. ANG II promotes autophagy in podocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;299:C488–96. doi:10.1152/ajpcell.00424.2009.
- [25] Buelli S, Rosanò L, Gagliardini E, Corna D, Longaretti L, Pezzotta A, et al. β -arrestin-1 drives endothelin-1-mediated podocyte activation and sustains renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2014;25:523–33. doi:10.1681/ASN.2013040362.
- [26] Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X, Liu Y. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *Am J Pathol* 2008;172:299–308. doi:10.2353/ajpath.2008.070057.
- [27] Dai R, Lin Y, Liu H, Rao J, Zhai Y, Zha X, et al. A vital role for Angptl3 in the PAN-induced podocyte loss by affecting detachment and apoptosis in vitro. *BMC Nephrol* 2015;16:1–10. doi:10.1186/s12882-015-0034-4.
- [28] Schiffer M, Mundel P, Shaw AS, Böttinger EP. A novel role for the adaptor molecule CD2-associated protein in transforming growth factor-beta-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279:37004–12. doi:10.1074/jbc.M403534200.
- [29] Husain M, Gusella GL, Klotman ME, Gelman IH, Ross MD, Schwartz EJ, et al. HIV-1 Nef induces proliferation and anchorage-independent growth in podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1806–15.
- [30] Bariéty J, Bruneval P, Meyrier A, Mandet C, Hill G, Jacquot C. Podocyte involvement in human immune crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 2005;68:1109–19. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00503.x.
- [31] Asanuma K, Mundel P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol* 2003;7:255–9. doi:10.1007/s10157-003-0259-6.

- [32] Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:212–22. doi:10.1681/ASN.2008121226.
- [33] Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2011;365:2110–21. doi:10.1056/NEJMra1100359.
- [34] Shao W-H, Cohen PL. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2011;13:202. doi:10.1186/ar3206.
- [35] Lipsky PE. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol* 2001;2:764–6. doi:10.1038/ni0901-764.
- [36] Zhu J, Liu X, Xie C, Yan M, Yu Y, Sobel ES, et al. T cell hyperactivity in lupus as a consequence of hyperstimulatory antigen-presenting cells. *J Clin Invest* 2005;115:1869–78. doi:10.1172/JCI23049.
- [37] Wong CK, Ho CY, Li EK, Lam CW. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000;9:589–93.
- [38] Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003;56:481–90.
- [39] Hanly JG, O’Keefe AG, Su L, Urowitz MB, Romero-Diaz J, Gordon C, et al. The frequency and outcome of lupus nephritis: results from an international inception cohort study. *Rheumatology (Oxford)* 2015;55:252–62. doi:10.1093/rheumatology/kev311.
- [40] das Chagas Medeiros MM, Bezerra MC, Braga FNHF, da Justa Feijão MRM, Gois ACR, Rebouças VC do R, et al. Clinical and immunological aspects and outcome of a Brazilian cohort of 414 patients with systemic lupus erythematosus (SLE): comparison between childhood-onset, adult-onset, and late-onset SLE. *Lupus* 2015. doi:10.1177/0961203315606983.
- [41] Borchers AT, Leibushor N, Naguwa SM, Cheema GS, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Lupus nephritis: A critical review. *Autoimmun Rev* 2012;12:174–94. doi:10.1016/j.autrev.2012.08.018.
- [42] Liu Z, Davidson A. Taming lupus—a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nat Med* 2012;18:871–82. doi:10.1038/nm.2752.
- [43] Weening JJ, D’Agati VD, Schwartz MM, Seshan S V, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int* 2004;65:521–30. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00443.x.
- [44] Mjelle JE, Rekvig OP, Van Der Vlag J, Fenton KA. Nephritogenic antibodies bind in glomeruli through interaction with exposed chromatin fragments and not with renal cross-reactive antigens. *Autoimmunity* 2011;44:373–83. doi:10.3109/08916934.2010.541170.
- [45] Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Sekizuka K, et al. Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis. *Am J Med Sci* 2000;320:112–6.
- [46] Wang G, Lai FMM, Tam LS, Li KTMKTPM, Lai KB, Chow KM, et al. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in urinary sediment of patients with lupus nephritis. *J Rheumatol* 2007;34:2358–64. doi:10.1159/000104428.
- [47] Perysinaki GS, Moysiadis DK, Bertsiadis G, Giannopoulou I, Kyriacou K, Nakopoulou L, et al. Podocyte main slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology. *Lupus* 2011;20:781–91.

- doi:10.1177/0961203310397412.
- [48] Rezende G, Viana V, Malheiros D, Borba E, Silva N, Silva C, et al. Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis: distinct underlying mechanisms of proteinuria? *Lupus* 2014;23:255–62. doi:10.1177/0961203313517152.
- [49] Dos Santos M, Bringhenti RN, Rodrigues PG, Nascimento JF, Vianna S, Zancan R, et al. Podocyte-associated mRNA profiles in kidney tissue and in urine of patients with active lupus nephritis. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:4600–13.
- [50] Bollain-Y-Goytia JJ, González-Castañeda M, Torres-Del-Muro F, Daza-Benitez L, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C, et al. Increased excretion of urinary podocytes in lupus nephritis. *Indian J Nephrol* 2011;21:166–71. doi:10.4103/0971-4065.83029.
- [51] Kraft SW, Schwartz MM, Korbet SM, Lewis EJ. Glomerular Podocytopathy in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:175–9. doi:10.1681/ASN.2004050350.
- [52] Han TS, Schwartz MM, Lewis EJ. Association of glomerular podocytopathy and nephrotic proteinuria in mesangial lupus nephritis. *Lupus* 2006;15:71–5.
- [53] Gutiérrez S, Petiti JP, De Paul AL, Torres AI, Mukdsi JH. Lupus-related podocytopathy. Could it be a new entity within the spectrum of lupus nephritis? *Nefrologia* 2012;32:245–6. doi:10.3265/Nefrologia.pre2011.Nov.11138.
- [54] Desai N, Cimbaluk D, Lewis EJ, Whittier WL. Proteinuria in membranous lupus nephritis: the pathology is in the podocyte. *Lupus* 2013;22:461–8. doi:10.1177/0961203313477225.
- [55] Fukuda A, Wickman LT, Venkatareddy MP, Wang SQ, Chowdhury MA, Wiggins JE, et al. Urine podocin:nephrin mRNA ratio (PNR) as a podocyte stress biomarker. *Nephrol Dial Transpl* 2012;27:4079–87. doi:10.1093/ndt/gfs313.
- [56] Wickman L, Afshinnia F, Wang SQ, Yang Y, Wang F, Chowdhury M, et al. Urine podocyte mRNAs, proteinuria, and progression in human glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:2081–95. doi:10.1681/ASN.2013020173.
- [57] Misra R, Gupta R. Biomarkers in lupus nephritis. *Int J Rheum Dis* 2015;18:219–32. doi:10.1111/1756-185X.12602.
- [58] Avihingsanon Y, Phumesin P, Benjachat T, Akkasilpa S, Kittikowit V, Praditpornsilpa K, et al. Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney Int* 2006;69:747–53. doi:10.1038/sj.ki.5000132.
- [59] Avihingsanon Y, Benjachat T, Tassanarong A, Sodsai P, Kittikovit V, Hirankarn N. Decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis. *Kidney Int* 2009;75:1340–8. doi:10.1038/ki.2009.75.
- [60] Wang G, Lai FM, Tam LS, Li EK, Kwan BC, Chow KM, et al. Urinary FOXP3 mRNA in patients with lupus nephritis--relation with disease activity and treatment response. *Rheumatol* 2009;48:755–60. doi:10.1093/rheumatology/kep074.
- [61] Ichii O, Otsuka-Kanazawa S, Horino T, Kimura J, Nakamura T, Matsumoto M, et al. Decreased miR-26a expression correlates with the progression of podocyte injury in autoimmune glomerulonephritis. *PLoS One* 2014;9:e110383. doi:10.1371/journal.pone.0110383.

- [62] Zhou H, Hasni SA, Perez P, Tandon M, Jang S-I, Zheng C, et al. miR-150 promotes renal fibrosis in lupus nephritis by downregulating SOCS1. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:1073–87. doi:10.1681/ASN.2012080849.
- [63] HELYER BJ, HOWIE JB. Renal disease associated with positive lupus erythematosus tests in a cross-bred strain of mice. *Nature* 1963;197:197.
- [64] Murphy ED, Roths JB. A single gene model for massive lymphoproliferation with immune complex disease in a new mouse strain MRL. 16th Int. Congr. Hematol., vol. 69, Amsterdam: Excerpta Medica; 1976.
- [65] Murphy ED, Roths JB. A Y chromosome associated factor in strain BXSB producing accelerated autoimmunity and lymphoproliferation. *Arthritis Rheum* 1979;22:1188–94.
- [66] Satoh M, Reeves WH. Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. *J Exp Med* 1994;180:2341–6. doi:10.1084/jem.180.6.2341.
- [67] Eisenberg R. The chronic graft-versus-host model of systemic autoimmunity. *Curr Dir Autoimmun* 2003;6:228–44.
- [68] Hainz N, Thomas S, Neubert K, Meister S, Benz K, Rauh M, et al. Mechanisms of tissue injury in lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2011;13:250. doi:10.1159/000334955.
- [69] Pathak S, Mohan C. Cellular and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 2011;13:241. doi:10.1186/ar3465.
- [70] Pieterse E, van der Vlag J. Breaking immunological tolerance in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol* 2014;5:1–8. doi:10.3389/fimmu.2014.00164.
- [71] Hainz N, Thomas S, Neubert K, Meister S, Benz K, Rauh M, et al. The proteasome inhibitor bortezomib prevents lupus nephritis in the NZB/W F1 mouse model by preservation of glomerular and tubulointerstitial architecture. *Nephron Exp Nephrol* 2012;120:e47–58. doi:10.1159/000334955.
- [72] Pawar RD, Castrezana-Lopez L, Allam R, Kulkarni OP, Segerer S, Radomska E, et al. Bacterial lipopeptide triggers massive albuminuria in murine lupus nephritis by activating Toll-like receptor 2 at the glomerular filtration barrier. *Immunology* 2009;128:e206–21. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02948.x.
- [73] Kimura J, Ichii O, Otsuka S, Sasaki H, Hashimoto Y, Kon Y. Close relations between podocyte injuries and membranous proliferative glomerulonephritis in autoimmune murine models. *Am J Nephrol* 2013;38:27–38. doi:10.1159/000353093.
- [74] MCGAHA TL, MADAIO MP, ANA H. Animal models of renal disease Lupus nephritis : animal modeling of a complex disease syndrome pathology. *Drug Discov Today Dis Model* 2014;11:13–8. doi:10.1016/j.ddmod.2014.08.002.
- [75] Moysiadis DK, Perysinaki GS, Bertias G, Stratakis S, Kyriacou K, Nakopoulou L, et al. Early treatment with glucocorticoids or cyclophosphamide retains the slit diaphragm proteins nephrin and podocin in experimental lupus nephritis. *Lupus* 2012;21:1196–207. doi:10.1177/0961203312451784.
- [76] Wei C, Möller CC, Altintas MM, Li J, Schwarz K, Zacchigna S, et al. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nat Med* 2008;14:55–63. doi:10.1038/nm1696.

- [77] Cheng CC, Lee YF, Lan JL, Wu MJ, Hsieh TY, Lin NN, et al. Mycophenolate mofetil alleviates lupus nephritis through urokinase receptor signaling in a mice model. *Lupus* 2013;22:554–61. doi:10.1177/0961203313480398.
- [78] Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ, et al. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med* 1978;148:1198–215.
- [79] Oates JC, Ruiz P, Alexander A, Pippen AM, Gilkeson GS. Effect of late modulation of nitric oxide production on murine lupus. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;83:86–92.
- [80] Reilly CM, Farrelly LW, Viti D, Redmond ST, Hutchison F, Ruiz P, et al. Modulation of renal disease in MRL/lpr mice by pharmacologic inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Kidney Int* 2002;61:839–46. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00230.x.
- [81] Gilkeson GS, Mudgett JS, Seldin MF, Ruiz P, Alexander AA, Misukonis MA, et al. Clinical and serologic manifestations of autoimmune disease in MRL-lpr/lpr mice lacking nitric oxide synthase type 2. *J Exp Med* 1997;186:365–73.
- [82] Njoku C, Self SE, Ruiz P, Hofbauer AF, Gilkeson GS, Oates JC. Inducible nitric oxide synthase inhibitor SD-3651 reduces proteinuria in MRL/lpr mice deficient in the NOS2 gene. *J Investig Med* 2008;56:911–9. doi:10.231/JIM.0b013e3181889e13.
- [83] Hoffmann S, Podlich D, Hähnel B, Kriz W, Gretz N. Angiotensin II Type 1 Receptor Overexpression in Podocytes Induces Glomerulosclerosis in Transgenic Rats. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1475–87. doi:10.1097/01.ASN.0000127988.42710.A7.
- [84] Crowley SD, Vasievich MP, Ruiz P, Gould SK, Parsons KK, Pazmino AK, et al. Glomerular type 1 angiotensin receptors augment kidney injury and inflammation in murine autoimmune nephritis. *J Clin Invest* 2009;119:943–53. doi:10.1172/JCI34862.
- [85] Liao R, Liu Q, Zheng Z, Fan J, Peng W, Kong Q, et al. Tacrolimus Protects Podocytes from Injury in Lupus Nephritis Partly by Stabilizing the Cytoskeleton and Inhibiting Podocyte Apoptosis. *PLoS One* 2015;10:e0132724. doi:10.1371/journal.pone.0132724.
- [86] Zhai JX, Zhang ZX, Feng YJ, Ding SS, Wang XH, Zou LW, et al. PDTC attenuate LPS-induced kidney injury in systemic lupus erythematosus-prone MRL/lpr Mice. *Mol Biol Rep* 2012;39:6763–71. doi:10.1007/s11033-012-1501-7.
- [87] Kimura J, Ichii O, Nakamura T, Horino T, Otsuka S, Kon Y. BXSb-type genome causes murine autoimmune glomerulonephritis: pathological correlation between telomeric region of chromosome 1 and Yaa. *Genes Immun* 2014;15:182–9. doi:10.1038/gene.2014.4.
- [88] Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng Y-Y, Morel L. Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:1–19. doi:10.1155/2011/271694.
- [89] Kimura J, Ichii O, Miyazono K, Nakamura T, Horino T, Otsuka-Kanazawa S, et al. Overexpression of Toll-like receptor 8 correlates with the progression of podocyte injury in murine autoimmune glomerulonephritis. *Sci Rep* 2014;4:7290. doi:10.1038/srep07290.
- [90] Kimura J, Ichii O, Otsuka S, Kanazawa T, Namiki Y, Hashimoto Y, et al. Quantitative and qualitative urinary cellular patterns correlate with progression of murine glomerulonephritis. *PLoS One* 2011;6:e16472. doi:10.1371/journal.pone.0016472.

- [91] Chu YW, Gress RE. Murine models of chronic graft-versus-host disease: insights and unresolved issues. *Biol Blood Marrow Transpl* 2008;14:365–78. doi:S1083-8791(07)00633-7 [pii]r10.1016/j.bbmt.2007.12.002.
- [92] Gordon C, Stoll ML, Gavalchin J. Systemic lupus erythematosus — messages from experimental models. *Rheumatology* 2000;39:18–27.
- [93] Nagahama K, Maru K, Kanzaki S, Chai HL, Nakai T, Miura S, et al. Possible role of autoantibodies against nephrin in an experimental model of chronic graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol* 2005;141:215–22. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02838.x.
- [94] Garchow B, Kiriakidou M. MicroRNA-21 deficiency protects from lupus-like autoimmunity in the chronic graft-versus-host disease model of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2016;162:100–6. doi:10.1016/j.clim.2015.11.010.
- [95] Reeves WH, Lee PY, Weinstein JS, Satoh M, Lu L. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends Immunol* 2009;30:455–64. doi:10.1016/j.it.2009.06.003.
- [96] Satoh M, Kumar A, Kanwar YS, Reeves WH. Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:10934–8.
- [97] Satoh M, Hamilton KJ, Ajmani AK, Dong X, Wang J, Kanwar YS, et al. Autoantibodies to ribosomal P antigens with immune complex glomerulonephritis in SJL mice treated with pristane. *J Immunol* 1996;157:3200–6.
- [98] Huang L, Kong Y, Wang J, Sun J, Shi Q, Qiu Y. Reducing progression of experimental lupus nephritis via inhibition of the B7/CD28 signaling pathway. *Mol Med Rep* 2015;1–9. doi:10.3892/mmr.2015.3953.
- [99] Zhuang H, Szeto C, Han S, Yang L, Reeves WH. Animal models of interferon signature positive lupus. *Front Immunol* 2015;6:6–11. doi:10.3389/fimmu.2015.00291.
- [100] Wang Z-L, Luo X-F, Li M-T, Xu D, Zhou S, Chen H-Z, et al. Resveratrol possesses protective effects in a pristane-induced lupus mouse model. *PLoS One* 2014;9:e114792. doi:10.1371/journal.pone.0114792.
- [101] Poeggeler B, Thuermann S, Dose A, Schoenke M, Burkhardt S, Hardeland R. Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J Pineal Res* 2002;33:20–30.
- [102] Zhou L-LL, Wei W, Si J-FF, Yuan D-PP. Regulatory effect of melatonin on cytokine disturbances in the pristane-induced lupus mice. *Mediators Inflamm* 2010;2010. doi:10.1155/2010/951210.
- [103] Agil A, Navarro-Alarcón M, Ruiz R, Abuhamadah S, El-Mir M-Y, Vázquez GF. Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res* 2011;50:207–12. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00830.x.
- [104] Stacchiotti A, Favero G, Giugno L, Lavazza A, Reiter RJ, Rodella LF, et al. Mitochondrial and metabolic dysfunction in renal convoluted tubules of obese mice: protective role of melatonin. *PLoS One* 2014;9:e111141. doi:10.1371/journal.pone.0111141.
- [105] Gomes IBS, Porto ML, Santos MCLFS, Campagnaro BP, Pereira TMC, Meyrelles SS, et al.

- Renoprotective, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy. *Lipids Health Dis* 2014;13:184. doi:10.1186/1476-511X-13-184.
- [106] Elbe H, Vardi N, Esrefoglu M, Ates B, Yologlu S, Taskapan C. Amelioration of streptozotocin-induced diabetic nephropathy by melatonin, quercetin, and resveratrol in rats. *Hum Exp Toxicol* 2014. doi:10.1177/0960327114531995.
- [107] Yu B, Shao Y, Li P, Zhang J, Zhong Q, Yang H, et al. Copy number variations of the human histamine H4 receptor gene are associated with systemic lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 2010;163:935–40. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.09928.x.
- [108] Thurmond RL, Desai PJ, Dunford PJ, Hofstra CL, Jiang W, Nguyen S, et al. A Potent and Selective Histamine H 4 Receptor Antagonist with Anti-Inflammatory Properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;309:404–13. doi:10.1124/jpet.103.061754.may.
- [109] Liu WL. Histamine H4 receptor antagonists for the treatment of inflammatory disorders. *Drug Discov Today* 2014;19:1222–5. doi:10.1016/j.drudis.2014.05.007.
- [110] Fornoni A, Sageshima J, Wei C, Merscher-Gomez S, Aguilon-Prada R, Jauregui AN, et al. Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Sci Transl Med* 2011;3:85ra46. doi:10.1126/scitranslmed.3002231.
- [111] Yu C-C, Fornoni A, Weins A, Hakroush S, Maiguel D, Sageshima J, et al. Abatacept in B7-1-positive proteinuric kidney disease. *N Engl J Med* 2013;369:2416–23. doi:10.1056/NEJMoa1304572.
- [112] Schiffer M, Teng B, Gu C, Shchedrina VA, Kasaikina M, Pham VA, et al. Pharmacological targeting of actin-dependent dynamin oligomerization ameliorates chronic kidney disease in diverse animal models. *Nat Med* 2015;21:601–9. doi:10.1038/nm.3843.

8. Considerações finais

As terapias imunossupressoras e os agentes biológicos atualmente empregados no manejo do lúpus eritematoso sistêmico e da nefrite lúpica controlam apenas parcialmente a atividade da doença renal, não impedindo a sua recidiva, uma vez que o tratamento pode ser insuficiente ou até ineficaz, tanto na fase aguda quanto crônica, face à heterogeneidade biológica e genética dos pacientes. O uso de novas terapias pode ser uma alternativa promissora para o tratamento das manifestações sistêmicas do LES, e esse novo contexto inclui a terapia nutricional e o uso de substâncias naturais. Essas substâncias atualmente estão em investigação como vias alternativas para controle da doença, podendo melhorar a qualidade de vida dos pacientes, reduzir complicações e mesmo as comorbidades decorrentes das complicações sistêmicas do LES. No presente estudo, buscou-se analisar o efeito desses novos tratamentos utilizando substâncias antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-fibróticas como a quercetina e a melatonina sobre a nefrite lúpica induzida no modelo de pristano.

Como fecho dessa tese, ponderamos que no modelo de pristano utilizado a quercetina e a melatonina exerceram ações protetoras sobre a integridade do tecido renal, reduzindo a infiltração celular inflamatória, o estresse oxidativo, a apoptose, a fibrose renal e também recuperando a estrutura e função dos podócitos glomerulares.

9. Perspectivas

O LES é uma doença que afeta múltiplos órgãos e uma de suas manifestações, a NL, pode levar à perda da função renal e afetar de forma significativa a qualidade de vida de pacientes acometidos por essa doença. Atualmente os tratamentos disponíveis não induzem uma resposta terapêutica completa, assim não impedindo o desenvolvimento de doença renal crônica progressiva, além de apresentar efeitos adversos muitas vezes graves, com potencial de morbi-mortalidade.

O espectro das ações protetoras da quercetina e melatonina têm sido investigados em modelos animais e em doenças humanas sob diversos aspectos. Ao concluir a presente pesquisa, ressaltamos a importância de que mais estudos testando essas substâncias devem ser estimulados, não só em modelos animais mas principalmente em humanos, e não somente no LES mas também em outras doenças auto-imunes, em neoplasias, na obesidade e na doença vascular aterosclerótica. Os efeitos biológicos da quercetina e da melatonina devem ser comparados aos tratamentos imunossupressores convencionais, incluindo os agentes biológicos e os anticorpos monoclonais atualmente empregados no manejo do LES. Devem ser investigados com maior detalhe as rotas metabólicas dessas substâncias naturais, a sua interação com outras drogas e o seu potencial de toxicidade em longo prazo.

10. Anexo

STROBE Statement - checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No.	Recomendação
Title and abstract	1	<p>“Avaliação dos efeitos do tratamento com quercetina e melatonina em modelo animal de nefrite lúpica induzido por pristano”</p> <p>A nefrite lúpica (NL) é uma manifestação renal grave do lúpus eritematoso sistêmico (LES), que pode levar à perda de função renal. O modelo animal de NL induzido por pristano reproduz a doença humana, em que se detectam autoanticorpos causando glomerulonefrite com padrão proliferativo e inflamatório, e a presença de estresse oxidativo e de marcadores pró-fibróticos. A quercetina e a melatonina são substâncias naturais que podem ser potenciais alternativas para o tratamento da NL, devido ao seu efeito anti-inflamatório, anti-oxidativo e anti-fibrótico.</p>
Introduction		
Background/rationale	2	Espera-se que o estudo com substâncias antioxidantes contribua como potenciais novas terapias para o LES e suas manifestações com menos efeitos adversos
Objectives	3	<p>Objetivo Geral</p> <p>Investigar os efeitos protetores do tratamento com quercetina e melatonina no tecido renal do modelo animal de nefrite lúpica induzido por pristano.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>Para amostras de camundongos tratados com quercetina e melatonina no modelo de pristano;</p> <ul style="list-style-type: none">- Analisar alterações morfológicas renais usando coloração de hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS);- Quantificar a fibrose no tecido renal usando o método de Picrosirius Red;- Realizar avaliação ultraestrutural, por microscopia eletrônica, do núcleo e de organelas citoplasmáticas dos podócitos;

- Detectar a expressão de marcadores específicos de apoptose (tais como Bax e/ou caspase) no tecido renal por imunofluorescência;
- Detectar a expressão de antioxidantes endógenos (como catalase e superóxido dismutase) no tecido renal por imunofluorescência;
- Avaliar alterações moleculares no tecido renal de marcadores do podócito por PCR em tempo real.

Methods

Desenho do estudo	4	Estudo em modelo experimental
Setting	5	Avaliar o efeito protetor da quercetina e da melatonina, em camundongos induzidos por pristano que desenvolveram NL, sobre a proteinúria, marcadores de inflamação, de estresse oxidativo e de fibrose, e sobre a injúria estrutural e molecular das células epiteliais podocitárias do glomérulo.
Participants	6	Camundongos fêmeas Balb/C com 60 dias de idade
Variables	7	Desenvolvimento da nefrite foi variável entre os camundongos e variáveis pré-analíticas como coleta, processamento e armazenamento das amostras podem afetar a acurácia nas análises das amostras.
Data sources/ measurement	8*	Proteínas do podócito – O RNA total das amostras do tecido foi isolado utilizando o kit RNA Blood Mini kit da Qiagen seguindo as orientações do fabricante. Após o isolamento realizou-se a síntese do DNA complementar (cDNA) conforme orientação do fabricante do kit e foi armazenado a -20°C. Em seguida efetuou-se a análise molecular por PCR em tempo real conforme o protocolo comercial do kit e utilizando o equipamento <i>StepOne™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems)</i> . Análises de marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo, enzimas antioxidantes, de apoptose e fibrose foram realizados por histomorfologia, imunofluorescência e análise ultrasestrutural.
Bias	9	N/A
Study size	10	O cálculo amostral foi baseado em dados da literatura, utilizando-se o programa WinPepi. Para um intervalo de confiança de 95%, com poder de 80%, o número de animais necessários para detectar diferença de 30% de aumento na expressão do RNAm tecidual das proteínas do podócito no rim do grupo tratado, será de 8 camundongos por grupo, considerando a perda de 2 animais por grupo, serão 10 animais por grupo.

Quantitative variables	11	Variáveis assimétricas foram expressas como mediana e intervalos interquartis e os dados sobre variáveis simétricas como média \pm desvio padrão.
Statistical methods	12	A normalidade para variáveis contínuas foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk, e os dados foram expressos como mediana e intervalos interquartis. Os dados sobre avaliações imunohistomorfometria foram agrupadas para representar um valor médio \pm desvio padrão, e a significância estatística das diferenças entre os grupos experimentais foi avaliada por análise uma via de variância corrigida pelo teste de Bonferroni. O teste de Mann-Whitney foi usado para pareamento e comparações de valores de mRNA das proteínas dos podócitos que foram transformados em log para reduzir a assimetria. A mudança nos níveis de proteinúria em três momentos foram comparados com o modelo de equação de estimação generalizada (GEE). Estes resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (intervalo de confiança de 95%) e valores de p determinados pelo teste <i>post-hoc</i> de Bonferroni. As análises foram realizadas utilizando SPSS para Windows (versão 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Results

Participants	13*	(a) 10 animais por grupo
		(b) N/A
		(c) N/A
Descriptive data	14*	10 animais por grupo
Outcome data	15*	Camundongos induzidos por pristano apresentam sérias alterações na morfologia renal em relação ao grupo controle. O dano observado nos rins desses camundongos envolveu a presença de infiltrado inflamatório (quercetina 7,42% e melatonina 3,49%), proliferação celular mesangial glomerular, esclerose dos tufo glomerulares, alargamento do epitélio tubular, lúmen tubular preenchido com agregados proteicos e túbulos proximais apresentaram-se frequentemente desprovidos de borda em escova. Enquanto o grupo controle não apresentou alterações renais, apenas 0,83% de inflamação. Além disso, os camundongos induzidos por pristano apresentaram

		<p>expansão da matriz mesangial seguida por glomerulonefrite endo ou extra capilar que envolveu mais de 50% dos glomérulos apresentando um aumento significativo de depósito de colágeno intersticial comparado aos controles. Enquanto os camundongos tratados com quercetina ou melatonina tiveram uma redução significativa no depósito de colágeno intersticial. Também houve redução de enzimas antioxidantes no modelo induzido por pristano, achatamento dos pedicelos do podócitos (FP), espessamento da membrana basal glomerular e redução da expressão do RNAm das proteínas do podócito (podocin, podoplanina e $\alpha 3\beta 1$-integrinas). Além disso, os camundongos induzidos por pristano tratados com quercetina ou melatonina apresentaram redução das lesões renais incluindo a esclerose glomerular, a expansão da matriz mesangial, dano tubular, fibrose intersticial, achatamento dos pedicelos dos podócitos, inflamação (4,23% para a quercetina e 1,2% para a melatonina), apoptose e ocorreu também o aumento das enzimas antioxidantes.</p>
Main results	16	Os resultados fornecem evidências de que a quercetina e melatonina essas substâncias restauram as alterações morfológicas renais, reduzindo significativamente o estresse oxidativo, a inflamação e a extensão da fibrose intra-renal, além de restaurar a expressão do RNAm da podocina do podócito nos camundongos tratados com quercetina e reduziu a fusão podocitária na análise ultra-estrutural.
Other analyses	17	N/A
Discussion		
Key results	18	Redução do estresse oxidativo, da inflamação e da extensão da fibrose intra-renal, além de restaurar a expressão do RNAm da podocina do podócito nos camundongos tratados com quercetina e reduzir a fusão podocitária na análise ultra-estrutural.
Limitations	19	Não houve análise de autoanticorpos no modelo considerando que outros estudos comprovaram ser um modelo que desenvolve uma doença com características do lúpus humano nos camundongos.
Interpretation	20	Com base nos achados, consideramos que a quercetina e a melatonina podem ser uma alternativa terapêutica promissora para minimizar a lesão renal relacionada aos processos patológicos da NL, inclusive nos

		podócitos glomerulares, com recuperação da barreira do filtro glomerular.
Generalisability	21	Investigar novas substâncias com potencial para terapias alternativas afim de minimizar os efeitos colaterais das atuais terapias disponíveis.
Other information		
Funding	22	Este estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE / HCPA), pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil e pela CAPES/PDSE (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, número 88881.134006 / 2016-01).

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.