



MODELO EXPERIMENTAL DE GLOMERULONEFRITIS MEMBRANOSA INDUCIDA CON ALBUMINA BOVINA

EXPERIMENTAL MODEL OF MEMBRANOUS GLOMERULONEPHRITIS INDUCED BY BOVINE SERUM ALBUMIN

Fontenla de Petrino S¹, Sosa María L¹, Gómez José M¹, Abdala M¹,
Alonso J¹, Fontenla M¹, Prchal A².

Universidad Nacional de Tucumán, Argentina., Facultad de Medicina, ¹Cátedra de Biología;
²Cátedra de Neurociencia. Avenida Roca 2100. 2° Piso. 4000-San Miguel de Tucumán, Argentina.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue diseñar un modelo experimental de Glomerulonefritis Membranosa (GM) en ratas Wistar, inducida con Seroalbúmina Bovina (BSA), y validarlo mediante la determinación de parámetros bioquímicos, histológicos, ultraestructurales y detección de inmunocomplejos por inmunofluorescencia (IF). Los animales del grupo experimental fueron inmunizados por vía subcutánea, con dosis de 3 mg c/u de BSA/PBS con adyuvante de Freund. Se efectuaron diferentes esquemas de inmunización. Cuando el título de anticuerpos fue $\geq 1/2$, comenzó la administración diaria de 2 mg, por vía endovenosa de BSA/PBS, durante 15 días. Se evaluó la funcionalidad renal por la proteinuria; después de la 5ª semana, desde su aparición, se determinó: depuración (*clearance*) de creatinina, uremia, proteinemia y perfil lipídico. Los dos riñones se usaron para estudios histológicos, ultraestructurales y detección de inmunocomplejos por IF. Los resultados mostraron que la inmunización fue efectiva con 5

inoculaciones c/15 días. En los animales nefróticos la proteinuria, depuración (*clearance*) de creatinina, proteinemia, uremia y el perfil lipídico presentaron alteraciones significativas ($p < 0.0001$). Al microscopio óptico se observó hiperplasia celular, engrosamiento difuso de las membranas basales de los capilares glomerulares y diferentes grados de atrofia, esclerosis e hialinización de los glomérulos. Por IF se detectó inmunocomplejos IgG en el 100 % de los glomérulos. Ultraestructuralmente, se observaron depósitos subepiteliales electrodenso en la membrana basal engrosada, compatibles con inmunocomplejos. Se encontraron alteraciones en la estructura de los podocitos. En conclusión, los estudios bioquímicos, estructurales y ultraestructurales permitieron inferir la inducción de un síndrome nefrótico experimental. Concluimos que el protocolo utilizado tiene validez para la inducción de una glomerulonefritis membranosa en ratas Wistar.

PALABRAS CLAVE

Síndrome nefrótico, inmunocomplejos, proteinuria.

ABSTRACT

The aim of this research was design an experimental model of membranous glomerulonephritis (GM) in Wistar rats induced by bovine serum albumin (BSA), and

Información del artículo

Recibido: 16 de enero de 2013.

Aceptado: 26 de febrero de 2013.

*Autor correspondiente:

Fontenla de Petrino S. José Colombres 255, Facultad de Medicina. UNT 4000-San Miguel de Tucumán Argentina
Tel. +54(381) 15 478 2030. Correo electrónico: silviapetrino@gmail.com

validated it through biochemical, histological, ultrastructural parameters determination and immunocomplexes by immunofluorescent technique (IF). Experimental animals were immunized subcutaneously with doses of 3 mg of BSA / PBS with Freund's adjuvant. Different immunization schedules were carried out. When the antibody title was $\geq 1/2$, daily administration of 2 mg intravenously BSA / PBS, for 15 days began. Renal function was assessed by proteinuria, after the 5th week, from its appearance, creatinine clearance, uremia, protein levels and lipid profile was determined. The two kidneys were used for histological, immunofluorescent and ultrastructural studies. Results showed that immunization was effective with 5 inoculations every 2 weeks. In nephrotic animals the proteinuria, creatinine clearance, protein levels, uremia and lipid profile showed significant changes ($p < 0.0001$). Hypercellularity, diffuse thickening of the basement membranes of the glomerular capillaries and different degrees of atrophy, sclerosis and hyalinization of the glomeruli by light microscopy was observed. IgG immune complexes were detected by IF in 100 % of the glomeruli. Ultrastructurally, sub-epithelial electron dense deposits (immune complexes compatible) in the basement membrane and podocytes structure alterations were also found. In conclusion, biochemical, structural and ultrastructural assays allowed to infer the induction of experimental nephrotic syndrome.

KEY WORDS

Nephrotic syndrome, immunocomplex, proteinuria.

Introducción

La glomerulonefritis membranosa (GM) tiene una incidencia de 1 caso por cada 100.000 personas por año (Bockenhauer *et al.*, 2008), y su *fenotipo* ha sido definido en base a sus características histológicas. La GM, también llamada glomerulonefritis por inmunocomplejos, es reconocida como una entidad patológica desde 1950 y es el diagnóstico más frecuente en el adulto con síndrome nefrótico (Glassock, 2010). Es una enfermedad que progresa lentamente y es más frecuente en hombres que en mujeres, entre 30-50 años. Casi el 85% de los casos se clasifican como primarios es decir, la causa del trastorno es idiopática o desconocida. El resto son de origen secundario, es decir, causado por condiciones autoinmunes (lupus eritematoso sistémico, infección- en particular el cáncer de pulmón, colon y melanomas) (Moranne *et*

al., 2008). En individuos caucásicos se ha determinado mayor susceptibilidad genética para padecer las formas primarias de esta enfermedad cuando poseen: HLA-B8, HLA-B18 y HLA-DR3 (Hofstra & Wetzels, 2010).

La GM se caracteriza principalmente por un engrosamiento difuso de la membrana basal glomerular por el depósito subepitelial de inmunocomplejos (Vozmediano 2005). Los antígenos que estimularían la formación de anticuerpos serían glicoproteínas de la membrana, los cuales han sido identificados en las nefropatías membranosas humanas autoinmunes (Debiec *et al.*, 2002). Recientemente, los trabajos de Beck *et al* (2011) mostraron que el receptor de la fosfolipasa A2 tipo M - PLA2R - es el autoantígeno diana en la mayoría de los pacientes adultos con GM idiopática. PLA2R es una proteína de membrana localizada en los podocitos (Hofstra & Wetzels, 2012).

Se ha señalado que la localización de los inmunocomplejos en el riñón depende del tamaño y de la concentración relativa de antígeno y anticuerpo (Sobarzo & Vilches, 2004). La GM estaría determinada por complejos pequeños, formados en exceso de antígeno, que se depositarían en la zona subepitelial de la membrana basal. La lesión subsiguiente al depósito de los complejos se debe a la activación de numerosos mediadores proinflamatorios que activan a células infiltrantes y a células glomerulares locales. El mediador proinflamatorio más importante sería el complejo de ataque del sistema del complemento (MAC-C5b-9) (Glassock, 2009) que estimula, en las células epiteliales glomerulares, la biosíntesis de las enzimas que catalizan la formación de radicales oxidantes. El hallazgo en orina del MAC-C5b-9 se ha considerado como una prueba diagnóstica de la enfermedad en actividad (Chen *et al.*, 2007). El MAC-C5b-9 en pequeñas cantidades estimula a los podocitos a producir proteasas, oxidantes prostanoídes, componentes de la matriz extracelular y citoquinas, incluyendo el factor de crecimiento transformante β (TGF-beta) (Nangaku & Couser, 2005). También, puede causar alteraciones en el citoesqueleto que llevan a una alteración de la estructura de los podocitos y su disposición en la cápsula de Bowman (Ortiz *et al.*, 2002). El daño que produce esta respuesta inflamatoria se traduce en una disfunción del filtrado glomerular, por lo que pueden detectarse proteínas en orina, éste es uno de los signos más importantes, ya que varía de acuerdo al grado de lesión renal (Vozmediano *et al.*, 2005). Por otro lado, también los lípidos se ven afectados por los compuestos oxidantes

y por la pérdida por la orina de enzimas que actúan en el metabolismo lipídico (Rodríguez Albanés *et al.*, 2003).

Para estudiar este tipo de enfermedades se han utilizado modelos animales, cuya validación ha permitido el descubrimiento de terapias que prolongaron la expectativa y/o la calidad de vida de los pacientes. (Parra, 2002), y conocer los mecanismos del daño renal en humanos. El modelo de nefritis de Heymann *et al.*, (1959) fue uno de los primero realizados en rata para el estudio de la GM en humanos. El autor utilizó una forma activa de inmunización con preparados de riñón de rata en adyuvante completo de Freund.

En 1978, Yamamoto *et al* describieron un modelo de GM en ratas Wistar inducida con albúmina bovina. Estos investigadores realizaron una inmunización con 1mg de albúmina en adyuvante de Freund por vía subcutánea y 8 semanas después, se inoculó el mismo antígeno por vía endovenosa, durante varias semanas con el objeto de provocar la formación de complejos inmunes que se acumularon en la membrana basal provocando la disfuncionalidad renal.

Este grupo de trabajo trató de replicar el modelo de Yamamoto en la colonia de ratas Wistar existentes, en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNT (Argentina), para probar el efecto de diferentes dietas, sin lograr buenos resultados. Por ello, el objetivo de este trabajo fue diseñar un modelo experimental de Glomerulonefritis membranosa crónica en ratas Wistar, inducida con Sero Albumina Bovina (BSA) y realizar su validación mediante la determinación de parámetros bioquímicos, histológicos, ultraestructurales y detección de inmunocomplejos por IF.

Materiales y Métodos

Animales de experimentación

Se emplearon Ratas Wistar macho, provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Tucumán (Argentina) que pesaban entre 180 y 200 g. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de bioterio, con agua y alimento balanceado (Cargill, Buenos Aires) *ad libitum*.

Todos los experimentos se realizaron según las directivas de la Unión Europea (86/609/EEC) y las

reglas y recomendaciones, en el manejo de los animales de la FESSCAL (Federación de Sociedades Sudamericanas de la Ciencia de Animales de Laboratorio).

Inducción de anticuerpos séricos anti BSA (Inmunización)

Para la inducción de GM se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) Sigma Chemicals, USA. Los animales del grupo experimental fueron inmunizados por vía subcutánea, con dosis de 3 mg c/u de BSA diluida en PBS con adyuvante de Freund (Sigma Chemicals, USA). La primera inmunización se realizó con adyuvante de Freund completo y las siguientes con el adyuvante incompleto.

Se efectuaron diferentes esquemas de inmunización:

- 1) con 2 dosis, 1 cada 7 días
- 2) con 3 dosis, 1 cada 7 días
- 3) con 4 dosis, 1 cada 15 días
- 4) con 5 dosis, 1 cada 15 días

Cada experiencia se realizó con 6 animales experimentales (N=24). Como Control se utilizaron 6 animales a los que se les inoculó solución salina fisiológica tamponada (PBS).

La efectividad de la inmunización, es decir, la presencia de anticuerpos séricos se controló 2 veces por semana, utilizando la técnica de inmunoprecipitación de Ouchterlony en agarosa 1% (Ouchterlony, 1962).

Inducción de inmunocomplejos

Cuando el título de anticuerpos sérico fue $\geq 1/2$, se comenzó con la administración diaria de 2 mg, por vía endovenosa de BSA/PBS, durante 15 días consecutivos, para inducir la formación de inmunocomplejos. A los animales controles se les inyectó por vía endovenosa solución salina.

A partir de la inoculación endovenosa de BSA/PBS, se evaluó la funcionalidad renal, dos veces por semana, con el objeto de detectar proteinuria mediante la técnica turbidimétrica con ácido sulfosalicílico (Flores Sanchez *et al.*, 2007).

Validación del modelo

Después de la 5ª semana, desde la aparición de la proteinuria, los animales fueron anestesiados con Ke-

tamina (Ketamine 50, HOLLIDAY-SCOTT S. A.), 250 mg kg⁻¹, y Xylacina (Xilacine 2 % Alfasan, Woerden Holland), 7 mg kg⁻¹; se extrajo sangre para determinar parámetros bioquímicos, previa toma de muestra de orina de 24 h. Luego, fueron sacrificados por sobredosis anestésica. Posteriormente, se extrajeron los dos riñones, los que fueron seccionados por sus ejes longitudinales y utilizados para estudios histológicos clásicos, inmunohistoquímicos y ultraestructurales.

La funcionalidad renal fue evaluada mediante: a) depuración de creatinina: depuración de creatinina endógena mediante las determinaciones en suero y orina de 24 h, mediante técnicas espectrofotométricas (Wiener Lab, Rosario, Argentina); b) Uremia y proteinemia por métodos espectrofotométricos (Wiener Lab, Rosario, Argentina).

El perfil lipídico se determinó en suero con los siguientes ensayos: Colesterol Total, LDL-Colesterol, HDL-Colesterol y Triglicéridos por técnicas espectrofotométricas (Wiener Lab, Rosario, Argentina).

Para los estudios histológicos se trabajó con la técnica clásica de fijación en paraformaldehído al 4 % en PBS, inclusión en parafina y tinciones con Hematoxilina – eosina (HE), y Pas-hematoxilina (Pas-H).

Para los análisis ultraestructurales por microscopía electrónica (M.E.) se fijaron las muestras de riñón en glutaraldehído en tampón cacodilato a 4°C y fueron procesadas en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

Para detectar la presencia de inmunocomplejos de IgG, a nivel de los glomérulos, se utilizó la IF. Las muestras de riñón se congelaron a -70°C con nitrógeno líquido y se cortaron en láminas de 3 µm, en crióstato. Estas muestras fueron incubadas con 0.2 mL de suero de cabra IgG anti rata (cadena gamma específica, Bethyl Inc., Montgomery, Texas, USA) a una dilución de 1/20 durante 30 minutos, en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego, fueron lavados tres veces con buffer fosfato 0.01 M, pH=7.2. Se agregó a continuación el segundo anticuerpo: Fragmento F(ab')₂ anti cabra, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Cappel, ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, California, USA), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los preparados fueron lavados nuevamente 3 veces con el buffer, secados al aire y montados

con (1:9) glicerol-buffer fosfato, pH 9. Finalmente, fueron analizadas tres muestras de un mismo animal con un Microscopio de epifluorescencia Leica, a 520±20 nm. Los resultados se expresaron como el N° de glomérulos IF positivos por campo de 10x.

Análisis estadísticos

El análisis de los resultados se realizó con el programa SPSS (v 9.0). Se determinó la diferencia estadística a través de t-student.

Resultados

Esquemas de inmunización

Con respecto a la inmunización, los esquemas 1, 2, 3 y 4 no fueron efectivos para la formación de anticuerpos, cuya presencia fue analizada en todos los esquemas mediante la técnica de inmunoprecipitación.

Aplicando el último esquema de 5 inoculaciones de BSA/PBS cada 15 días, obtuvimos sueros con una concentración de anticuerpos $\geq 1/2$, valores que llegaron hasta 1/4. Por ello, de aquí en adelante, sólo se presentan los resultados obtenidos con este esquema de inmunización.

Formación de inmunocomplejos

La funcionalidad renal, medida por la proteinuria, se vio afectada desde los 15-20 días posteriores a la primera inoculación de BSA por vía endovenosa, se consideraron valores patológicos por arriba de 50 g/24 h. Como nuestro objetivo era diseñar un modelo crónico de la enfermedad, las inoculaciones endovenosas se realizaron hasta 15 días posteriores a la aparición de la proteinuria, para evitar que la disfuncionalidad renal produjera la muerte de los animales antes de las 5 semanas de sobrevida. Los valores llegaron hasta alrededor de los 600 mg/24 h, como puede verse en la Tabla 1.

Validación del modelo

En los animales nefróticos las pruebas funcionales (proteinuria, depuración de creatinina, proteinemia y uremia) presentaron una diferencia significativa ($p < 0.0001$) con respecto a los controles (Ver Tabla 1).

En el perfil lipídico, tanto el colesterol total como sus fracciones, evidenciaron modificaciones significativas. En los animales experimentales los sueros presentaron una lipemia observada macroscópicamente debido a la

presencia de elevadas concentraciones de triglicéridos, como pudo constatarse a través de su dosaje (Tabla 1). Estos valores confirmaron una alteración significativa del metabolismo lipídico.

Tabla 1.
Determinaciones Bioquímicas.

Análisis	Control	Experimental	t	p
Proteinuria g/24h	30.83±5.07	600±104.6	-13.305	<0.0001
Clearance de Creatinina (mL min ⁻¹)	0.78±0.14	1.60±0.10	10.874	<0.0001
Uremia g L ⁻¹	0.23±0.05	0.52±0.07	-8.201	<0.0001
Proteinemia g dL ⁻¹	6.23±0.45	4.08±0.61	6.913	<0.0001
Colesterol total (g L ⁻¹)	1.03±0.15	5.1±0.75	-13.004	<0.0001
LDL-Colesterol (g L ⁻¹)	0.80±0.11	3.48±0.03	-11.703	<0.0001
HDL-Colesterol (g L ⁻¹)	0.34±0.54	0.19±0.02	8.813	<0.0001
Triglicéridos (g L ⁻¹)	1.23±0.40	8.55±1.28	-13.311	<0.0001

Al microscopio óptico, los cortes de riñón de los animales experimentales (Figura 2 a, b, c) presentaron una marcada hiper celularidad, un engrosamiento difuso de las

membranas basales de los capilares glomerulares y diferentes grados de atrofia, esclerosis e hialinización de los glomérulos, a diferencia de los controles normales (Figura 1).

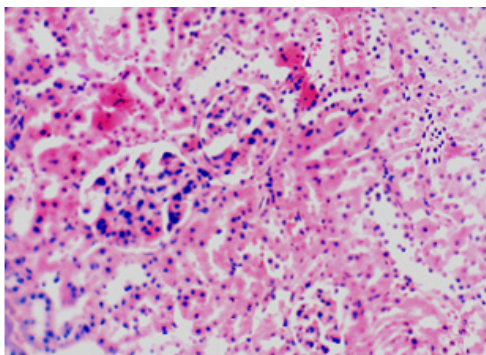


Figura 1. Corte de Riñón, de animales controles. H-E 10x

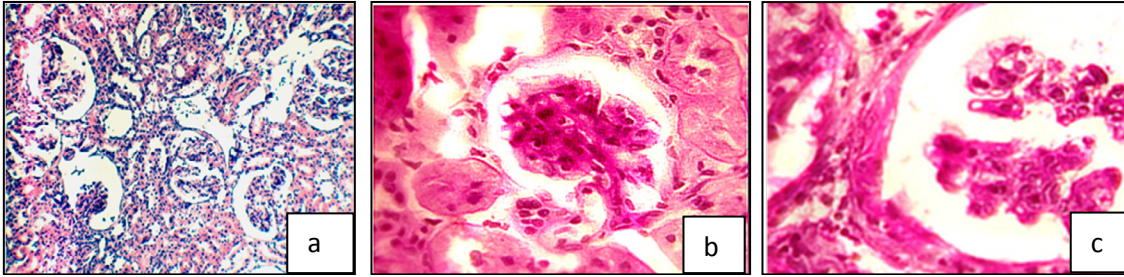


Figura 2. Corte de riñón de animales experimentales. a) HE ,10x; b) Pas-H, 40x y c) Pas-H, 40x.

Por IF se ha comprobado la presencia de inmunocomplejos IgG en el 100 % de los glomérulos (Figura 3 a y b). Estos complejos se formaron: con la IgG antiálbumina bovina que se indujo en el período de inmunización y con la

albúmina bovina inoculada vía endovenosa. Estos complejos inmunes debido a su tamaño no pueden ser filtrados y se acumulan en el subepitelio produciendo una alteración en la filtración urinaria y posterior daño renal.

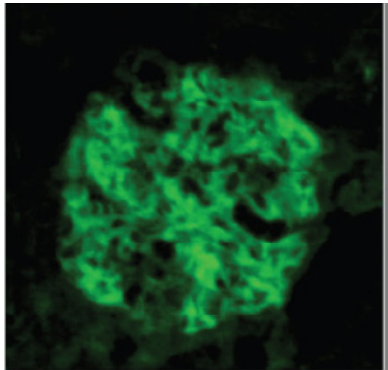


Figura 3a. Inmunocomplejos (IgG) Inmunofluorescencia (40x)

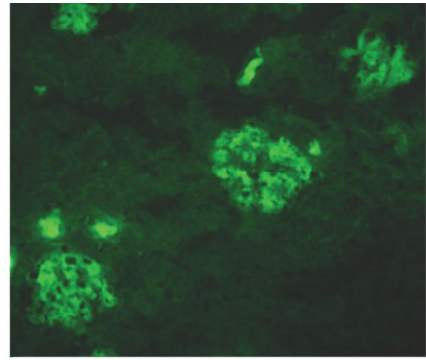


Figura 3b. Inmunocomplejos (IgG) Inmunofluorescencia (10x)

A nivel ultraestructural, se observó la presencia de depósitos electrodensos en el lado epitelial de la membrana basal (depósitos subepiteliales). Estos depósitos podrían ser responsables del engrosamiento de la

membrana ya que son compatibles con inmunocomplejos observados por IF. Se evidencia también alteraciones en la estructura de los podocitos.(Figura 4 a y b).



Figura 4a. Endotenormal ME (50.000 x)

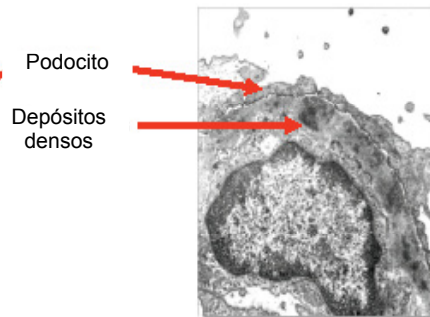


Figura 4b. Endotelio rata nefrótica ME (50.000 x)

Discusión

Los modelos animales son ampliamente usados en investigaciones sobre la etiología, la terapéutica y el pronóstico de las enfermedades humanas (Rodríguez Yunta, 2007). Los modelos animales consisten en inducir una enfermedad que tenga el mayor parecido posible con la patología en humanos que se desea estudiar. En este trabajo desarrollamos y validamos un modelo experimental en rata Wistar de glomerulonefritis membranosa, causada por inmunocomplejos.

La etapa de inmunización fue similar a la realizada en ovejas por Ashley Jefferson *et al.*, 2010. Sin embargo, si comparamos nuestros resultados con otros autores (Pippin *et al.*, 2009; Nakatsue *et al.*, 2005) que trabajaron con ratas Wistar, sólo necesitaron 1-2 dosis de BSA para obtener la formación de anticuerpos. En nuestro trabajo se inocularon 5 dosis, 1 cada 15 días de BSA para obtener anticuerpos en títulos $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$. Esto llevó a que la enfermedad se desarrollara de manera lenta y con gran posibilidad de mantener a los animales por varias semanas, lo que permitió evaluar la etapa crónica de la patología estudiada.

Una baja respuesta inmune, similar a la obtenida en el presente trabajo, también fue reportada por Mampaso *et al.*, (2002) quienes afirman que aquellos animales que tienen una discreta respuesta inmunológica muestran diversas formas histológicas de GN proliferativa con infiltrados celulares inflamatorios en el glomérulo, engrosamiento de la pared capilar, así como una proteinuria severa.

Podríamos inferir también, que la efectividad de la inmunización depende de la especie y cepa del animal que se utiliza. En estudios recientes Chen *et al.*, 2004, utilizaron tres especies de ratones (ICR, Balb/c, C57BL6), y usaron como antígeno inductor albúmina bovina cationizada. El nivel de anticuerpos y posteriormente la presencia de inmunocomplejos fue diferente en las distintas especies. Sólo las ICR y Balb/c desarrollaron la enfermedad y con Balb/c utilizaron dosis mayores del antígeno.

En nuestro modelo experimental, la proteinuria fue detectada a partir de la segunda semana, luego de la administración endovenosa de BSA, considerándose como niveles patológicos desde los 50 g/24 h. Los animales experimentales presentaron una elevación progresiva de estos valores hasta llegar a la 5ª semana con 600 g/24 h (Tabla 1). Los neutrófilos, monocitos y linfocitos produ-

cen infiltración en el riñón y juegan un importante rol en el desarrollo de la proteinuria (Rincón *et al.*, 2000). Esto concuerda con lo descrito por Brähler *et al.*, (2012) quienes afirman que el desarrollo de la injuria glomerular es la causa más importante de la progresión de la enfermedad renal. Ellos consideraron que la principal señal de daño es el factor NF- κ B, producido por los podocitos, ya que al inhibir específicamente su producción, produjeron una mejora de la proteinuria y de la alteración estructural de las células.

En el síndrome nefrótico la evaluación de los niveles séricos de urea y creatinina se suelen emplear como indicadores de la función renal. Si se eliminan los factores renales, la presencia de azotemia implica una pérdida funcional de alrededor del 75 % o más nefronas (Elliot *et al.*, 2000).

En nuestros estudios los niveles de urea y creatinina muestran un deterioro severo de la función renal. No obstante, los niveles de urea y creatinina se deben interpretar con cautela, en especial, cuando se encuentran dentro del límite superior de la normalidad o ligeramente elevados, porque incluso un deterioro bastante sustancial de la función renal sólo causará elevaciones relativamente pequeñas de los niveles de urea/creatinina. En cambio, en estadios avanzados de la enfermedad renal un deterioro relativamente pequeño de la función renal puede causar un incremento marcado de las concentraciones de urea/creatinina. En general, las concentraciones séricas de creatinina reflejan el estado de la función renal con mayor exactitud que las concentraciones de urea (Elliott *et al.*, 2000).

Habitualmente, en el síndrome nefrótico se observa hipoproteinemia e hipercolesterolemia. La primera se debe, especialmente, a la alteración glomerular que permite la pérdida de proteínas por la orina. Cuando se habla de hipercolesterolemia, también se dice que hay una alteración en todo el perfil lipídico. Todos estos parámetros estuvieron alterados en nuestro modelo. Esto concuerda con los estudios de Montoro *et al.*, 2009, quienes reportaron que la síntesis proteica corporal es normal e incluso elevada, por lo tanto la hipoproteinemia es una consecuencia directa de las grandes pérdidas proteicas. Mientras, se ha demostrado que existe una relación inversa entre la concentración de albúmina plasmática y las concentraciones de colesterol y triglicéridos. De acuerdo a Saban y Tello, 2012 habría tres mecanismos para explicar la alteración del perfil lipídico: la más importante sería el aumento de la síntesis de lipoproteínas por el hígado, en respuesta a la hipoproteinemia, disminución del

metabolismo lipídico y disminución del aclaramiento de lipoproteínas del plasma, mediada por receptores. A nivel experimental los lípidos pueden promover la infiltración mononuclear, los que luego se transforman en macrófagos y por último se transforman en células espumosas. Estas células liberarían mediadores inflamatorios que agravarían la lesión glomerular.

Con respecto a los estudios estructurales realizados, se observa una infiltración glomerular, engrosamiento de la pared capilar con atrofia, esclerosis e hialinización visible de los glomérulos (Figura 2 a, b, c). De acuerdo a Schiffer *et al.*, 2001 esto se debería a que los podocitos llevarían a cabo una apoptosis asociada a la expresión de TGF- β 1 y de Smad7, que promueven la apoptosis en cultivos de podocitos a través de diferentes mecanismos.

Por inmunofluorescencia (IF) pudo comprobarse la presencia de inmunocomplejos IgG en el 100 % de los glomérulos (Figura 3 a y b). Esto se vinculó a nivel ultraestructural, con el engrosamiento de la membrana basal por la presencia de depósitos electrodensos (depósitos subepiteliales) (Figura 4 a y b). También, por microscopía electrónica, se reveló un engrosamiento de la membrana basal así como modificaciones muy marcadas en la estructura de los podocitos (Figura 5 a y b). Los hallazgos por microscopía electrónica son muy similares a los pu-

blicados por Barat *et al.*, (2002). Estos autores también observaron depósitos electrodensos en el lado epitelial de la membrana basal, es decir entre la membrana basal y los podocitos. Estos depósitos son denominados, comúnmente, como depósitos subepiteliales o transmembranosos. En tal sentido Ehrenreich y Churg (1975) describen cuatro estadios de la glomerulopatía membranosa en función de la densidad de estos depósitos. Dentro de esta clasificación las observaciones aquí presentadas (Figura 4 b) corresponderían a los estadios II-III.

Conclusiones

Tanto las pruebas bioquímicas como los estudios estructurales y ultraestructurales permitieron inferir la inducción de un síndrome nefrótico experimental. Asimismo, la presencia de inmunocomplejos se comprobó por inmunofluorescencia, lo que fue compatible con el engrosamiento evidente observado por microscopía electrónica. Concluimos que el protocolo utilizado tiene validez para la inducción de una glomerulonefritis membranosa en ratas Wistar.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con aportes del Subsidio otorgado por el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. Código: 26-I404.

Literatura citada

- Ashley Jefferson J, Pippin JW, Shankland SJ. Experimental Models of Membranous Nephropathy Drug Discovery Today Disease Models 2010; 7(1-2): 27-33.
- Barat A, Barrio Molina M, Manzarbeitia F. Sinopsis de patología ultraestructural del glomérulo renal. Revista Española de Patología 2002; 35(2):151-166.
- Beck LH, Fervenza FC, Beck DM, Bonegio RG, Malik FA, Erickson SB, *et al.*, Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. Journal of the American Society of Nephrology 2011; 22: 1543-50.
- Bockenhauer D, Debiec H, Sebire N, Barratt M, Warwicker P, Ronco P, *et al.*, Familial membranous nephropathy: an X-linked genetic susceptibility? Nephron Clinical Practice 2008; 108: 10-15.
- Brähler S, Ising C, Hagmann H, Rasmus M, Hoehne M, Kurschat C, *et al.* Intrinsic proinflammatory signaling in podocytes contributes to podocyte damage and prolonged proteinuria. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 2012; 303:(10) 1473-85.
- Chen A, Frank R, Vento S, *et al.* Idiopathic membranous nephropathy in pediatric patients: presentation, response to therapy, and long-term outcome. *BioMed Central Nephrology* 2007;8:11. doi:10.1186/1471-2369-8-11.
- Chen JS, Chen A, Chang LC, Chang WS, Lee HS, Lin SH *et al.* Mouse model of membranous nephropathy induced by cationic bovine serum albumin: antigen dose-response relations and strain differences. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2004; 19: 2721-28.

- Debiec H, Guignon V, Mougnot B, Decobert F, Haymann JP, Bensman A, *et al.*, Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *The New England Journal Medical*. 2002, 346: 2053-60.
- Ehrenreich T, Chung J. Pathology of membranous nephropathy. En *Kidney Pathology Decenal 1966-1975*, Series Editor, Sheldon C. Sommers, Apleton-Century-Crofts. New York, 1975, 389-433.
- Elliott J, Rawlings JM, Markwell PJ, Barber PJ. *et al.*, Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure: effect of dietary management. *Journal of Small Animal Practice* 2000; 41(6): 235-242.
- Flores Sánchez J, Llamazares Azuara L, Rodríguez Martínez, M. Reproducibilidad de la concentración de proteínas urinarias por el método de ácido sulfosalicílico en el tiempo. *Bioquímica (Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, Mexico DF)* 2007; 32 suppl A: 132-133.
- Glasscock RJ. The pathogenesis of idiopathic membranous nephropathy: a 50-year odyssey. *American Journal Kidney Disease* 2010; 56: 157-167.
- Glasscock RJ. Human Idiopathic Membranous Nephropathy — A Mystery Solved?. *The New England Journal of Medicine* 2009; 361: 81-83.
- Heymann W, Hackel DB, Harwood S, Wilson SGF, Hunter JLP. Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1959; 100: 660-664.
- Hofstra JM, Wetzels JF. Anti-PLA₂R antibodies in membranous nephropathy: ready for routine clinical practice?. *Netherland Journal of Medicine* 2012; 70(3): 109-113.
- Hofstra JM, Wetzels JF. Alkylating agents in membranous nephropathy: efficacy proven beyond doubt. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2010; 25: 1760-66.
- Mampaso F, Nieto E, Pérez de Lema G. Modelos experimentales: aplicabilidad en el estudio de las enfermedades renales glomerulares de origen inmunológico. *Revista Española de Patología* 2002; 35,(2): 127-138.
- Montoro JB, Segarra A, López R, Monterde J. *Nefrología [Monografía en Internet] Sociedad Española de Nefrología hospitalaria, 2009 [consultado el 24 de septiembre 2012]. Disponible en: [http:// www.sefh.es/biblioteca-virtual/fhtomo2/CAP12.pdf](http://www.sefh.es/biblioteca-virtual/fhtomo2/CAP12.pdf)*
- Moranne O, Watier L, Rossert J, Stengel B. Primary glomerulonephritis: an update on renal survival and determinants of progression. *QJM: An International Journal of Medicine* 2008; 101:215-224.
- Nakatsue T, Koike H, Han GD, Suzuki K, Miyauchi N, Yuan H, *et al.* Nephrit and podocin dissociate at the onset of proteinuria in experimental membranous nephropathy. *Kidney International* 2005; 67 (6):2239–53.
- Nangaku M, Couser WG. Mechanisms of immune-deposit formation and the mediation of immune renal injury. *Clinical and Experimental Nephrology* 2005; 9: 183-191.
- Ortiz, A, Marrón B , Ramos A. El Destino de los Podocitos en las Nefropatías Proteinúricas. *Nefrología* 2002; 22(5):425-431.
- Ouchterlony, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Progress in Allergy* 1962; 6: 30–154.
- Parra G. Mecanismos en la patogénesis de las glomerulonefritis y su aplicación terapéutica. *Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica* 2002; 2(2) 6: 72-85
- Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-About FC, Durvasula RV, Hauser PV, Kowalewska J, *et al.* Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *American Journal of Physiology- Renal Physiology* 2009; 296: 213–229.
- Rincón, J, Parra, G, Quiroz, Y, Benatuil, L, Rodríguez Iturbe, B. Cyclosporin A reduces expression of adhesion molecules in the kidney of rats with chronic serum sickness. *Clinical and Experimental Immunology* 2000; 121: 391-398.
- Rodríguez Albanés A, Barranco Hernández E, Alonso Rodríguez CA, Soto Matos J. Comportamiento de la peroxidación lipídica en la insuficiencia renal crónica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas [serie en internet]* 2003 [consultado en 2011 junio 3]; 22(1): [aprox.5pp]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/ibi02103.htm.
- Rodríguez Yunta E. Ética de la Investigación en Modelos Animales de Enfermedades Humanas. *Acta Bioethica*. [serie en Internet]. 2007 [consultado 2012 diciembre 24]; 13(1): 25-40. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-569X2007000100004&lng=es. doi: 10.4067/S1726-569X2007000100004.
- Sabán J, Tello S. Dislipemias Secundarias .En: *Control global del Riesgo Metabolico* . Ediciones Díaz de Santos, Madrid, 2012: 523-530.
- Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Koop JB, Ten Dijke P, MundelP *et al.* Apoptosis in podocytes induced by TGF-Beta and Smad7. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 108: 807-816.

- Sobarzo Toro M, Vilches A. La nefropatía membranosa en el adulto. *Medicina (Buenos Aires)* 2004; 64: 59-65.
- Vozmediano C, Sanchez de la Nieta MD, Gonzalez L, Alvarez T, de la Torre M, Blanco J, Nieto J, *et al.* Síndrome nefrótico e insuficiencia renal aguda por nefropatía membranosa y proliferación extracapilar. *Nefrología*, 2005; 25(3): 328-331.
- Yamamoto T, Kihara I, Morita T, Oite T: Bovine serum albumin (BSA) nephritis in rats. I. Experimental model. *Acta Pathologica Japonica* 1978; 28(6): 859-866.

Como citar este artículo: Fontela de Petrino S, Sosa María L, Gómez JE, Abdala M, Alonso J, Fontela M, Prchal A. Modelo experimental de glomerulonefritis membranosa inducida con albumina bovina. *Revista Bio Ciencias*. 2013; 2(3): 162-171.

