

**SINTEZA PROIECTULUI DE CERCETARE
RU-TE 112/2010**

**TEMA:
ETIOMORFOPATOLOGIA GLOMERULONEFRITELOR
IMUNE LA CÂINE**

**Director de proiect,
Asist.dr. Sorin-Aurelian Pașca**

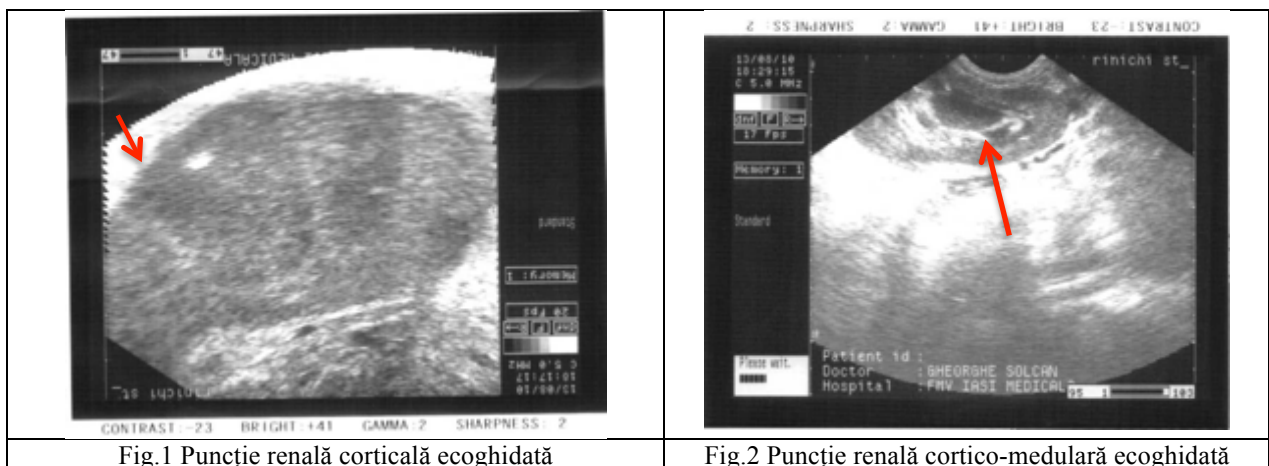
Pe parcursul etapei, conform obiectivelor propus, s-a continuat examinarea clinică a câinilor cu insuficiență renală în grade variabile (proteinurie moderată și severă). S-au efectuat pe pacienții în viață examene citologice prin puncția ecoghidată cu ac fin a formațiunilor detectate ecografic. Astfel, a fost posibilă diagnosticarea rapidă a unor procese patologice cu localizare renală (formațiuni chistice congenitale, distrofii, inflamații, tumori renale). Pe câinii decedați sau eutanasiați s-au efectuat necropsii, s-au recoltat probe, s-au prelucrat, s-au fotografiat și s-au interpretat.

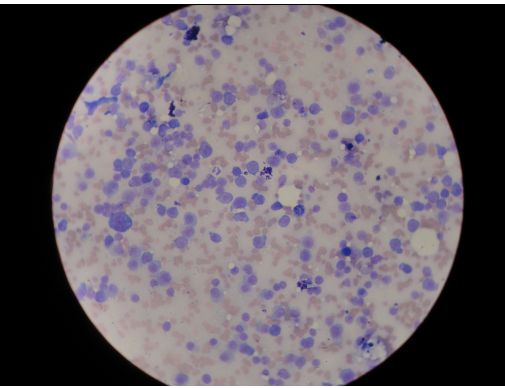
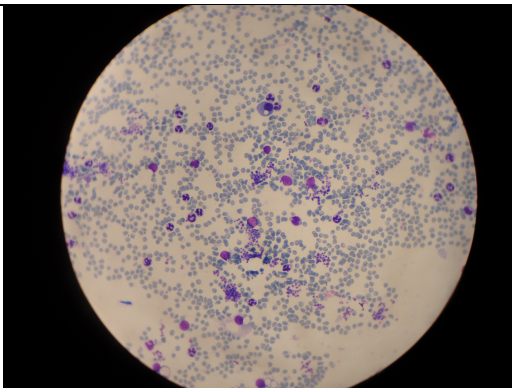
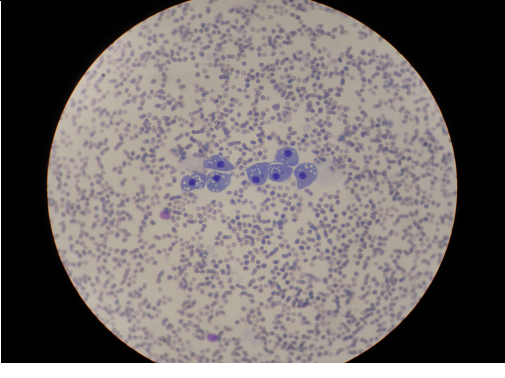
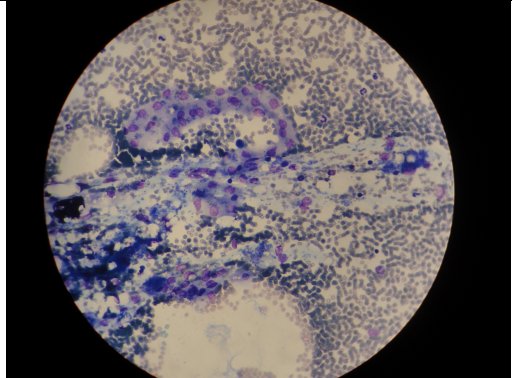
S-au efectuat examene histologice utilizând metoda includerii la parafină și colorații de rutină în diagnosticul histopatologic dar și colorații speciale pentru a evidenția leziunile urmărite.

Examenele electronmicroscopice au confirmat supozițiile cu privire la depunerea depozitelor imune în unele structuri renale. S-a confirmat prezența acestor depozite și imunohistochimic, utilizându-se Atc anti-IgG. Pe cazurile studiate probele au fost pozitive, confirmându-se astfel componenta imună implicată în generarea insuficienței renale.

S-au coroborat rezultatele examenelor citologice, electronmicroscopice, histopatologice și imunohistochimice. S-a realizat identificarea cauzelor sau a agenților patologici declanșatori ai leziunilor renale. S-a realizat o bază de date cu rezultatele obținute pe parcursul acestei etape.

Examenele citologice ale rinichilor pe câinii în viață s-au efectuat prin puncția ecoghidată cu ac fin. Câinii au fost în prealabil aneșteziati, regiunea lombară a fost tunsă și aseptizată în vederea puncției. Puncția s-a realizat prin aspirarea cu o seringă de 5 ml cu ac G22. Preparatele au fost colorate May-Grunwald-Giemsa și examinate la microscopul optic.



	
<p>Fig.3 Limfom renal. Fond hemoragic discret, populație de celule rotunde polimorfe, cu citoplasma slab bazofilă și vacuolizată cu nucleu rotund. Pleiomorfism celular (anizocitoză, anizocarioză). Celule bi- sau multinucleate. Mitoze atipice frecvente. Rare granulocite, neutrofile, eosinofile și mastocite. Col. MGG, x1000;</p>	<p>Fig.4 Rinichi de câine. Steatoză renală. Rare nefrocite normale și discret vacuolizate. Col. MGG, x1000;</p>
	
<p>Fig.5 Rinichi de câine. Steatoză renală. Celule epiteliale izolate sau grupate cu vacuole lipidice în citoplasmă. Col. MGG, x1000;</p>	<p>Fig.6 Mastocitom renal. Celule rotunde cu nucleu rotund sau oval și nucleol bine evidențiat. Granulații citoplasmatică de culoare violetă, rotunde, de mică dimensiune. Col. MGG, x1000;</p>

În vederea evidențierii imunoglobulinelor implicate în evoluția glomerulonefritelor, s-au selectat 30 de cazuri (câini) cu boli acute și cronice, dar care în mare parte nu prezentau semne clinice de insuficiență renală. Fragmentele tisulare au fost fixate în formaldehidă sol. 10% și apoi secționare la 5μm.

Tehnica imunohistochimică

După etalare, probele au fost supuse deparafinării (în 3 băi de xilen X 20 min) și apoi hidratate (în 3 băi de alcool absolut, 90⁰, 80⁰ X10 min).

Secțiunile s-au spălat energic în PBS (soluție tampon fosfat salină, pH – 7,2), apoi s-au blocat peroxidazele endogene prin incubare cu un amestec de apă de robinet și apă oxigenată (H₂O₂) 3%, v/v, timp de 5 min.

Secțiunile au fost ulterior incubate la 22⁰C timp de 10 min cu ser blocant prediluat de cal (NHS). După îndepărtarea excesului de ser blocant, fără a fi spălate, secțiunile au fost incubate timp de 30 min. cu primul anticorp anti IgG de șoarece (Mouse Monoclonal Antibodies Immunoglobulin G Leica) diluat 1/300 plus 5% ser blocant. Secțiunile au fost din nou spălate energic timp de 5 min. în PBS.

S-a adăugat apoi pe secțiuni cel de-al doilea anticorp anti-specie (Novocastra Prediluted Biotynilated Universal Secondary), timp de 10 min., la 22⁰C.

Din nou secțiunile au fost spălate timp de 5 min în PBS. Apoi secțiunile s-au incubat cu complexul enzimatic streptavidina/peroxidază timp de 10 min. Din nou secțiunile s-au spălat în PBS timp de 5 min. Ultima etapă prevede incubarea cu substratul cromogen (DAB - 3,3'-diamino benzidina Novocastra Leica) timp de 5 min. Apoi secțiunile s-au spălat cu apă de robinet.

Secțiunile au fost apoi deshidratate succesiv, prin băi de alcool 80⁰, 90⁰, absolut câte 10 min. și, în final clarificate cu xilen și montate. Colorația de fond s-a realizat cu hematoxilină Mayer (Merck) timp de 5 min.

Marcajul IgG pe structurile glomerulare a fost de culoare brună.

Examenul electronomicroscopic

Investigațiile electronomicroscopice au fost efectuate cu ajutorul microscopului electronic cu transmisie TESLA BS 500. Prelucrarea probelor s-a desfășurat astfel:

1. Recoltarea: s-au recoltat fragmente tisulare cu volumul de 1 mm³ din rinichi (corticală și medulară) pe o picătură de glutaraldehidă 2% în tampon fosfat.
2. Prefixarea s-a realizat în glutaraldehidă 2% în tampon fosfat, 2 ore la 4⁰C.
3. Spălarea probelor s-a realizat cu tampon fosfat, 2 ore la 4⁰C.
4. Fixarea probelor s-a realizat cu tetraoxid de osmiu sol. 1% în tampon fosfat.
5. Spălarea probei s-a efectuat cu tampon fosfat, 2 ore la 4⁰C (s-a schimbat fosfatul de 2-3 ori).
6. Deshidratarea s-a efectuat în alcool 30%, 20 minute la 4⁰C;
→ colorarea în masă cu sol. acetat de uraniu în alcool 30%, 45 minute la 4⁰C
 - alcool 30%, 10 minute la 4⁰C
 - alcool 50%, 20 minute la 4⁰C;
 - alcool 70%, 20 minute la temp. camerei;→ colorarea în masă cu sol. acid fosfotungstic în alcool 70%, 45 minute
 - alcool 70%, 10 minute la temp. camerei;
 - alcool 90%, 20 minute la temp. camerei;
7. Infiltrarea s-a realizat prin trecerea probelor prin 3 băi succesive cu alcool absolut, 20 minute / baie și 3 băi succesive cu acetonă, 20 minute/baie.
8. Impregnarea – s-a realizat cu EPON (rășină epoxidică) 25% + acetona 50%
9. Pentru includere s-au utilizat capsule speciale de includere, includerea făcându-se în EPON.
10. Polimerizarea – capsulele cu proba inclusă în epon s-a ținut în etuva la 60⁰C timp de 3 zile.

11. Fasonarea

12. Secționarea: pe ultramicrotom, secțiunile au avut grosimea de 60-90 nm

13. Depunerea pe grile acoperite cu peliculă de formvar.

14. Colorarea

- sol. acetat de uranil: 10 minute,

- sol. Reynolds: 3-5 minute.

Astfel pregătite, grilele cu probe sunt introduse în microscopul electronic în vederea examinării.

Rinichiul este de nenumărate ori victima agresiunilor cu origine extra-renală. Structura și funcția acestuia îl fac vulnerabil și părtaș la transformările cu caracter patologic desfășurate în organismul viu.

Presiunea sanguină crescută din capilarele glomerulare, rolul de ultrafiltru și glicoproteinele cu sarcină negativă puternică din structura barierei glomerulare de filtrare pledează în favoarea susceptibilității la acțiunea potențial nocivă a substanțelor circulante endogene sau exogene.

În funcție de mecanismul de producere, glomerulonefritele imune se pot încadra în două categorii:

1. glomerulonefritele produse de complexe imune depozitate în glomerul;
2. glomerulonefritele produse de anticorpii anti-membrană bazală.

Din punct de vedere histologic, la cazurile examinate, s-au evidențiat toate tipurile histologice de glomerulonefrite (gl. membranoase, gl. membranoproliferative, gl. mesangioproliferative).

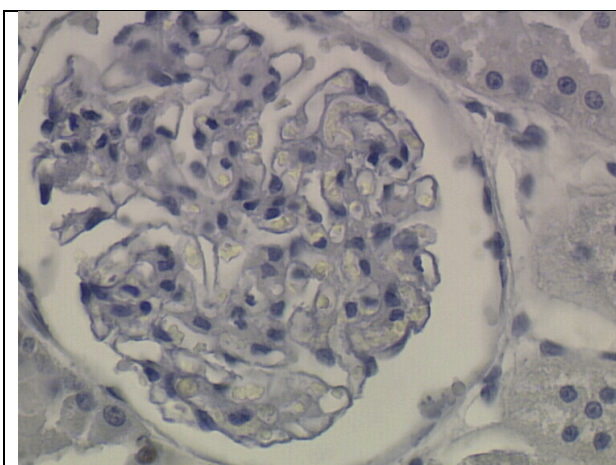


Fig.7 Rinichi de câine. Glomerulită membranoasă. Col. Hematoxină Mayer, x900;

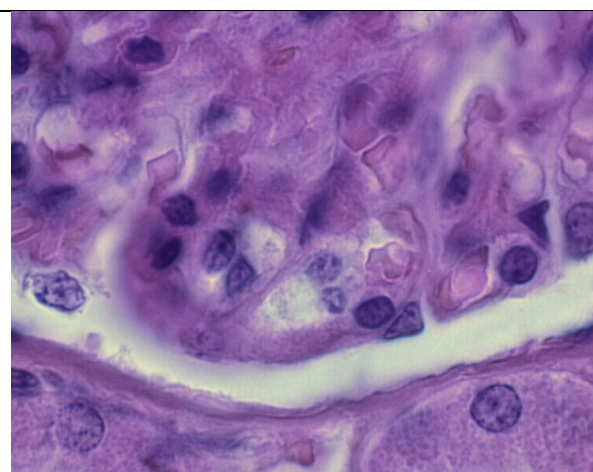


Fig.8 Rinichi de câine. Glomerulită membranoasă. Capilare glomerulare îngroșate. Col. PAS, x1600;

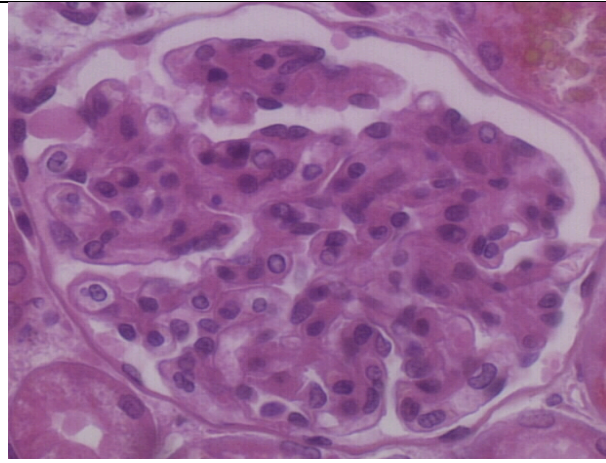


Fig.9 Rinichi de câine. Glomerulită mezangioproliferativă. Col. HE, x900;

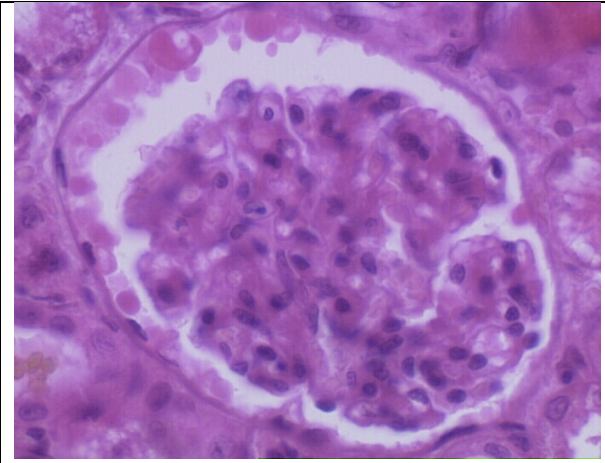


Fig.10 Rinichi de câine. Glomerulonefrită membrano-proliferativă. Col. PAS, x900;

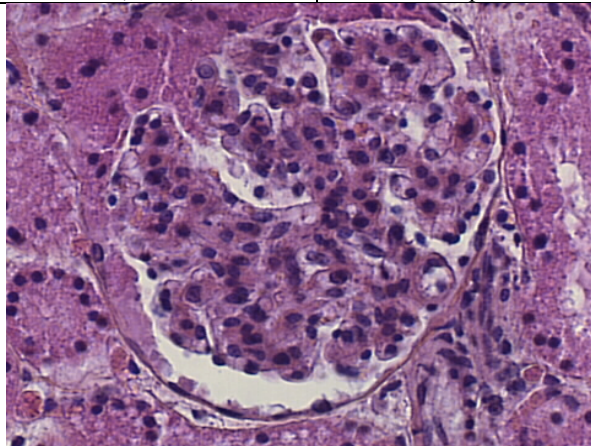


Fig.11 Rinichi de câine. Glomerulonefrită membrano-proliferativă. Col. HE, x900;

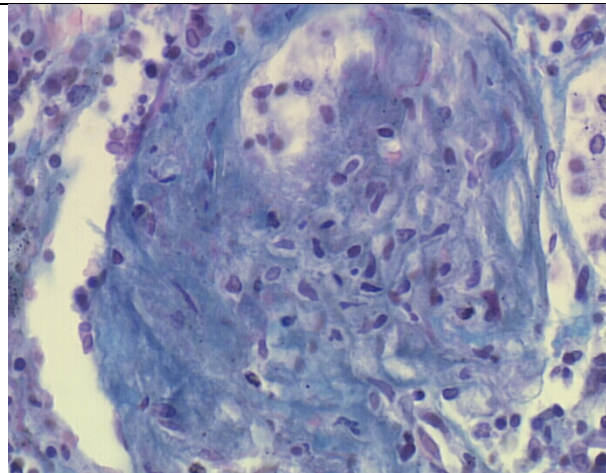


Fig.12 Rinichi de câine. Glomerulonefrită sclerozantă. Col. HEA, x900;

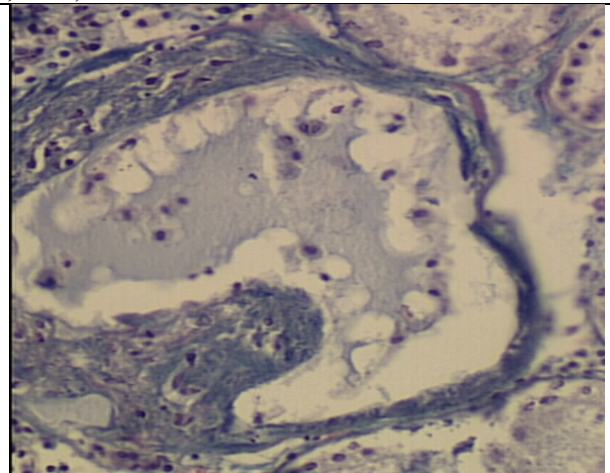
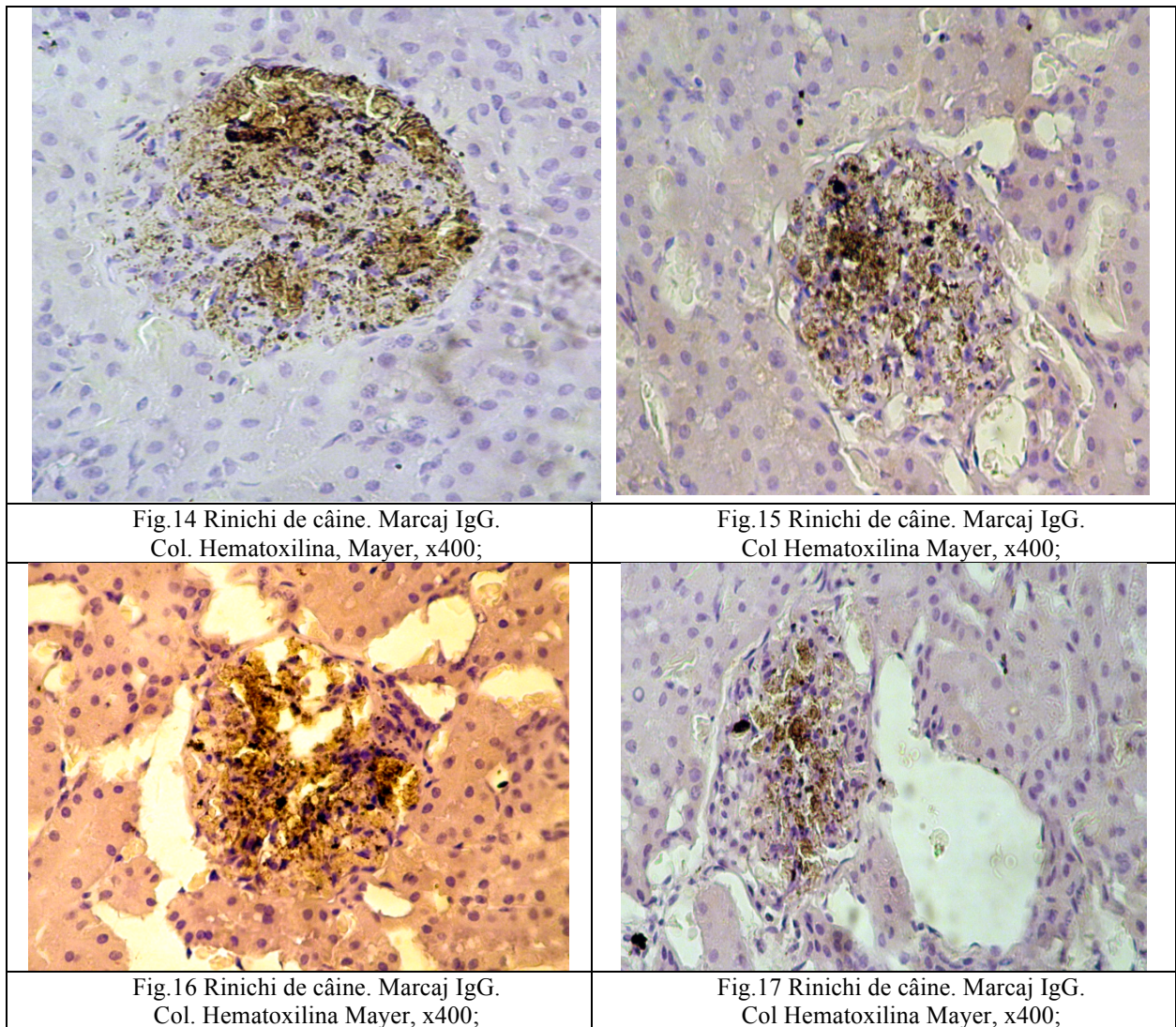


Fig.13 Rinichi de câine. Glomerulonefrită sclerozantă. Col. HEA, x900;

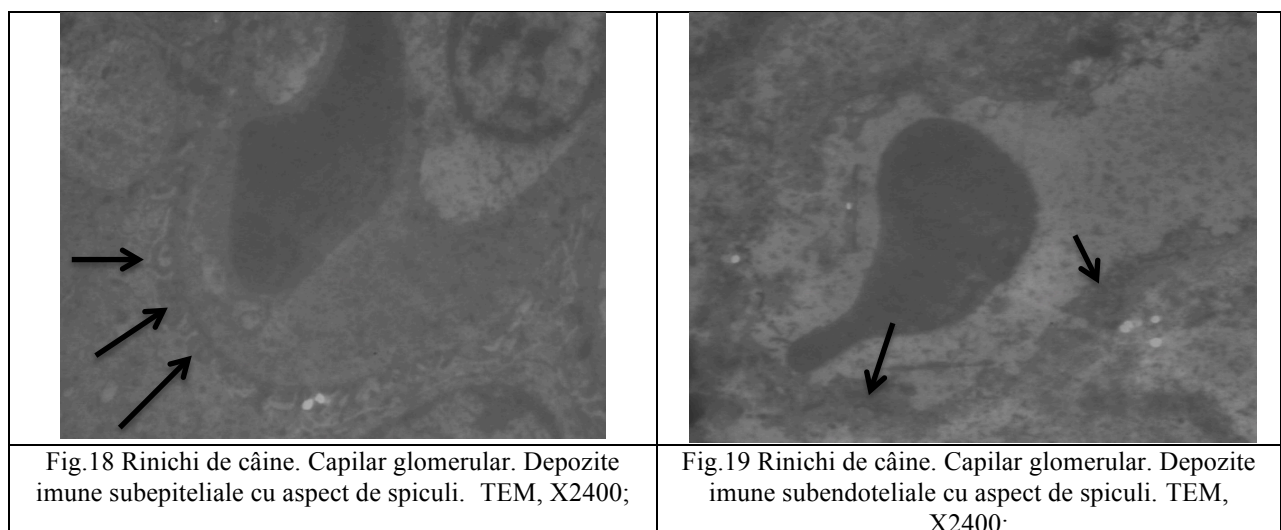
La examinarea histologică s-a observat marcajul imunoglobulinei G în structurile glomerulare sub aspect granular și liniar. Acestea au fost localizate mai ales la nivelul mezangiului glomerular.

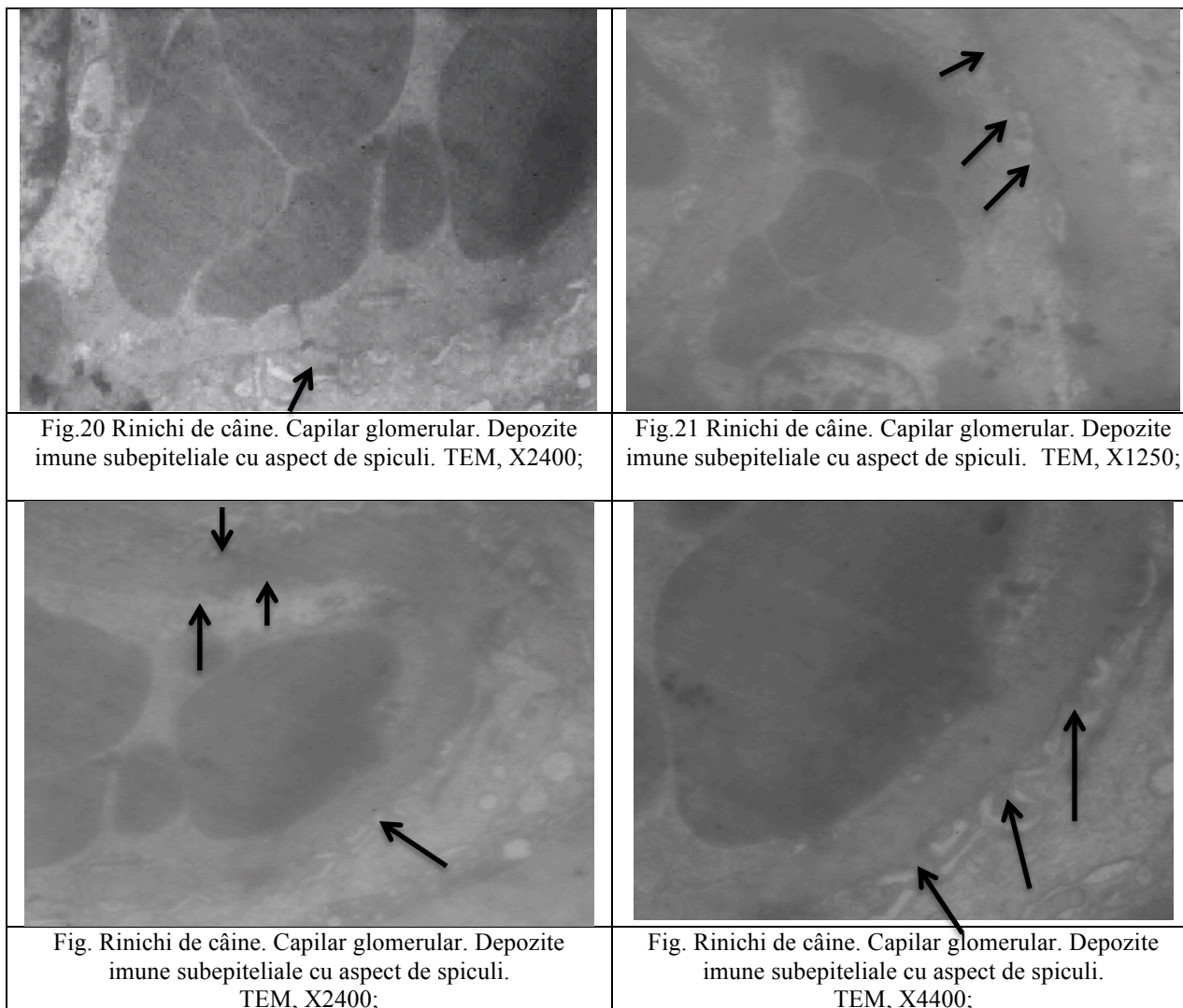
Cazurile la care s-a realizat evidențierea Ig G în rinichi, sunt câini ce au dezvoltat toate cele trei tipuri de glomerulonefrite imune (gl. membranoase, gl. membranoproliferative, gl.

mesangioproliferative), identificate prin examene histologice uzuale (includere la parafină și col. HEA).



Examenul electronomicrosopic a evidențiat îngroșarea membranele bazale ale capilarele glomerulare (glomeruloscleroză) și prezența depozitelor electrono-dense cu aspect de spiculi pe fața internă (subendotelial) și externă (subepitelial) a acestora.





În apariția glomerulonefritelor imune, complexe circulante imune Atg-Atc reprezintă factorul primar.

Aceste complexe pot conține bacterii, virusuri, antigene parazitare sau antigene tumorale.

Patogenitatea și modul de depunere al complexelor imune pe structurile glomerulare depinde de aspectele cantitative și calitative ale acestora:

- cantitatea de complexe Atg-Atc;
- mărimea complexelor;
- configurația moleculară;
- afinitatea anticorpului față de antigen;
- sarcina electrică;
- solubilitatea.

Complexele mari, insolubile și formate în exces sunt rapid îndepărtate din sânge la nivelul rinichiului și fagocitate de către sistemul monocitar-macrofagic (SMM) sau preluate parțial de mezangiul glomerular.

Pe de altă parte, complexe imune de dimensiune intermediară formate în prezența unor antigene în exces rămân în soluție și se pot depozita pe membrana bazală a capsulei glomerulare, a ghemului vascular sau la nivelul mezangiului.

Prin intermediul microscopiei electronice complexe imune depuse se evidențiază sub forma unor depozite neregulate, electrono-dense dispuse în poziție subendotelială (*GN. subendoteliale*) sau subepitelială (*GN. subepiteliale*), în grosimea membranei bazale (*GN. intramembranoase*) sau în mezangiu (*GN. mezangiale*).

Depunerea în poziție subendotelială este comună complexelor imune circulante cu sarcină anionică ridicată, ce nu le permite trecerea prin membrana bazală glomerulară și cu afinitate puternică a anticorpului față de antigen, ce le face greu de disociat.

În contrast, poziția subepitelială este proprie complexelor cu sarcină cationică și cu afinitate scăzută a anticorpului față de antigen, ceea ce permite disocierea complexului imun și migrarea independentă a antigenului și anticorpului prin membrana bazală glomerulară, reformând complexul pe fața subepitelială a acesteia.

Depunerea intramembranară a complexelor imune este mai puțin comună, în unele cazuri ea reprezentând un stadiu intermediar în migrația prin grosimea membranei bazale glomerulare.

Evoluția glomerulonefritelor observate a fost favorizată de depunerea în structurile glomerulare a imunoglobulinei G, imunohistochemia punând la dispoziția cercetătorului posibilitatea de a evidenția depozite regulate, omogene sau granulare dispuse subendotelial de-a lungul membranei bazale glomerulare.

Aceste fenomene proliferative au drept consecințe scleroza glomerulară segmentară și chiar generală, colabarea capilarelor glomerulare și adeziuni între ghemul vascular și capsula Bowman.

Bilanțul cantitativ și calitativ al acestor leziuni este indispensabil în prognosticul histologic.