LISIENNY CAMPOLI TONO REMPEL

**PAPEL DA HIPÓXIA NA ATIVAÇÃO DA IMUNIDADE INATA E NA
PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA ASSOCIADA AO MODELO
DE ABLAÇÃO RENAL DE 5/6**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutora em Ciências

Programa de Pós Graduação em Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Zatz

SÃO PAULO

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rempel, Lisienny Campoli Tono

Papel da hipóxia na ativação da imunidade inata na progressão da doença renal crônica associada ao modelo de ablação renal de 5/6 / Lisienny Campoli Tono Rempel.

-- São Paulo, 2018.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientador: Roberto Zatz.

Descritores: 1.Hipóxia 2.Insuficiência renal crônica 3.Ablação renal de 5/6
4.Imunidade inata 5.NF-κB 6.Estresse oxidativo

USP/FM/DBD-313/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

DEDICATÓRIA

A Deus, meu Senhor, o regente da minha vida.

Aos meus pais, Samuel e Cineiva.

Aos meus amores, Thiago e Lanna.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Senhor. Agradeço Àquele que me sustentou firmemente nesses 5 anos de Doutorado. Sou grata, pois somente pela graça e misericórdia Dele estou viva e cheguei até aqui. Busquei refúgio n'Ele e em momento algum fui desamparada. Ele é a fonte da minha paz, da minha alegria, da minha força, da minha fé. Sem Ele nada posso fazer. Obrigada, meu Deus!

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Roberto Zatz, minha gratidão eterna. Estas poucas palavras não são capazes de expressar meu enorme respeito e admiração pela pessoa maravilhosa que você é. Obrigada por me ensinar que, acima de tudo, é possível exercer a pesquisa científica com humildade e respeito. Sua inteligência, brilhantismo e amor à ciência me encantam. Obrigada pelo seu bom humor, tão presente no meu dia-a-dia! Obrigada por ter sido tão compreensivo comigo nesses 5 anos juntos. Saiba que guardo com muito carinho tudo o que você fez por mim. Você abriu caminhos para meu tratamento e esteve ao meu lado em dias muito difíceis da minha vida. Saiba que eu jamais esquecerei aquele “abraço de pai” que você me deu quando mais precisei. Como agradecer tamanho carinho e atenção? Só posso dizer: obrigada, obrigada, obrigada!

À querida Dra. Clarice Fujihara (Cla), que muito me ensinou com suas palavras, conselhos e os tão necessários puxões de orelha. Admiro sua competência e seriedade na pesquisa... qualidades em que você é exemplo! Obrigada por toda sua compreensão comigo nesses 5 anos. Obrigada por ter

sido a linha de frente de meu trabalho em diversos momentos. Serei eternamente grata por tudo que fez por mim e pelos momentos em que me fez companhia. Obrigada por ter estruturado e reorganizado meu trabalho quando isso se fez necessário. Se não fosse você, esse trabalho não teria saído. Sua ajuda e colaboração nesse projeto são inestimáveis! Obrigada por me moldar, forjar e lapidar nesses anos em que estivemos juntas... aprendi muito com você! Obrigada, obrigada, obrigada!

Ao querido Prof. Dr. Niels Câmara pela parceria nesse estudo, e pelas valiosas sugestões e colaborações no decorrer do projeto. Sua inteligência, simplicidade e bom humor são qualidades admiráveis!

À Dra. Denise Malheiros pela grande contribuição na análise das lâminas histológicas e discussão dos resultados.

À Thalita e à Gizely, minhas queridas amigas. Vocês foram meu braço direito nesses anos. Obrigada pelo apoio incondicional nos afazeres do dia-a-dia do projeto e estarem sempre prontas a ajudar. Agradeço todo o carinho, companheirismo e ombro amigo de vocês. Obrigada pelas risadas e descontração!

À Simone, por todo o companheirismo desses 5 anos. Obrigada pelos infinitos conselhos, e por tantas vezes se colocar à disposição para me ouvir. Agradeço suas incontáveis colaborações neste trabalho.

À Camilla, por toda a participação na escrita, planejamento, desenvolvimento e execução de experimentos deste projeto. Obrigada pela prontidão em ajudar!

À Viviane, Victor e Neto, por toda trajetória juntos nesses anos. Obrigada por abrirem mão do tempo de vocês para me socorrer e ajudar a desenvolver os experimentos indispensáveis à conclusão deste trabalho. Agradeço imensamente o que fizeram! E Victor, um agradecimento especial pelo cuidadoso preparo das muitas lâminas de cortes histológicos.

Às queridas Karin, Fernanda e Amanda, por toda a ajuda do dia-a-dia. Pela força nas inúmeras perfusões e experimentos. Obrigada por cada conversa, cada risada. Guardo com muito carinho o tempo que tive com cada uma de vocês no laboratório.

À Cláudia, pelo apoio técnico, ajuda e cuidado na realização de muitas dosagens deste estudo.

À Janice, pela excelente manutenção do biotério e pela descontração.

À Vivian, pela manutenção do biotério e manejo dos animais utilizados neste estudo.

Ao Wagner, pelo apoio e ajuda com os mais diversos assuntos do trabalho.

À Denise Duarte e à Solange, por me ajudarem tantas vezes a resolver questões referentes aos cilindros de nitrogênio e a burocracias do projeto.

Ao Pedro e à Eliana, por toda a assistência em assuntos relativos à minha matrícula na Pós Graduação.

Aos meus pais, Samuel e Cineiva. Se cheguei até aqui, foi porque sempre tive o apoio de vocês. Vocês são a minha inspiração, meu exemplo e meu orgulho. Obrigada por sempre investir em minha educação e me incentivar

a crescer cada vez mais. Obrigada por tantas vezes me socorrerem das mais diversas formas. Obrigada pelas inúmeras orações e longas horas de aconselhamento. Essa conquista também é de vocês! Amo vocês!

Ao meu grande amor, Thiago. Você viveu cada emoção do Doutorado junto comigo, e sempre me apoiou em tudo que precisei. Obrigada por todo incentivo, paciência e cuidado nesse tempo. Sem suas orações teria sido muito mais difícil. Obrigada por sempre me ouvir e aconselhar. Amo você!

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Doença renal crônica</i>	1
1.2 <i>Imunidade inata e DRC</i>	2
1.3 <i>Hipóxia renal</i>	6
2 OBJETIVOS	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 <i>Procedimentos gerais</i>	12
3.2 <i>Indução de hipóxia</i>	12
3.3 <i>Modelo experimental</i>	13
3.4 <i>Grupos experimentais e protocolo</i>	13
3.5 <i>Acompanhamento dos ratos</i>	14
3.6 <i>Etapas final do estudo</i>	15
3.7 <i>Análises histológicas</i>	16
3.8 <i>Análises de histomorfometria renal</i>	17
3.9 <i>Análises por imunohistoquímica</i>	19
3.10 <i>Análises por PCR</i>	25
3.11 <i>Análise estatística</i>	30
4 RESULTADOS	31
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

A hipóxia tecidual tem sido apontada como importante fator na patogênese da Doença Renal Crônica (DRC). No entanto, faltam evidências diretas de que a exposição prolongada à hipóxia tecidual inicie ou agrave a DRC. Nós testamos essa hipótese expondo cronicamente ratos normais e ratos com nefrectomia de 5/6 (Nx) à hipóxia. Além disso, investigamos se tal efeito da hipóxia envolveria a ativação da imunidade inata. Ratos Munich-Wistar machos adultos foram submetidos a Nx (n = 54) ou cirurgia simulada (Sham, n = 52). Vinte e seis ratos sham (S+nor) e 26 Nx (Nx+nor) permaneceram em normóxia, enquanto 26 ratos sham (S+hip) e 28 Nx (Nx+hip) foram mantidos em uma câmara de hipóxia normobárica (12% O₂) por 8 semanas. Confirmamos a existência de hipóxia tecidual por imuno-histoquímica para Pimonidazol (Hypoxyprobe™). A hipóxia foi confinada à área medular em S+nor e expandiu-se à área cortical em S+hip. A hipóxia não promoveu lesão renal nem elevação do conteúdo de IL-1 β ou TLR-4 em Sham. Em Nx, a hipóxia se estendeu para a área cortical, um processo que foi intensificado em Nx+hip, mas, inesperadamente, atenuou a hipertensão, a ativação da imunidade inata, a inflamação, a lesão renal e o estresse oxidativo. Em desacordo com os conceitos atuais, o presente estudo traz evidência de que a hipóxia pode exercer um efeito renoprotetor no modelo Nx, ao invés de atuar como um fator de lesão renal. Os mecanismos desse inesperado efeito benéfico não são claros, e podem envolver inibição da via do NF- κ B, melhora do estresse oxidativo e limitação da produção de angiotensina II pelo tecido renal.

Descritores: Hipóxia, doença renal crônica, ablação renal de 5/6, imunidade inata, NF- κ B.

ABSTRACT

Hypoxia is thought to influence the pathogenesis of chronic kidney disease (CKD), but direct evidence that prolonged exposure to tissue hypoxia initiates or aggravates CKD is lacking. We tested this hypothesis by chronically exposing normal rats and rats with 5/6 nephrectomy (Nx) to hypoxia. In addition, we investigated whether such effect of hypoxia would involve activation of innate immunity. Adult male Munich-Wistar rats underwent Nx (n=54) or sham surgery (sham, n=52). Twenty six sham (S+nor) and 26 Nx (Nx+nor) rats remained in normoxia, while 26 sham rats (S+hyp) and 28 Nx rats (Nx+hyp) were kept in a normobaric hypoxia chamber (12% O₂) for 8 weeks. Hypoxia was confirmed by immunohistochemistry for Pimonidazole (Hypoxyprobe®). Hypoxia was confined to the medullar area in S+nor and spread to the cortical area in S+hyp. Exposure to hypoxia promoted no renal injury or elevation of the content of IL-1 β or TLR-4 in Sham. In Nx, hypoxia extended to the cortical area, a process that was intensified in Nx+hyp but, unexpectedly, attenuated hypertension, inflammation, innate immunity activation, renal injury and oxidative stress. The present study, in disagreement with current concepts, shows evidence that hypoxia exerts a renoprotective effect in the Nx model, instead of acting as a factor of renal injury. The mechanisms for this unexpected beneficial effect are unclear, and may involve NF- κ B inhibition, amelioration of oxidative stress and limitation of angiotensine II production by the renal tissue.

Keywords: Hypoxia; chronic kidney disease, 5/6 ablation, innate immunity, NF- κ B pathway

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença renal crônica

A doença renal crônica (DRC) acomete de 10 a 16% da população adulta mundial, prevalência que tende a aumentar (1). Uma série de fatores de risco ao desenvolvimento da DRC tem sido descrita na literatura, tais como doenças pré-existentes, histórico familiar, além de variáveis demográficas e de comportamento. Uma vez desenvolvida a doença, a perda progressiva da filtração glomerular, principal marcador da DRC, é associada a um conjunto extenso e complexo de alterações fisiológicas, as quais resultam em um grande número de complicações e morbidades. Entre as patologias que podem conduzir à DRC, conhecidas como doenças de base, destacam-se, por exemplo, a hipertensão arterial e o diabetes mellitus (1, 2). Fatores hemodinâmicos e inflamatórios são capazes de promover hipertrofia glomerular, expansão de matriz mesangial e lesão de podócitos, culminando com o desenvolvimento de esclerose glomerular (EG). Além das lesões glomerulares, a fibrose intersticial e a atrofia tubular também participam do processo que leva à perda progressiva da função renal (3).

Sabe-se que a DRC é caracterizada por uma perda progressiva da função renal, atrofia de túbulos, inflamação (recrutamento de leucócitos), rarefação microvascular e deposição de matriz extracelular (ECM) no espaço intersticial entre néfrons (2). Independentemente do processo que iniciou a lesão renal, a fibrose tubulointersticial corresponde à via final da ação combinada de uma série desses fatores patogênicos (4). Sendo assim, a

deposição de matriz, com acúmulo de fibroblastos, colágeno (tipos I e III) e fibronectina nos espaços intersticiais (4, 5), é característica da fibrose renal (6). Nesse contexto, fibroblastos e, possivelmente, células tubulares sofrem alterações fenotípicas, diferenciando-se em miofibroblastos, capazes de expressar α -actina e promover retração tecidual (7, 8). A produção de proteínas da matriz extracelular também é resultado da ação de macrófagos, que exercem papel importante na liberação de citocinas e fatores de crescimento, e no recrutamento de células inflamatórias ao tecido renal. Uma série de vias intracelulares está envolvida no processo de fibrogênese associado à DRC, contribuindo para seu caráter progressivo.

1.2 Imunidade inata e DRC

Como já mencionado, a perda de função renal desencadeia uma série de eventos inflamatórios, tais como a produção excessiva de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, a infiltração do tecido renal por macrófagos, linfócitos, fibroblastos e miofibroblastos e, finalmente, a deposição de componentes da matriz extracelular, resultando em fibrose do parênquima renal (9-12). No entanto, não se sabe por que esses processos inflamatórios são ativados mesmo na ausência de antígenos microbianos ou outras proteínas estranhas ao organismo, já que eles são vinculados à atividade do sistema imune e à resposta a invasões microbianas (9, 13).

Embora os mecanismos que de um lado levam ao dano glomerular e de outro à fibrose intersticial sejam distintos, pela própria natureza de suas estruturas e das células que as constituem, há diversos pontos de contato entre

os dois processos. Lesões glomerulares podem estender-se ao interstício através de soluções de continuidade no tufo capilar, com passagem de material proteico ao interstício vizinho e consequente inflamação e fibrose (14). De outro lado, processos inflamatórios crônicos nascidos no interstício renal tendem a progredir e terminam por levar a um quadro de fibrose intersticial, que, em estágios avançados, podem envolver os glomérulos, diretamente ou através da oclusão de túbulos (15, 16). Mais uma vez, os mecanismos que conduzem do insulto inicial à inflamação, glomerular ou intersticial, são largamente desconhecidos.

Os *toll-like receptors* (TLRs), descobertos em meados dos anos 80, têm sido amplamente abordados nos estudos acerca da resposta inflamatória por meio da imunidade inata (17). Eles constituem uma família de receptores celulares, superficiais ou intracitoplasmáticos, localizados em células inflamatórias, como linfócitos e macrófagos, e de revestimento, como células epiteliais e endoteliais, entre outras (18, 19). São capazes de detectar moléculas ou fragmentos moleculares comuns a um grande número de patógenos (*pathogen associated molecular pattern*, ou PAMP), como por exemplo, toxinas e fragmentos de DNA; ou elementos resultantes da destruição/estresse de células do próprio organismo (*damage associated molecular pattern*, ou DAMP), como a *high mobility group box protein-1* (HMGB1, uma proteína nuclear), fragmentos de ácidos nucléicos e ATP. Os TLRs são ligados a proteínas de membrana ou intracelulares, como o MyD88, promovendo, quando ocupados, a estimulação do sistema NF κ B e, consequentemente, a produção de uma série de mediadores que amplificam a intensidade da resposta inflamatória, atraindo ao local células sanguíneas que,

por sua vez, sintetizam novos mediadores, em um típico processo de realimentação positiva. Assim, os TLRs, e a sequência inflamatória que comandam, são parte importante do arsenal de que dispõem organismos pluricelulares para proteger seus tecidos contra invasões por microorganismos e para limitar os danos causados pela destruição de suas próprias células (18, 19).

Recentemente descobriu-se a existência de outros receptores citosólicos que também atuam no reconhecimento dos DAMPs e que, quando ativados, sofrem um processo de oligomerização, formando complexos moleculares conhecidos como inflamassomas. Esses agregados moleculares ativam enzimas como a caspase-1 que, por sua vez, catalisam a síntese de potentes mediadores, como as interleucinas 1 β e 18, que desencadeiam uma sequência de eventos inflamatórios destinados em princípio a conter uma possível invasão microbiana e a remover o mais rápido possível os detritos resultantes da destruição de células. Dentre os receptores intracelulares mais estudados atualmente, destacam-se os NLR (***N**ucleotide-binding **O**ligomerization **D**omain (**NOD**)-like receptors*), que formam inflamassomas conhecidos por siglas com que se procura descrever sua complexa composição, tais como NLRP (***N**ucleotide-binding oligomerization domain, **L**eucine-rich **R**epeat and **P**yrin domain containing*), e NLRC (***NOD**-Like **R**eceptors, **C**ard domain containing*) (19, 20).

Os TLRs e NLRs não agem de maneira independente, existindo vários pontos em comum entre as sequências de eventos desencadeadas por cada um deles. Consequentemente, a atuação em conjunto desses dois receptores denota a capacidade de reação imediata a ameaças externas mediante o

recrutamento e ativação de grandes contingentes de células circulantes, antes mesmo da ativação da resposta imune adaptativa. Na Figura 1 estão esquematizados os principais mecanismos a promover lesão renal na DRC.

FONTE: Ilustração gentilmente cedida pelo Prof. Roberto Zatz.

Figura 1. Representação esquemática, parcial e simplificada das vias intracelulares de ativação da imunidade inata em resposta à exposição da célula a DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), cristais e uma série de outros estímulos.

Além de permitir um avanço na compreensão dos mecanismos não imunológicos na DRC, o conceito de que a estimulação da imunidade inata pode provocar e manter um processo inflamatório crônico facilita a compreensão de outro enigma associado à DRC: seu caráter inexoravelmente progressivo (21, 22). Uma possível explicação para esse comportamento é a de que o estiramento das paredes glomerulares, provocado pela hipertensão intracapilar e/ou pela hipertrofia do tufo, tende a aumentar devido à contínua perda de néfrons imposta pela doença, levando ao estabelecimento de um ciclo vicioso devido à crescente sobrecarga sobre os néfrons remanescentes.

1.3 Hipóxia renal

A partir da década de 90, os mecanismos de oxigenação renal começaram a ser estudados com maior atenção, surgindo evidências de uma relação direta entre hipóxia renal e progressão da DRC. De acordo com conceitos amplamente difundidos (23), o parênquima renal, especificamente aquele situado nas regiões mais profundas da medula renal, encontra-se constantemente à beira da hipóxia, exibindo mesmo em condições fisiológicas pressões parciais de oxigênio substancialmente inferiores às aquelas registradas na região cortical (Figura 2).

FONTE: Ilustração gentilmente cedida pelo Prof. Roberto Zatz (adaptada).

Figura 2. Representação esquemática do néfron, regiões do parênquima renal e respectivas pressões parciais de oxigênio (pO_2 , mmHg).

O sofrimento celular pela hipóxia ocorre predominantemente na região medular externa devido ao descompasso entre oferta e demanda de O_2 . Existem dois motivos para que a relação entre a oferta e a demanda de oxigênio nessa região seja tão precária. O primeiro é que a região medular externa abriga dois segmentos do néfron onde o transporte ativo de NaCl é

muito intenso (a *pars recta* do túbulo proximal e a porção espessa da alça de Henle). Outro motivo é a baixa pressão parcial de oxigênio na região medular por conta do efeito de contracorrente passiva, devido à própria arquitetura dos vasos retos que acompanham as alças de Henle dos néfrons longos, dispostos em “U” (Figura 3). Esse arranjo faz com que a tensão de oxigênio se reduza gradativamente em direção à papila. O oxigênio contido no ramo descendente do vaso tende a difundir precocemente em direção ao ramo ascendente, cuja tensão de oxigênio é mais baixa em razão do consumo ocorrido nas regiões mais profundas do rim (24).

FONTE: Ilustração gentilmente cedida pelo Prof. Roberto Zatz (adaptada).
Figura 3. Representação esquemática do efeito da contracorrente passiva nos vasos retos presentes no parênquima renal.

Dessa forma, seria de se esperar que as porções finas das alças de Henle mais longas e os dutos papilares fossem os segmentos do néfron mais duramente afetados por essa fuga de oxigênio. No entanto, as baixas tensões de oxigênio na região medular interna não chegam a representar um problema, já que sua atividade metabólica é de baixa intensidade. As células que

constituem as porções finas da alça de Henle não efetuam transporte ativo de solutos além do necessário para sua sobrevivência; e as células do sistema coletor, embora capazes de transportar sódio contra gradientes extremamente desfavoráveis, trabalham com quantidades habitualmente baixas de solutos. Já na região medular externa a relação oferta/demanda de oxigênio torna-se crítica. Assim, os segmentos medulares mais vulneráveis a situações que limitem o seu já precário suprimento de oxigênio são a porção ascendente espessa da alça de Henle, que é responsável pela reabsorção de 25% do sódio, potássio e cálcio filtrados, e a *pars recta* do túbulo proximal, sendo os primeiros a desenvolver necrose tubular em condições de isquemia renal (23-25). Portanto, a região medular externa vive constantemente à beira da lesão por hipóxia.

Se durante um insulto isquêmico agudo a carência de oxigênio é capaz de promover lesão tubular grave, o papel da hipóxia como mecanismo patogênico na DRC é ainda motivo de controvérsias. A hipótese mais difundida é de que condições como glomerulopatias primárias e nefroesclerose hipertensiva desencadeiam eventos que podem agravar essa hipóxia “fisiológica”, como rarefação capilar, a distorção da arquitetura renal, o aumento da demanda metabólica e a inflamação/estresse oxidativo, o que favoreceria uma piora da fibrose renal (25). As evidências disponíveis indicam que a pO_2 está efetivamente reduzida em modelos experimentais de DRC. A razão para essa anomalia não é clara. Devido à presença de eventos inflamatórios no tecido renal, é possível que ocorra um “desperdício” de O_2 , canalizado para uma série de processos celulares que demandam energia, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (26, 27). No entanto,

não é possível discernir entre a possibilidade de que a hipóxia do tecido renal seja uma causa de lesão progressiva e a de que ela constitua meramente uma consequência da própria doença. Um achado aparentemente consistente com a primeira hipótese é o de que, no modelo de ablação renal de 5/6 (Nx), ocorre progressiva rarefação medular e cortical dos capilares peritubulares (28, 29). No entanto, ainda que seja efetivamente capaz de causar hipóxia tecidual, a escassez de vasos sanguíneos pode simplesmente resultar da fibrose renal, rarefação capilar e distorção da arquitetura renal provocadas pelo processo inflamatório característico da DRC e de seus modelos experimentais (28).

Ainda que se pudesse demonstrar que a hipóxia não é capaz de isoladamente iniciar a cascata de eventos que conduz à DRC, a possibilidade de que ela contribua de alguma forma para esse processo é digna de atenção. Se a hipóxia pode resultar da doença renal e ao mesmo tempo contribuir para agravá-la, supõe-se que ela estabeleça um ciclo de realimentação positiva, o que representaria um fator de perpetuação do processo.

Uma hipótese alternativa seria a de que a hipóxia é apenas um epifenômeno, não participando ativamente como um fator patogênico na DRC. Em um estudo realizado em nosso laboratório, através da administração de Sunitinibe (medicamento anti-angiogênico) a ratos Nx, demonstramos que apesar da rarefação capilar ter piorado, não houve agravamento na fibrose renal desses ratos, quando comparados aos ratos Sham (29). Outro estudo mostrou evidência de que populações com DRC em altas altitudes (>1.830 m) têm uma taxa de mortalidade por todas as causas mais baixa quando comparada àquelas que residem ao nível do mar (30). Infelizmente os dados referentes a essas populações são ainda muito escassos.

Por esses motivos, a demonstração de umnexo causal entre hipóxia, ativação da imunidade inata e progressão da DRC pode abrir caminho para a elaboração de novos alvos de intervenção terapêutica, utilizando elementos como os TLRs e inflamassomas. Tais achados poderiam ser úteis à elaboração de estratégias destinadas a conter os eventos inflamatórios que conduzem à DRC e evitar sua progressão.

2 OBJETIVOS

A hipótese sobre a qual se assenta esse trabalho é a de que a hipóxia inicia ou agrava a DRC através da ativação da imunidade inata. Assim, os objetivos são:

1. Determinar se a hipóxia do tecido renal é capaz de, por si só, iniciar uma sequência de eventos inflamatórios e levar à instalação da DRC;
2. Investigar se em presença de uma redução do número de néfrons, a hipóxia do tecido renal pode contribuir para agravar e acelerar a progressão da DRC;
3. Examinar a possível participação de componentes da imunidade inata no mecanismo de lesão tecidual renal promovida pela hipóxia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Procedimentos gerais*

Para a realização dos estudos propostos, foram utilizados ratos Munich-Wistar machos, obtidos de uma colônia estabelecida no biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LFR-FMUSP). Esses animais foram mantidos em temperatura ambiente de 23 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 5 % e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso a ração e água. Todos os procedimentos experimentais executados seguiram as normas da Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA-FMUSP nº 035/15), por sua vez baseadas em diretrizes internacionais bem estabelecidas quanto ao manuseio de animais de laboratório.

3.2 *Indução de hipóxia*

Para obter um ambiente com baixo O₂ foi utilizada uma câmara de hipóxia normobárica (Biospherix, Parish, NY). A hipóxia foi mantida pela injeção contínua de nitrogênio sob controle de um mecanismo eletrônico, de modo a manter o O₂ ambiente a 12%, simulando uma altitude de cerca de 5700 metros acima do nível do mar. Os estudos quanto à exposição do tecido renal à hipóxia prolongada são ainda escassos. Nossos resultados indicam que os animais podem manter-se saudáveis durante meses nessas condições (31).

3.3 Modelo experimental

Para a redução da massa renal, os animais foram anestesiados com uma solução de Ketamina (Cristália®, 50 mg/kg) e Xilazina (Agener União®, 10 mg/kg), intramuscular, e então foi realizada uma laparotomia mediana sob assepsia. Mediante a ligadura de 2 a 4 ramos da artéria renal, 2/3 do rim esquerdo foram enfartados e o rim direito removido, obtendo-se assim a redução de 5/6 da massa renal total (grupos Nx). Após a cirurgia os animais foram mantidos durante 24 horas em gaiolas aquecidas e medicados com antibióticos e analgésicos. Como controle utilizamos animais submetidos a uma ablação simulada (grupos Sham), a qual consiste em laparotomia mediana sem retirada de massa renal, apenas com manipulação dos pedículos renais.

3.4 Grupos experimentais e protocolo

Vinte e quatro horas após o procedimento de ablação renal, os animais foram distribuídos da seguinte maneira:

- **S+nor**: 26 animais S acompanhados durante 60 dias sob normóxia (78 % de N₂, 21 % de O₂ e 1 % de outros gases);
- **Nx+nor**: 26 animais Nx acompanhados durante 60 dias sob normóxia (78 % de N₂, 21 % de O₂ e 1 % de outros gases);
- **S+hip**: 26 animais S acompanhados durante 60 dias em câmaras normobáricas de hipóxia com atmosfera pobre em oxigênio (88 % de N₂ e 12 % de O₂);

- **Nx+hip:** 28 animais Nx acompanhados durante 60 dias em câmaras normobáricas de hipóxia com atmosfera pobre em oxigênio (88 % de N₂ e 12 % de O₂).

Figura 4: Desenho esquemático do protocolo experimental

3.5 Acompanhamento dos ratos

Peso corpóreo:

Os ratos tiveram seu peso corpóreo (PE) verificado semanalmente.

Hematócrito, eritrócitos e hemoglobina:

Mensalmente foi realizada a verificação dos parâmetros hematológicos dos animais para verificação do mecanismo compensatório frente à hipóxia. Foram realizadas determinações de hematócrito (HT), contagem de eritrócitos (ER) e também a dosagem de hemoglobina (HB) através de kit comercial (Labtest®). Esses parâmetros hematológicos foram avaliados em sangue venoso caudal.

Pressão sistólica caudal:

A medida da pressão sistólica caudal (PC) foi realizada mensalmente por meio de um método oscilométrico optoeletrônico automatizado (BP 2000 - Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, Apex, North Carolina, EUA). Os ratos foram treinados a permanecer calmos durante toda a aferição. Os valores obtidos foram considerados válidos somente após tornarem-se estáveis.

Taxa de excreção urinária de albumina:

A albuminúria (U_{alb}) dos ratos foi medida mensalmente. A dosagem de albumina urinária foi realizada por imunodifusão radial, empregando um anticorpo específico anti-albumina de rato (MPBiomedicals LLC, EUA) (32) e a creatinina urinária (U_{creat}) através de método colorimétrico utilizando kit comercial (Labtest®). Diante da impossibilidade de obter urina de 24 horas desses animais, a albuminúria foi estimada pela relação albumina/creatinina (U_{alb}/U_{creat}) em amostras isoladas de urina.

3.6 Etapa final do estudo**Marcação para hipóxia tecidual:**

Ao final do período de estudo os ratos receberam injeções intraperitoneais de Pimonidazol HCl / HypoxyprobeTM-1 (IRG Biosciences, EUA), um composto que, sob baixa pO_2 , liga-se a proteínas tissulares formando adutos, ou seja, produtos finais de sua ligação direta a essas proteínas. Esse composto foi preparado através de sua diluição em soro fisiológico 0,9% e as

injeções aplicadas nos ratos na dosagem de 60 mg/kg. Passados 40 minutos da injeção, os ratos foram anestesiados e tiveram seus rins fixados e preparados para análise histomorfométrica e de imunohistoquímica para detecção dos adutos formados. Dessa forma, foi possível verificar a existência de hipóxia e, em caso afirmativo, em que região do parênquima renal ela ocorreu.

Amostras terminais de sangue e processamento do tecido renal:

Para obtenção de tecido renal e de amostras terminais de sangue, os animais foram anestesiados com Ketamina (Cristália®, 50 mg/kg) e Xilazina (Agener União®, 10 mg/kg) e submetidos a uma laparotomia mediana. A aorta abdominal foi cateterizada e dela foram coletadas amostras de sangue para dosagem de creatinina sérica (Screat) por método colorimétrico através de kit comercial (Labtest®, Brasil), e íons sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) plasmáticos através de analisador de eletrólitos (#9140, AVL Medical Instruments, Schaffhasue, Suíça). O rim esquerdo foi perfundido *in situ* a uma pressão igual à sistêmica, inicialmente com solução salina e, em seguida, com a solução DuBoscq-Brasil para a fixação do tecido. O tecido renal foi dividido em 2 ou 3 segmentos coronais e pós-fixado em formaldeído a 10% diluído em tampão fosfato.

3.7 Análises histológicas

O tecido renal foi desidratado, diafanizado e impregnado com parafina através de um processador automático de tecidos (Jung Histokinette 2000®,

Leica Instruments GmbH, Alemanha). Em seguida, o tecido foi incluído em blocos de parafina e cortado em secções de 4 µm por meio de um micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha). Foram montadas lâminas secas para análises histológicas e lâminas silanizadas para imunohistoquímica.

Para o processo de silanização, as lâminas foram colocadas em um banho de álcool 96° durante 1 minuto, seguido de banhos sucessivos de acetona PA durante 1 minuto e silano 6% durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas em 2 banhos de acetona e 2 banhos de água destilada, sendo posteriormente secadas em estufa a 60°C durante 1 dia e armazenadas sob refrigeração (4°C) até a utilização.

3.8 Análises de histomorfometria renal

Esclerose glomerular:

A reação do ácido periódico de Schiff (PAS) foi utilizada para a avaliação da esclerose glomerular (EG). Os cortes de tecido renal foram submetidos à oxidação por solução de ácido periódico 0,5% por 15 minutos e lavadas em água destilada. Em seguida, as lâminas foram coradas com solução de reativo de Schiff (solução aquosa de fucsina básica a 0,5% acrescida de 15 mL de ácido clorídrico 1 N e 9 g de metabissulfito de sódio a cada 100 mL da solução) por 20 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água destilada e contracoradas com hematoxilina de Carazzi (solução aquosa, 20% de glicerina, 0,1% de hematoxilina, 5% de sulfato de alumen e potássio e 0,02% de iodato

de potássio) por 5 minutos. Os cortes foram montados entre lâmina e lamínula com *permount*.

O grau de EG de cada animal foi avaliado pela porcentagem de glomérulos com lesões escleróticas (%EG), obtida por um observador que não conhecia os grupos experimentais.

Expansão intersticial:

Para avaliação da expansão intersticial (%INT) utilizamos a coloração de Tricrômio de Masson. As lâminas foram coradas por 10 minutos com hematoxilina férrica de Weigert, que consiste numa solução de hematoxilina diluída a 1% em etanol 95% e de uma solução aquosa de cloreto férrico 1,2%. Após serem lavadas em água destilada, as lâminas foram coradas com solução de escarlata de Biebrich (solução aquosa, 0,9% de escarlata de Biebrich, 0,1% de fucsina ácida e 0,01% de ácido acético glacial) por 1 minuto. Após lavagem das lâminas com água destilada, seguiu-se a coloração com diferenciador de Masson (solução aquosa, 2,5% de ácido fosfotúngstico e 2,5% de ácido fosfomolibdico) por 10 a 15 minutos e, em seguida, azul de anilina 2,5% acrescido de 2 mL de ácido acético glacial para cada 100 mL de solução. Após serem coradas, as lâminas foram desidratadas e diafanizadas com uma sequência de banhos em soluções de etanol com concentração crescente, seguidos de 3 banhos em xilol. Os cortes foram montados entre lâmina e lamínula com *permount*.

A fração do córtex renal ocupada por interstício e corada positivamente foi quantificada por um método de contagem de pontos. Foram avaliados 25 campos microscópicos consecutivos, num aumento final de 200X com uma

ocular graticulada de 176 pontos, obtendo-se um valor final, expresso em percentagem de expansão intersticial (22).

3.9 Análises por imunohistoquímica

Conforme descrito anteriormente, a técnica de imunohistoquímica foi realizada em cortes histológicos montados sobre lâminas previamente silanizadas. Essas lâminas foram desparafinizadas e reidratadas através de aquecimento (em estufa a 60°C durante 30 minutos) seguido por uma bateria de banhos de xilol e etanol em concentrações decrescentes. Ao término desta sequência as lâminas foram mantidas em água destilada por no mínimo 5 minutos e, para recuperação antigênica, foram posteriormente submetidas a calor úmido, em solução de ácido cítrico 10 mM tamponado, em pH 6,0, a uma temperatura aproximada de 95°C, durante 30 minutos. Para todos os marcadores utilizamos a solução salina tris-tamponada TBS [1X] (0,05 M de Tris e 0,15 M de cloreto de sódio pH 7,6) como tampão de lavagem. Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida a fim de evitar o ressecamento dos cortes.

Os métodos utilizados para o estudo imunohistoquímico foram o APAAP (fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina), a técnica da estreptavidina – fosfatase alcalina e a imunoperoxidase indireta. Para caracterização de hipóxia tecidual, empregamos anticorpos anti-pimonidazol (MAb1 #9.7.11, HypoxyprobeTM-1 Kit). Para os demais parâmetros, os seguintes anticorpos primários foram utilizados: policlonal rabbit anti-colágeno I COL-1 (Abcam, Cambridge, UK), monoclonal mouse anti-rato ED-1 (Serotec, Oxford, UK) para

visualização de macrófagos; monoclonal mouse anti-humano CD3 (Dako, Glostrup, Denmark) para visualização de linfócitos; anti-rato ANG2 (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA) para detectar células positivas para angiotensina II. Ao final das reações, os cortes foram contracolorados e colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (glicergel) e foram em seguida devidamente etiquetados.

Pimonidazol (Hipóxia):

Após os procedimentos de desparafinização e recuperação dos antígenos, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, que consiste na incubação dos cortes com uma solução de peróxido de hidrogênio em álcool metílico por 30 minutos. Em seguida, sucedeu-se o bloqueio de marcações inespecíficas no tecido. Dessa forma, os cortes foram incubados inicialmente com 1 gota (cerca de 80µl) de Avidina (Dako #X0590) por 15 minutos, lavados em TBS por 5 minutos sob leve agitação. Em seguida, foram incubados com 1 gota de Biotina (Dako #X0590) também por 15 minutos. Por fim, após nova lavagem em TBS por 5 minutos sob leve agitação, aplicou-se 1 gota de Protein Block (Dako #X0909) sobre os cortes, os quais foram incubados por 30 minutos. A partir disso, os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-pimonidazol (MAb1 #9.7.11, HypoxyprobeTM-1 Kit) na diluição 1:500 em solução de BSA 1%, sob temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Após a retirada do excesso de anticorpo primário, os cortes foram lavados com TBS por 5 minutos sob leve agitação e incubados com anticorpo secundário anti-camundongo biotinilado (Vector, #BA2001) na diluição 1:200 em solução de BSA 1%, sob temperatura ambiente, por 45 minutos. Após

lavagem em TBS por 5 minutos sob leve agitação, os cortes foram incubados com 1 gota de Streptavidina HRP por 30 minutos (Dako, #K0690) e novamente lavados em TBS por 5 minutos sob leve agitação. A revelação foi realizada com cromógeno DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 6 minutos e a contracoloração com hematoxilina de Harris (Hemalaum-Merck) durante 2 minutos. A quantificação da marcação para pimonidazol foi realizada pela contagem de túbulos marcados *versus* o número total de túbulos no córtex renal no aumento de 400 X. Foram examinados 20 campos microscópicos, correspondendo a uma área de 0,08 mm². Os resultados foram expressos em porcentagem.

Identificação de colágeno-1 (COL-1):

A identificação de COL-1 intersticial foi realizada utilizando o método da Peroxidase. Após a desparafinização e recuperação antigênica procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. Após serem lavadas com tampão TBS, os cortes foram incubados com soro não imune de cavalo na diluição de 1:50 para bloqueio de marcação inespecífica por 30 minutos. Retirou-se o excesso de soro e os tecidos renais foram incubados com o anticorpo primário anti-colagênio tipo I (Abcam®, Cambridge, UK) diluído na proporção de 1:200 em solução de BSA a 1% em TBS, à temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Após lavagem em TBS, os cortes foram incubados com 80 µl de Envision Flex HRP (Dako, Carpinteria, CA, EUA), durante 30 minutos. O substrato cromogênico DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi preparado na proporção de 1:20 em substrato. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Mayer 100% (Hemalaum-

Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquosa de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. Para a avaliação da porcentagem da área intersticial ocupada por colágeno tipo 1 utilizamos um método de contagem de pontos. Foram avaliados 20 campos microscópicos consecutivos, num aumento final de 400x com uma ocular graticulada de 144 pontos.

Infiltração de macrófagos (ED-1):

A identificação de células positivas para macrófagos foi realizada pelo método de APAAP (Fosfatase Alcalina Anti-Fosfatase Alcalina). Após a desparafinização e recuperação antigênica, os tecidos foram submetidos ao bloqueio de marcação inespecífica com soro não imune de coelho (Dako, Carpinteria, CA, EUA), em concentração 1:20 por 30 minutos. Os tecidos foram incubados com anticorpo primário desenvolvido em camundongo anti-ED-1 (Serotec, MCA341R Oxford, Reino Unido) na diluição 1:200 sob temperatura de 3-8 °C durante um período de 18 horas. Após a retirada do excesso de anticorpo primário, os cortes foram lavados com TBS por 5 minutos sob leve agitação e incubados com anticorpo secundário anti-camundongo desenvolvido em coelho - RAM (Dako, Carpinteria, CA, EUA) na diluição 1:50 à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após nova lavagem em TBS por 5 minutos sob leve agitação, os cortes foram incubados com o complexo APAAP na diluição 1:70 por 30 minutos. Ao final desse procedimento, o tecido estava pronto para a revelação em tempo variável com substrato cromogênico Permanent-Red. As células positivas para o epítipo ED-1 foram visualizadas devido à precipitação do produto da reação da fosfatase alcalina do complexo e do Permanent-Red

presente no substrato cromogênico. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. A quantificação de macrófagos foi realizada pela contagem de células marcadas no córtex renal com aumento de 400 X. Foram examinados 20 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 0,08 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/s/mm²).

Infiltração de linfócitos (CD3):

Para avaliação da expressão de CD3 foi empregada a técnica da Estreptavidina-Biotina-Fosfatase Alcalina. Após a desparafinização e exposição dos epítomos, os tecidos foram submetidos ao bloqueio da biotina endógena através da incubação com solução de bloqueio de Avidina e Biotina (Dako #X0590) por 15 minutos cada. Depois, foram incubados com soro não imune de cavalo (Vector #S-2000) na concentração de 1:50 diluído em solução de BSA 1% por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados por 24 horas com o anticorpo primário anti-CD3 (Dako #M7254) diluído em BSA 1% na proporção de 1:100. No dia seguinte, os cortes foram incubados com o anticorpo secundários anti-camundongo biotinilado (Vector BA-2001) diluído em BSA 1% na proporção de 1:200 durante 45 minutos. Depois disso, os cortes foram incubados durante 30 minutos com o Complexo Streptavidina-AP (Vector Vectastain ABC-AP #AK5000). Ao final desse procedimento, o tecido estava pronto para a revelação em tempo variável com substrato cromogênico Permanent-Red. As células positivas para o epítomo CD3 foram visualizadas devido à precipitação do produto da reação da fosfatase alcalina do Complexo e do Permanent-Red presente no substrato cromogênico. A contracoloração foi

realizada com hematoxilina de Mayer (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. A quantificação de linfócitos foi realizada pela contagem de células marcadas no córtex renal com aumento de 400X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 0,08 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/mm²).

Células positivas para Angiotensina II (ANG2):

Para avaliação de células positivas para Angiotensina II (ANG2) foi empregada a técnica da Estreptavidina-Biotina-Fosfatase Alcalina. Após a desparafinização e exposição dos epítomos, os tecidos foram submetidos ao bloqueio da biotina endógena através da incubação com solução de bloqueio de Avidina e Biotina (Dako #X0590) por 15 minutos cada. Depois, foram incubados com soro não imune de cavalo (Vector #S-2000) na concentração de 1:50 diluído em solução de leite a 5% em TBS por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados por 24 horas com o anticorpo primário anti-ANG2 (Penninsula #T4007) diluído em BSA 1% na proporção de 1:400. No dia seguinte, os cortes foram incubados com o anticorpo secundários anti-rabbit biotinilado (Vector BA-1000) diluído em BSA 1% na proporção de 1:1000 durante 45 minutos. Depois disso, os cortes foram incubados durante 30 minutos com o Complexo Streptavidina-AP (Vector Vectastain ABC-AP #AK5000). Ao final desse procedimento, o tecido estava pronto para a revelação em tempo variável com substrato cromogênico Permanent-Red. As células positivas para o epítomo ANG2 foram visualizadas devido à precipitação

do produto da reação da fosfatase alcalina do Complexo e do Permanent-Red presente no substrato cromogênico. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer (Hemalaum-Merck) durante 1 minuto. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer (Glycergel) e foram em seguida devidamente etiquetados. A quantificação de células positivas para ANG2 foi realizada pela contagem de células marcadas no córtex renal com aumento de 400X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 0,08 mm². Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/mm²).

3.10 Análises por PCR

A expressão gênica de alguns dos componentes da resposta imune inata foi analisada através de PCR quantitativo (qPCR) em fragmentos de tecido renal obtido durante o sacrifício dos animais estudados. Esses fragmentos foram congelados em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta e armazenados a -80 °C até o uso.

Extração e purificação do RNA renal:

Para a extração de RNA, utilizamos o kit RNAeasy (#74106, QIAGEN®) seguindo estritamente as recomendações do fabricante. Fragmentos de córtex renal congelado pesando entre 20 e 30 mg foram colocados em tubos de polipropileno reforçado, contendo microesferas de cerâmica (OMNI 19-628). A estes, adicionou-se o tampão de extração RLT do kit RNeasy, previamente

acrescido de β -mercaptoetanol. Os tubos foram vedados e submetidos a agitação em um *bead ruptor* (Omni Bead Ruptor 24) durante 60 segundos para total homogeneização do tecido. Esse homogenato foi então centrifugado a 12.000 G, 4 °C, durante 3 minutos e o sobrenadante produzido foi transferido para um novo eppendorf, mantido em uma cuba com gelo. Ao sobrenadante resgatado, adicionou-se igual volume de etanol 70 %. Após homogeneização por inversão, 700 μ l dessa mistura foram transferidos para uma coluna de extração “Mini Spin Column” do kit RNeasy e a mesma foi centrifugada por 15 segundos a 8.000 G, 4 °C. Após a centrifugação, o conteúdo do coletor (líquido que ultrapassou a coluna) foi descartado e adicionou-se à coluna 350 μ l do tampão RW1. O processo de centrifugação foi repetido e o conteúdo do coletor foi novamente descartado. Nesta etapa, restam no elemento filtrador da coluna de extração apenas os ácidos nucleicos da amostra processada.

A fim de eliminar o DNA genômico (DNAg) presente nas colunas, estas foram submetidas a uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente com um volume de 80 μ l de solução de degradação de DNA (RNAse free DNase Incubation Mix), após a qual adicionou-se novamente 350 μ l do tampão RW1 às colunas e o processo de centrifugação foi repetido. O conteúdo do coletor foi então descartado e o elemento filtrador da coluna foi lavado 2 vezes com tampão RPE através da adição de 500 μ l do tampão, seguida de centrifugação. Após o descarte do conteúdo dos tubos coletores, as colunas foram finalmente submetidas a secagem por centrifugação rápida (1 minuto, 12.000 G, 4 °C). Por fim, as colunas foram transferidas para novos eppendorfs e a cada coluna foram adicionados 50 μ l de água *RNAse-free*. As colunas foram centrifugadas a 8.000 G, 4 °C durante 2 minutos, e o líquido coletado em

tubos eppendorf (solução de RNA) foi suavemente homogeneizado e armazenado para posterior quantificação e análise da integridade do RNA.

Análise qualitativa e quantitativa do RNA extraído:

Alíquotas de 1,5 µl de solução de RNA total obtida através da etapa anteriormente descrita foram submetidas a leitura em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A concentração de RNA foi calculada em ng/µl pelo software integrado ao equipamento. Adicionalmente, a pureza do RNA obtido foi determinada através do cálculo da razão das absorbâncias a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}), considerando-se um extrato de RNA de boa qualidade aquele cuja razão A_{260}/A_{280} se manteve entre 1,9 e 2,1.

Para verificação da integridade das amostras de RNA obtidas, realizou-se uma corrida eletroforética em gel de agarose desnaturante contendo 0,004 % de brometo de etídio. O gel foi fotografado através do transiluminador ultravioleta (UV) em fotodocumentador (Uvitech®). Foram consideradas amostras de RNA íntegras aquelas nas quais foi possível visualizar com nitidez e sem arraste as bandas de RNA ribossomal 28S e 18S. Somente as amostras com concentração de RNA satisfatória e de boa qualidade, ou seja, sem vestígios de degradação, foram utilizadas para as reações subsequentes de RT-PCR em tempo real.

Transcrição Reversa (RT):

A partir do RNA obtido na extração, realizou-se a reação de transcrição reversa (RT), objetivando-se a síntese de um DNA de fita simples,

complementar ao RNA mensageiro (RNAm) presente na amostra original (cDNA). Para a reação de RT utilizamos o kit Rt² Easy First Strand (#330401, Qiagen®) e as recomendações do fabricante foram estritamente seguidas. Para cada reação, utilizamos uma massa de 500 ng de RNA total, que foi previamente tratada com uma solução de DNase *RNAse free* (#79254, Qiagen®) e incubada em termociclador convencional por 5 minutos a 42 °C para eliminação de quaisquer vestígios de DNAg. Adicionamos a seguir 10 µl do mix de transcrição reversa contendo *primers* do tipo Oligo-dT que se ligam especificamente à cauda poli-A do RNAm, promovendo a transcrição reversa somente deste subtipo de RNA em cDNA. Essa mistura foi mantida em um termociclador convencional por três ciclos: O primeiro a 42 °C por 15 minutos, o segundo a 95 °C por 5 minutos e o terceiro a 4 °C por no mínimo 1 minuto. Ao produto da reação adicionou-se 91 µl de água *RNAse free*.

PCR quantitativo em tempo real (qPCR):

A expressão dos genes de interesse no tecido renal estudado foi analisada pela técnica de qPCR utilizando-se o equipamento ViiA7 - Applied Biosystems (Life Technologies) e os softwares que o acompanham. Foram ainda empregados kits de *Mastermix Rt² Syber Green ROX qPCR Primer Assay* (#330523, QIAGEN®). Para cada reação, adicionamos 6,25 µl de tampão Rt² Syber Green mastermix, 5,25 µl de água RNAse-free e 0,5 µl do par de *primers* específico para o gene de interesse (*Rt² qPCR Primer Assay* – vide lista de *primers* utilizados por gene a seguir). Aplicamos 12 µl dessa mistura a cada poço de uma placa plástica apropriada para reações de qPCR, aos quais foi adicionado 1 µl da amostra de cDNA. As reações foram realizadas

em triplicata técnica. Após a pipetagem da placa, a mesma foi selada e centrifugada por 1 minuto a 1.000 G e introduzida no equipamento ViiA7 para realização da reação. O gene endógeno selecionado como melhor calibrador para as reações (housekeeping gene – HK) foi o Bact, que codifica para a proteína β -actina (33, 34).

A enzima DNA polimerase utilizada em nossas reações é do tipo “*hot start*”, portanto faz-se necessária a inclusão de um ciclo inicial de 10 minutos a 95 °C. Em seguida, foram realizados 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C / 1 minuto a 60 °C. A curva de dissociação dos produtos amplificados para a determinação da temperatura de *melting* dos mesmos e avaliação da qualidade da amostra foi traçada para todos os genes após os 40 ciclos de amplificação.

Tabela 1 - Lista de *primers* utilizados neste estudo

β-actina	Actb	330001 PPR06570C
Pró IL-1β	Il1b	330001 PPR06480B
NLRP3	Nlrp3	330001 PPR56639A
TLR4	Tlr4	330001 PPR45931B
Pró Caspase 1	Casp 1	330001 PPR06427A

Análise dos resultados do qPCR:

A expressão gênica de cada gene alvo foi normalizada pela expressão do gene HK na mesma amostra e foi então apresentada como “Fold Change”, ou seja, quantas vezes, em relação ao grupo controle, aquele determinado gene alvo é expresso em um grupo experimental. Para tanto, primeiramente foi estabelecido um *threshold* fixo para cada gene, que é uma reta paralela ao eixo

“X” do gráfico e que corta a curva de amplificação gênica em sua fase exponencial. O *threshold* representa um valor arbitrário de fluorescência emitida e determina o ponto da curva de amplificação que será analisado para todas as amostras estudadas para um determinado par de *primers* (um determinado gene). O número do ciclo de amplificação no qual cada amostra cruza com o *threshold* pré-estabelecido é o ciclo-*threshold* (CT) daquela amostra. A partir da normalização do CT do gene alvo (*Gene of Interest* ou GOI) pelo CT do gene HK de uma determinada amostra, obtivemos o ΔCT ($CT_{GOI} - CT_{HK}$) daquela amostra. O ΔCT de cada amostra dos grupos experimentais foi então normalizado pela média dos ΔCT s do grupo controle, para obtenção do $\Delta\Delta CT$ ($\Delta CT_{\text{grupo experimental}} - \Delta CT_{\text{grupo controle}}$). Por fim, para facilitar a interpretação dos dados, aplicamos a expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$, fazendo com que os valores finais sejam expressos como o número de vezes que um determinado gene alvo é expresso em um grupo experimental em relação ao seu grupo controle, conforme mencionado anteriormente.

3.11 Análise estatística

Os resultados foram analisados através de comparação de parâmetros dos grupos sham e Nx, normóxia *versus* hipóxia, aplicando-se análise de variância de dois fatores (ANOVA), com pós-testes de acordo com o método de Newman-Keuls, sendo considerados significativos os valores de “p” inferiores a 0,05. Os cálculos foram efetuados através do software GraphPad Prism® versão 4.0 e os resultados apresentados como média $\pm$ erro padrão.

4 RESULTADOS

A seguir serão demonstrados os resultados obtidos nos grupos analisados. Em todos os parâmetros, foi realizada análise comparativa dos grupos com ablação renal de 5/6 (Nx+nor e Nx+hip) e seus respectivos controles (S+nor e Nx+nor), indicada com ^a quando $p < 0.05$ após 60 dias. Em segunda análise, foi realizada a comparação dos grupos hipóxia (S+hip e Nx+hip) e seus respectivos normóxia (S+nor e Nx+nor), indicada com ^(b) quando $p < 0.05$ após 60 dias.

Os dados referentes ao hematócrito arterial, hemoglobina circulante e contagem de eritrócitos estão representados na tabela 2 e figura 5.

Tabela 2 – Valores de hematócrito (HT, %), hemoglobina (HB, g/dL) e contagem de eritrócitos (ER, $\times 10^6$ céls/mm³) dos animais após 60 dias de tratamento.

	HT	HB	ER
S+nor	48 $\pm$ 0	15,1 $\pm$ 0,2	8,3 $\pm$ 0,2
Nx+nor	44 $\pm$ 1 ^a	13,7 $\pm$ 0,4 ^a	7,3 $\pm$ 0,3 ^a
S+hip	59 $\pm$ 1 ^b	19,1 $\pm$ 0,6 ^b	10,4 $\pm$ 0,2 ^b
Nx+hip	53 $\pm$ 1 ^{ab}	17,2 $\pm$ 0,5 ^{ab}	9,2 $\pm$ 0,4 ^{ab}

Resultados expressos como média $\pm$ EP (^a $p < 0,05$ vs. S; ^b $p < 0,05$ vs. normóxia).

Figura 5. Hematócrito (HT, %), hemoglobina (HB, g/dL) e contagem de eritrócitos (ER, $\times 10^6$ céls/mm³) dos animais após 60 dias de tratamento.

^a $p < 0,05$ vs. S; ^b $p < 0,05$ vs. normóxia.

O hematócrito dos ratos S+nor manteve-se estável durante todo o período de estudo. O grupo Nx+nor demonstrou uma diminuição significativa nesse parâmetro quando comparado a S+nor, como possível consequência da redução de massa renal. Já os grupos submetidos a hipóxia demonstraram uma elevação no hematócrito, possivelmente como um mecanismo de compensação frente à hipóxia. O grupo S+hip demonstrou uma elevação significativa de hematócrito quando comparado a S+nor. O grupo Nx+hip também demonstrou elevação de HT, mas em menor proporção quando comparado a S+hip. Os parâmetros de hemoglobina apresentaram um comportamento semelhante ao verificado para o hematócrito. De modo semelhante, os grupos S+hip e Nx+hip apresentaram uma elevação significativa na quantidade de eritrócitos quando comparados aos seus respectivos grupos normóxia.

A hipóxia foi caracterizada através da técnica de imunohistoquímica para Pimonidazol (Hypoxyprobe®) e os resultados estão apresentados na tabela 3 e figura 6.

Tabela 3 – Valores de pimonidazol (%) em região cortical do rim dos animais após 60 dias de tratamento.

Pimonidazol	
S+nor	4±1
Nx+nor	60±5 ^a
S+hip	68±6 ^b
Nx+hip	69±3

Resultados expressos como média±EP (^a p<0,05 vs. S; ^b p<0,05 vs. normóxia).

Figura 6. Imunohistoquímica para Pimonidazol (Hypoxyprobe®) em área cortical do rim dos ratos após 60 dias de tratamento.

^a p<0,05 vs. S; ^b p<0,05 vs. normóxia.

Em S+nor a detecção de hipóxia mostrou-se muito bem delimitada, correspondendo essencialmente à região medular externa (e raios medulares) e medular interna dos rins. Já em S+hip vemos que essa marcação se difunde por todo o parênquima renal, com exceção dos glomérulos. Em Nx, apesar do borramento da diferenciação medula/córtex, pudemos verificar a presença de hipóxia na região cortical em Nx+nor, o que foi agravado em Nx+hip.

Os valores de peso corpóreo (PE, g), peso renal (RIM/PE), peso dos ventrículos esquerdo (VE/PE) e direito (VD/PE) dos animais após 60 dias de tratamento estão apresentados na tabela 4 e figura 7.

Tabela 4 – Peso corpóreo (PE, g), peso renal (RIM) e dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) em relação ao peso corpóreo dos animais após 60 dias de tratamento.

	PE	RIM/PE	VE/PE	VD/PE
S+nor	303±5	0,46±0,01	0,25±0,01	0,06±0,01
Nx+nor	270±5 ^a	0,47±0,03	0,32±0,02 ^a	0,07±0,01
S+hip	287±6 ^b	0,43±0,01	0,26±0,01	0,08±0,01
Nx+hip	261±5 ^a	0,39±0,02 ^{ab}	0,28±0,01 ^b	0,07±0,01

Resultados expressos como média±EP (^a p<0,05 vs. S; ^b p<0,05 vs. normóxia).

Figura 7. Peso corpóreo (PE, g) peso renal (RIM) e dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) em relação ao peso corpóreo dos animais após 60 dias de tratamento.

^a p<0,05 vs. S; ^b p<0,05 vs. normóxia.

Como esperado, os grupos Nx apresentaram menor ganho de peso quando comparados a seus respectivos controles. A hipóxia não afetou o ganho de peso no grupo Nx+hip, mas reduziu a hipertrofia renal. Ao analisarmos o peso do VE, notamos que os ratos Nx+nor apresentam uma elevação nesse indicador quando comparados a S+nor, o que foi atenuado nos ratos Nx+hip. Quanto ao peso do VD, observamos que não houve diferença

estatística entre os grupos analisados, mas constatamos uma tendência numérica de elevação nos grupos submetidos a hipóxia.

Na tabela 5 e figuras 8-9 estão apresentados os dados referentes a concentrações séricas de creatinina (Creat_s, mg/dL) e ureia (Ureia_s, mg/dL), e concentrações plasmáticas de íons sódio (Na⁺, mEq/L) e potássio (K⁺, mEq/L) dos animais após 60 dias de tratamento.

Tabela 5 – Concentrações séricas de creatinina (Creat_s, mg/dL), ureia (Ureia_s, mg/dL) e concentrações plasmáticas de íons sódio (Na⁺, mEq/L) e potássio (K⁺, mEq/L) dos animais após 60 dias de tratamento.

	Creat_s	Ureia_s	Na⁺	K⁺
S+nor	0,6±0,0	50±2	142±1	4,3±0,1
Nx+nor	1,3±0,1 ^a	151±9 ^a	142±1	4,6±0,2
S+hip	0,7±0,0	50±3	144±1	4,4±0,2
Nx+hip	1,2±0,0 ^a	126±6 ^{ab}	143±0	4,6±0,1

Resultados expressos como média±EP (^a p<0,05 vs. S; ^b p<0,05 vs. normóxia).

Figura 8. Concentrações séricas de creatinina (Creat_s, mg/dL) e ureia (Ureia_s, mg/dL) dos animais após 60 dias de tratamento.

^a p<0,05 vs. S; ^b p<0,05 vs. normóxia.

Figura 9. Concentrações plasmáticas dos íons sódio e potássio (Na^+ e K^+ , mEq/L) dos animais após 60 dias de tratamento.

^a $p < 0,05$ vs. S; ^b $p < 0,05$ vs. normóxia.

A creatinina sérica aumentou devido à ablação renal, mas não foi reduzida significativamente pela hipóxia. A ureia sérica mostrou-se elevada nos ratos Nx, e foi significativamente diminuída sob hipóxia. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto às concentrações de sódio ou potássio no plasma.

Os resultados de pressão sistólica caudal (PC, mmHg), relação albumina/creatinina urinária, porcentagens de glomeruloesclerose (%GS), área intersticial (%INT) e colágeno 1 cortical (%COL-1) e encontram-se na tabela 6 e figuras 10-12.

Tabela 6 – Valores de pressão sistólica caudal (PC, mmHg), relação albumina/creatinina urinária (U_{alb}/U_{creat} , sem unidade), porcentagens de glomeruloesclerose (%GS) e colágeno 1 cortical (%COL-1) dos animais após 60 dias de tratamento.

	PC	U_{alb}/U_{creat}	%GS	%COL-1
S+nor	142±1	0,2±0,0	0,2±0,1	3,3±0,3
Nx+nor	189±5 ^a	3,7±0,7 ^a	10,0±2,4 ^a	10,5±0,5 ^a
S+hip	136±2	0,2±0,0	0,2±0,1	3,0±0,2
Nx+hip	171±5 ^{ab}	2,4±0,4 ^{ab}	3,5±0,9 ^{ab}	7,9±0,5 ^{ab}

Resultados expressos como média±EP (^a p<0,05 vs. S; ^b p<0,05 vs. normóxia).

Figura 10. Pressão sistólica caudal (PC, mmHg) e relação albumina/creatinina urinária (U_{alb}/U_{creat} , sem unidade) dos animais após 60 dias de tratamento.

^a p<0,05 vs. S; ^b p<0,05 vs. normóxia.

Os grupos S mantiveram-se normotensos durante todo o período de estudo. A ablação renal induziu uma elevação significativa da pressão sistólica caudal nos grupos Nx, quando comparados a S. Todavia, a hipertensão foi significativamente atenuada no grupo submetido a hipóxia (Nx+hip) quando

comparado a Nx+nor. A relação U_{alb}/U_{creat} mostrou-se elevada nos grupos Nx, quando comparados a S, sendo que os ratos Nx+hip apresentaram uma diminuição significativa nesse parâmetro quando comparados a Nx+nor.

Figura 11. Glomerulosclerose (%GS) após 60 dias de tratamento.

^a $p < 0,05$ vs. S; ^b $p < 0,05$ vs. normóxia.

Figura 12. Colágeno 1 cortical (%COL-1) após 60 dias de tratamento.

^a $p < 0,05$ vs. S; ^b $p < 0,05$ vs. normóxia.

A análise da fração glomerular com lesões escleróticas seguiu um padrão semelhante ao dos parâmetros apresentados até aqui. A hipóxia não causou injúria glomerular em ratos Sham, e reduziu a glomeruloesclerose em ratos Nx. A deposição de colágeno seguiu o mesmo perfil.

Os resultados referentes à densidade de infiltração intersticial cortical de macrófagos, linfócitos e células positivas para angiotensina-2 após 60 dias de ablação renal estão demonstrados na tabela 7 e figura 13.

Tabela 7 – Infiltração intersticial de macrófagos (MØ, céls/mm²), linfócitos (LIN, céls/mm²) e células positivas para angiotensina-2 (ANGII) dos animais após 60 dias de tratamento.

	MØ	LIN	ANGII
S+nor	14,0±2,4	16,4±1,4	1,6±0,3
Nx+nor	71,9±4,7 ^a	57,7±3,6 ^a	7,7±1,1 ^a
S+hip	15,3±1,9	15,6±1,6	2,5±0,4
Nx+hip	39,3±3,1 ^{ab}	36,1±3,4 ^{ab}	3,6±0,3 ^b

Resultados expressos como média±EP (^a p<0,05 vs. S; ^b p<0,05 vs. normóxia).

Figura 13. Infiltração intersticial de macrófagos (MØ) após 60 dias.

^a p<0,05 vs. S; ^b p<0,05 vs. normóxia.

Figura 14. Infiltração intersticial cortical de linfócitos e células positivas para angiotensina-2 (ANGII) após 60 dias de tratamento.

^a $p < 0,05$ vs. S; ^b $p < 0,05$ vs. normóxia.

Os grupos Nx apresentaram infiltração macrofágica e linfocitária elevada e um maior número de células positivas para angiotensina-2 quando comparados a S, porém esses parâmetros foram atenuados significativamente no grupo Nx+hip.

Os valores da expressão gênica renal de componentes da imunidade inata estão demonstrados nas tabelas 8-9 e figuras 15-16.

Tabela 8 – Valores da expressão gênica ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de Pró caspase-1, NLRP3 e Pró IL-1 β em rins dos ratos após 60 dias de tratamento.

	Pró caspase-1	NLRP3	Pró IL-1 β
S+nor	1,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,3
Nx+nor	2,0 $\pm$ 0,2 ^a	2,8 $\pm$ 0,4 ^a	1,8 $\pm$ 0,2 ^a
S+hip	0,7 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,2
Nx+hip	2,0 $\pm$ 0,2 ^a	2,7 $\pm$ 0,2 ^a	1,6 $\pm$ 0,1 ^a

Resultados expressos como média $\pm$ EP (^a $p < 0,05$ vs. S; ^b $p < 0,05$ vs. normóxia).

Figura 15. Expressão gênica ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de Pró caspase-1, NLRP3 e Pró IL-1 β em rins dos ratos após 60 dias de tratamento.

^a $p < 0,05$ vs. S; ^b $p < 0,05$ vs. normóxia.

A ablação renal promoveu a ativação dos genes da Pró caspase-1, NLRP3 e Pró IL-1 β , porém a hipóxia não exerceu influência nesses parâmetros em Sham ou Nx.

Tabela 9 – Valores da expressão gênica ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de TLR4 e proteica de p65 (NF- κ B, *fold change*) em rins dos ratos após 60 dias de tratamento.

	TLR4	p65 (NF- κ B)
S+nor	1,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,2
Nx+nor	2,6 $\pm$ 0,4 ^a	2,9 $\pm$ 0,4 ^a
S+nor	0,9 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,2
Nx+nor	2,2 $\pm$ 0,2 ^a	1,7 $\pm$ 0,3 ^b

Resultados expressos como média $\pm$ EP (^a $p < 0,05$ vs. S; ^b $p < 0,05$ vs. normóxia).

Figura 16. Expressão gênica ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de TLR4 e proteica de p65 (NF- κ B, *fold change*) em rins dos ratos após 60 dias de tratamento.

^a $p < 0,05$ vs. S; ^b $p < 0,05$ vs. normóxia.

A expressão renal de TLR4 foi fortemente aumentada em ratos Nx+nor. A hipóxia atenuou essa expressão no grupo Nx+hip e não apresentou efeito em ratos Sham. O conteúdo renal de p65 nuclear esteve aumentado no grupo Nx+nor, indicando a ativação da via do NF- κ B. A hipóxia promoveu uma atenuação significativa dessa alteração no grupo Nx+hip. Não foi verificado efeito da hipóxia na expressão de p65 nuclear em ratos Sham.

Na tabela 10 e figura 17 estão representados os dados relativos ao estresse oxidativo através da análise da expressão renal de heme oxigenase 1 (HO-1, *fold change*).

Tabela 10 – Valores de heme oxigenase 1 (HO-1, *fold change*) em rins dos ratos após 60 dias de tratamento.

HO-1	
S+nor	0,8±0,2
Nx+nor	4,1±0,5 ^a
S+nor	1,0±0,1
Nx+nor	2,8±0,9 ^a

Resultados expressos como média±EP (^a p<0,05 vs. S; ^b p<0,05 vs. normóxia).

Figura 17. Expressão proteica renal de heme oxigenase 1 (HO-1, *fold change*) após 60 dias de tratamento.

^a p<0,05 vs. S; ^b p<0,05 vs. normóxia.

A ablação renal esteve associada a um forte aumento no conteúdo renal de HO-1, sugerindo a ocorrência de estresse oxidativo no grupo Nx+nor. A hipóxia promoveu uma redução significativa na expressão de HO-1.

5 DISCUSSÃO

Como esperado, a exposição crônica a um ambiente de baixo pO_2 promoveu hipóxia renal em ratos Sham, conforme verificamos pelo aumento na marcação positiva para adutos de Pimonidazol na região cortical. Juntamente com a policitemia acentuada também provocada pela exposição à baixa pO_2 , essas observações indicam que um conjunto complexo de respostas adaptativas à hipóxia foi colocado em operação.

A hipóxia crônica do tecido renal não foi associada à albuminúria ou a qualquer sinal de glomeruloesclerose ou inflamação/fibrose intersticial em ratos Sham. Essa observação é inconsistente com a noção de que a hipóxia resultante das mudanças estruturais promovidas pela DRC é um fator patogênico que pode iniciar a DRC (24, 26, 35, 36). Entretanto, esses achados não excluem a possibilidade de que a hipóxia renal possa agravar a injúria renal proveniente de outros mecanismos.

Dois meses após ablação renal, ratos Nx mantidos em normóxia exibiram hipóxia cortical de extensão semelhante à de ratos Sham expostos a uma baixa pO_2 , em consistência com achados anteriores (28) e, muito provavelmente, refletindo rarefação capilar (29). Como observado com ratos Sham, a exposição de ratos Nx a uma atmosfera com baixo teor de oxigênio foi associada à expansão da área cortical marcada positivamente para o pimonidazol.

Contrariando o resultado esperado, e apesar do agravamento da hipóxia renal, a exposição de ratos Nx à baixa pO_2 ambiente não só não foi associada ao agravamento da DRC mas, surpreendentemente, promoveu melhora da hipertensão, albuminúria, hipertrofia renal, glomeruloesclerose e fibrose

intersticial. Além disso, a hipóxia foi associada à forte atenuação da inflamação renal, limitando a intensidade da infiltração por macrófagos, linfócitos e células positivas para AngII.

Embora o presente estudo seja o primeiro a fornecer evidências diretas de que a exposição contínua a um ambiente normobárico de baixo oxigênio pode prevenir, ao invés de causar ou agravar, a DRC, algumas observações anteriores sugeriram que a hipóxia crônica poderia exercer um efeito protetor sobre o sistema cardiovascular e rins. Winkelmayr et al relataram que a mortalidade foi reduzida em pacientes em hemodiálise que vivem em altitudes elevadas em comparação com aqueles que vivem no nível do mar (37). Essa relação persistiu mesmo após o ajuste para fatores de confusão (30). Schiffer et al mostraram que, em ratos submetidos à hipóxia hipobárica durante 6h/dia por 28 dias, tanto a nefropatia diabética quanto o estresse oxidativo renal foram melhorados, juntamente com a restauração dos níveis renais de HIF-1 aos níveis normais (38).

As razões pelas quais a exposição a uma baixa atmosfera de pO_2 promoveria renoproteção, ao invés de agravar a lesão renal, ainda não estão claras. Uma possível explicação poderia ser que o tecido submetido à hipóxia crônica é de alguma forma protegido contra o estresse oxidativo. Yang et al relataram que a exposição crônica de ratos a uma hipóxia hipobárica intermitente tornou-os resistentes ao estresse oxidativo promovido por lipídios oxidados (39). Chen et al relataram que a hipóxia crônica hipobárica intermitente aumentou os níveis renais de superóxido dismutase, protegendo assim o tecido renal do dano oxidativo (40). No presente estudo, a exposição crônica a baixa pO_2 ambiente não promoveu mudança na abundância renal de

HO-1 em ratos Sham, sugerindo que não houve influência da hipóxia no estresse oxidativo em condições normais. A evidência de estresse oxidativo, dada pela variação simultânea do conteúdo renal de HO-1, foi aparente em ratos Nx respirando níveis normais de O_2 , corroborando achados anteriores nesse modelo (41). Em ratos Nx expostos a baixos níveis de O_2 , a abundância renal de HO-1 foi significativamente menor em comparação com ratos Nx que respiravam níveis normais de O_2 . Esses resultados sugerem que ratos submetidos a baixos níveis de O_2 tendem a desenvolver menos estresse oxidativo renal, ajudando a explicar o efeito renoprotetor da hipóxia.

A ativação local da imunidade inata tem sido apontada como um possível mecanismo que leva à inflamação e lesão tecidual na DRC. Mostramos anteriormente que, no modelo Nx, a ativação paralela da imunidade inata e adaptativa ocorre desde as fases iniciais da doença, ganhando intensidade constante ao longo de várias semanas (42). No modelo de adriamicina, nós observamos uma ativação simultânea similar da imunidade inata e adaptativa (43). Além disso, o tratamento com micofenolato mofetil, um agente antilinfocitário, exerceu um efeito renoprotetor, limitando não apenas a ativação da imunidade adaptativa, mas também a da imunidade inata, enfatizando a estreita interação desses dois braços do sistema imunológico. Mostramos também que o tratamento de ratos Nx com alopurinol inibiu a ativação da via NLRP3/Caspase-1/IL-1 β e atenuou a lesão renal (41). No presente estudo, encontramos aumento da expressão renal dos genes que codificam NLRP3, Caspase-1 e Pro-IL-1 β 60 dias após a ablação, confirmando observações prévias em Nx e em outros modelos de DRC (18, 41-43). Em ratos submetidos a baixa pO_2 , a ativação desses genes não foi alterada em

comparação com ratos mantidos em normóxia, indicando que o efeito renoprotetor da hipóxia não pode ser atribuído a uma ação inibitória sobre o NLRP3 ou sobre qualquer um dos componentes dessa via.

A ativação da cascata do NF- κ B, outra importante via da imunidade inata, tem sido descrita na DRC e em vários modelos experimentais da doença. No modelo Nx, mostramos aumento da expressão da porção p65 nas áreas glomerular e intersticial, e que o tratamento com pirrolidina ditiocarbamato (PDTC), um inibidor da ativação do sistema NF- κ B, preveniu parcialmente o desenvolvimento de glomeruloesclerose e fibrose intersticial (44). Mostramos translocação nuclear do componente p65 em tecido renal também no modelo de sobrecarga de adenina. Como no caso dos ratos Nx, o tratamento com PDTC atenuou fortemente a formação de granulomas intersticiais e a fibrose que caracterizam esse modelo. No presente estudo, a translocação nuclear p65 não foi observada em ratos Sham em baixa pO₂, mas foi evidente em ratos Nx expostos a normóxia, em consonância com a ativação observada da via do NLRP3. No entanto, diferentemente do comportamento do eixo NLRP3/ IL-1 β , que não se alterou em resposta à hipóxia, a exposição de ratos Nx a uma baixa atmosfera de O₂ impediu a translocação de p65. O mecanismo para este efeito não pode ser determinado com base nos dados presentes. Uma possibilidade é que, limitando o estresse oxidativo, como discutido anteriormente, a hipóxia pode ter neutralizado um estímulo importante para a ativação do sistema NF- κ B. Uma explicação adicional poderia ser o efeito marcante da hipóxia na densidade de células positivas para angiotensina-2, uma vez que angiotensina-2 é outro poderoso ativador da cascata do NF- κ B.

O presente estudo, em desacordo com os conceitos atuais, mostra evidências de que a hipóxia exerce um efeito renoprotetor no modelo Nx, ao invés de atuar como um fator de lesão renal. Os mecanismos para esse inesperado efeito benéfico não são claros, e podem envolver inibição de NF- κ B, melhora do estresse oxidativo e limitação da produção de angiotensina-2 pelo tecido renal. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nesse efeito renoprotetor e para encontrar novos alvos terapêuticos na luta contra a progressão da DRC.

6 CONCLUSÕES

1. A hipóxia crônica não inicia lesão renal em ratos normais;
2. Em quadros já instalados de DRC (Nx), a hipóxia crônica não agrava nem acelera a lesão renal, exercendo ação renoprotetora;
3. A hipóxia crônica não ativa a via do NF- κ B nem da imunidade inata em ratos Sham;
4. O mecanismo de efeito renoprotetor da hipóxia em Nx pode envolver inibição de NF- κ B, melhora do estresse oxidativo e limitação da produção de angiotensina-2 pelo tecido renal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nagy J. [The chronic kidney disease "epidemy"]. *Orvosi hetilap*. 2013;154(2):43-51.
2. Kida Y, Duffield JS. Pivotal role of pericytes in kidney fibrosis. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2011;38(7):467-73.
3. Anderson S. Mechanisms of injury in progressive renal disease. *Experimental nephrology*. 1996;4 Suppl 1:34-40.
4. Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney international*. 1991;39(3):550-6.
5. Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH, Amenta PS, Watanabe M, Harper RA, et al. Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *The Journal of cell biology*. 1988;107(4):1359-68.
6. Bohle A, Christ H, Grund KE, Mackensen S. The role of the interstitium of the renal cortex in renal disease. *Contributions to nephrology*. 1979;16:109-14.
7. Yang N, Wu LL, Nikolic-Paterson DJ, Ng YY, Yang WC, Mu W, et al. Local macrophage and myofibroblast proliferation in progressive renal injury in the rat remnant kidney. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1998;13(8):1967-74.
8. Zhang G, Moorhead PJ, el Nahas AM. Myofibroblasts and the progression of experimental glomerulonephritis. *Experimental nephrology*. 1995;3(5):308-18.

9. Floege J, Burns MW, Alpers CE, Yoshimura A, Pritzl P, Gordon K, et al. Glomerular cell proliferation and PDGF expression precede glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Kidney international*. 1992;41(2):297-309.
10. Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R, Noronha IL. Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney international*. 1998;54(5):1510-9.
11. Noronha IL, Fujihara CK, Zatz R. The inflammatory component in progressive renal disease--are interventions possible? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2002;17(3):363-8.
12. Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(11):1819-34.
13. Fulton B, Markham A. Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs*. 1996;51(2):278-98.
14. Kriz W, Hosser H, Hahnel B, Gretz N, Provoost AP. From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1998;13(11):2781-98.
15. Gandhi M, Olson JL, Meyer TW. Contribution of tubular injury to loss of remnant kidney function. *Kidney international*. 1998;54(4):1157-65.
16. Yokozawa T, Zheng PD, Oura H, Koizumi F. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron*. 1986;44(3):230-4.

17. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86(6):973-83.
18. Couser WG. Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(3):381-99.
19. Goncalves GM, Castoldi A, Braga TT, Camara NO. New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries. *Scandinavian journal of immunology*. 2011;73(5):428-35.
20. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Seminars in immunology*. 2004;16(1):3-9.
21. Brenner BM. Nephron adaptation to renal injury or ablation. *The American journal of physiology*. 1985;249(3 Pt 2):F324-37.
22. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2012;379(9811):165-80.
23. Heyman SN, Brezis M, Reubinoff CA, Greenfeld Z, Lechene C, Epstein FH, et al. Acute renal failure with selective medullary injury in the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1988;82(2):401-12.
24. Shoji K, Tanaka T, Nangaku M. Role of hypoxia in progressive chronic kidney disease and implications for therapy. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2014;23(2):161-8.
25. Norman JT, Fine LG. Intrarenal oxygenation in chronic renal failure. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2006;33(10):989-96.
26. Mimura I, Nangaku M. The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nature reviews Nephrology*. 2010;6(11):667-78.

27. Deng A, Arndt MA, Satriano J, Singh P, Rieg T, Thomson S, et al. Renal protection in chronic kidney disease: hypoxia-inducible factor activation vs. angiotensin II blockade. *American journal of physiology Renal physiology*. 2010;299(6):F1365-73.
28. Kang DH, Joly AH, Oh SW, Hugo C, Kerjaschki D, Gordon KL, et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(7):1434-47.
29. Machado FG, Kuriki PS, Fujihara CK, Fanelli C, Arias SC, Malheiros DM, et al. Chronic VEGF blockade worsens glomerular injury in the remnant kidney model. *PloS one*. 2012;7(6):e39580.
30. Shapiro BB, Streja E, Rhee CM, Molnar MZ, Kheifets L, Kovesdy CP, et al. Revisiting the association between altitude and mortality in dialysis patients. *Hemodialysis international International Symposium on Home Hemodialysis*. 2014;18(2):374-83.
31. Hayashida T LX, Hubchak S, et al. . Hypoxia-inducible factor expression is upregulated and accelerates fibrosis in Adriamycin-induced murine glomerulonephropathy. . *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(416A).
32. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*. 1965;2(3):235-54.
33. Hsiao LL, Dangond F, Yoshida T, Hong R, Jensen RV, Misra J, et al. A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiological genomics*. 2001;7(2):97-104.

34. Cui X, Zhou J, Qiu J, Johnson MR, Mrug M. Validation of endogenous internal real-time PCR controls in renal tissues. *American journal of nephrology*. 2009;30(5):413-7.
35. Cheng Z, Liu L, Wang Z, Cai Y, Xu Q, Chen P. Hypoxia Activates Src and Promotes Endocytosis Which Decreases MMP-2 Activity and Aggravates Renal Interstitial Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2).
36. Pruijm M, Milani B, Pivin E, Podhajska A, Vogt B, Stuber M, et al. Reduced cortical oxygenation predicts a progressive decline of renal function in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2018;93(4):932-40.
37. Winkelmayer WC, Hurley MP, Liu J, Brookhart MA. Altitude and the risk of cardiovascular events in incident US dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(6):2411-7.
38. Schiffer TA, Friederich-Persson M. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Kidney Hypoxia in the Development of Diabetic Nephropathy. *Front Physiol*. 2017;8:211.
39. Yang CC, Ma MC, Chien CT, Wu MS, Sun WK, Chen CF. Hypoxic preconditioning attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat kidneys. *J Physiol*. 2007;582(Pt 1):407-19.
40. Chen CF, Tsai SY, Ma MC, Wu MS. Hypoxic preconditioning enhances renal superoxide dismutase levels in rats. *J Physiol*. 2003;552(Pt 2):561-9.
41. Foresto-Neto O, Ávila VF, Arias SCA, Zambom FFF, Rempel LCT, Faustino VD, et al. NLRP3 inflammasome inhibition ameliorates tubulointerstitial injury in the remnant kidney model. *Lab Invest*. 2018;98(6):773-82.
42. Fanelli C, Arias SCA, Machado FG, Okuma JK, Malheiros DMAC, Azevedo H, et al. Innate And Adaptive Immunity are Progressively Activated in

Parallel with Renal Injury in the 5/6 Renal Ablation Model. *Sci Rep.* 2017;7(1):3192.

43. Faustino VD, Arias SCA, Ferreira Ávila V, Foresto-Neto O, Zambom FFF, Machado FG, et al. Simultaneous activation of innate and adaptive immunity participates in the development of renal injury in a model of heavy proteinuria. *Biosci Rep.* 2018;38(4).

44. Fujihara CK, Antunes GR, Mattar AL, Malheiros DM, Vieira JM, Zatz R. Chronic inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(1):F92-9.