FLÁVIA KFOURI

***Papel do p21 e do estresse oxidativo na
resistência renal isquêmica***

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

Área de concentração: Nefrologia
Orientador: Prof. Dr. Luís Yu

**São Paulo
2007**

À minha mãe, pela coragem de transpor o improvável e reescrever a história...

Ao meu pai, por seu amor maiúsculo....

Agradecimentos

À Sandra (minha representante única no culto ecumênico) e aos meus irmãos Daniel, Fernanda, Gabriela, André e Solas (quase irmã), por todo vínculo e carinho.

Aos meus tios Milton e Fléria, pela base recebida em tempos difíceis.

À tia Glades e ao tio Heraldo, por tornarem o sonho da medicina possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Fu, por ter sido fundamental na minha história de amor com a nefrologia.

Ao presidente dos Gigantes B. de NY, Dr Isaac de Castro, pelo companheirismo e ajuda indispensável durante todo esse trabalho.

À Helô, Ana Maria, Humberto e Leonardo, pela enorme paciência e contribuição para realização deste estudo.

Ao Dr. Rui Toledo de Barros, pela seriedade e competência com que conduz o curso de pós-graduação da Nefrologia.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Seguro e a toda equipe do LTM 12 pelo apoio irrestrito.

À Eloá, Nira e minha queridíssima Fiça, por todo cuidado, carinho e todas as deliciosas "cachorradas".

Ao Prof. Dr. Roberto Zats e aos amigos do LTM 16, pela amizade e cordialidade, em especial à Dra. Vanda Jorgetti, um exemplo de ser humano.

Aos meus "amigos da pós": Dani, Zena, Anne, Amanda, Frisinha, Pilenoca, Alexandre, Toinho, Carolzinha, Pininha e Fabiola - que coloriram tudo isso.

À Verinha, por trazer um pedaço do Lenine à São Paulo.

Aos meus amigos de UNGISA, Paulo e Ana, por toda compreensão e amizade.

À minha grande amiga Lili, por estar forte, amiga e presente sempre, sempre e sempre.

Aos meus amigos Carlinha, Sandrinha, Baby, Renata e Rica pelos bons momentos vividos.

Aos amigos presentes mesmo que distantes: Trícia, Fury, Dani, Mosquitinho, Lu e Fronne.

À Déa querida, não por nada, só "pelo (estranho) fato de poder ter sempre estado oculto quando terá sido o óbvio".

Às novas conquistas: Hermanita, Danoca, Ann, Eti, Papá e Erika.

À família dos Trolós, pelo acolhimento e pelo exemplo de amor.

À Rozana, pela ajuda e por toda sua fé na vida.

E aos meus queridos alunos, por todo respeito, carinho e confiança.

Teu nome é Nada.

Um sonhar o Universo

No pensamento do homem.

Diante do eterno, nada.

Hilda Hilst

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Comittee of Medical Journal Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A.L. Freddi, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Maria F.Crestana, Valéria Vilhena. 2ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *Listo f Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

SUMÁRIO	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE GRÁFICOS	IV
LISTA DE TABELAS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	9
MÉTODOS	10
ESTUDO IN VIVO	10
MODELO DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO	13
ESTUDOS DE FUNÇÃO RENAL	13
ANÁLISE HISTOLÓGICA	15
IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA ED-1, PCNA E CD3	15
PESQUISA DE APOPTOSE- MÉTODO TUNEL	19
REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA - MÉTODO DA TRANSCRIPTASE REVERSA (RT- PCR)	20
ESTUDO IN VITRO	27
SEPARAÇÃO DE TÚBULOS PROXIMAIS DE RATOS	29
DOSAGEM DE DESIDROGENASE LÁTICA (DHL)	32
DOSAGEM DE HIDROPERÓXIDO- MÉTODO XILENOL ORANGE	32
ANALISE ESTATÍSTICA	35
RESULTADOS	36
ESTUDOS IN VIVO:	36

HISTOLOGIA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E TUNEL	38
ESTUDOS IN VITRO	49
<u>DISCUSSÃO</u>	<u>52</u>
<u>CONCLUSÕES</u>	<u>63</u>
<u>ANEXOS:</u>	<u>64</u>
<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>69</u>

Lista de Figuras

Figura 1- Análise histológica, no dia 4.

Figura 2- Infiltrado de linfócitos T(CD3), no dia 4.

Figura 3- Infiltrado de macrófagos (ED1), no dia 4.

Figura 4- Proliferação celular (PCNA), no dia 4.

Figura 5- Apoptose celular (TUNEL), no dia 4.

Figura 6- Expressão do mRNA dos genes p21,p27 e β 2 microglobulina, no dia 4.

Lista de Gráficos

Gráfico 1– Valores de uréia plasmática nos dias 0, 2 e 4.

Gráfico 2– Contagem medular de linfócitos T (células CD3 positivas), no dia 4.

Gráfico 3– Contagem medular de macrófagos (células ED1 positivas), no dia 4.

Gráfico 4– Contagem de células em proliferação (células PCNA positivas), no dia 4.

Gráfico 5– Contagem de células em apoptose (células TUNEL positivas), no dia 4.

Gráfico 6– Aumento na expressão do mRNA do gene p21, no dia 4.

Gráfico 7– Liberação de DHL dos TP oxigenados dos grupos Controle e Isquemia.

Gráfico 8– Liberação de DHL pelos TP submetidos à hipóxia e reoxigenação dos grupos Controle e Isquemia.

Gráfico 9 – Valores de hidroperóxidos aos 60 min nos grupos Controle e Isquemia.

Lista de Tabelas

Tabela 1- Sequencia dos *primers*, temperatura de anelamento, número de ciclos e volume de cloreto de magnésio utilizado para cada PCR.

Tabela 2– Valores de uréia plasmática (mg/dL) nos dias 0, 2 e 4.

Tabela 3 - Valores de Creatinina (mg/dL) e Clearance de Creatinina (mL/min.100g) e Volume Urinário (mL/min), no dia 4.

Resumo

KFOURI, F. **Papel do p21 e do estresse oxidativo na resistência renal isquêmica.** (Tese Doutorado). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

A resistência tubular renal tem sido estudada a fim de se ampliar a compreensão da fisiopatologia da Insuficiência renal aguda (IRA). A isquemia renal induz à resistência a um subsequente insulto isquêmico sendo que os mecanismos de resistência parecem depender de alterações celulares. O p21 é um inibidor do ciclo celular, o qual pode ser induzido por radicais livres de oxigênio e parece ter um efeito protetor na IRA isquêmica. O objetivo deste estudo é avaliar o papel do p21 e do estresse oxidativo em modelo de resistência adquirida após episódio de IRA isquêmica, e em túbulos proximais isolados após isquemia. Ratos Wistar foram divididos em 3 grupos: **grupo 1**- sham, **grupo 2**- submetido a procedimento sham e após 2 dias submetido à isquemia de 45 min e **grupo 3**- submetido à isquemia de 45 min e após 2 dias submetido à segunda isquemia de 45 min. Os valores de uréia plasmática (114 ± 60 vs. 136 ± 44 mg/dL, n.s.), a creatinina sérica ($0,86 \pm 0,2$ vs. $0,98 \pm 0,1$ mg/dL, n.s.) e o clearance de creatinina ($0,21 \pm 0,1$ vs. $0,24 \pm 0,1$ mL/min/100g, n.s.), avaliados 48 h após o segundo procedimento (Dia 4), foram semelhantes entre os grupos 2 e 3. O tempo de recuperação da IRA também foi semelhante entre os grupos 2 e 3. A histologia mostrou necrose tubular aguda aparentemente de grau semelhante entre os grupos 2 e 3. O infiltrado linfocitário foi semelhante entre os 3 grupos, entretanto houve aumento no infiltrado de macrófagos no grupo 3. Foi observado aumento na proliferação celular no grupo 2 e grupo 3, quando comparados ao grupo 1 (125 ± 28 cél./mm², $p < 0,05$), entretanto, a proliferação foi mais intensa no grupo 2 (1.262 ± 440 cél /mm²) que no grupo 3 (653 ± 300 cél /mm², $p < 0,05$ vs. group 2). O grau de apoptose encontrado foi semelhante entre o grupo 2 e o grupo 3. Houve aumento na expressão do p21 apenas no grupo 3 sendo que esta expressão foi semelhante nos grupos 1 e 2. Foi estudada também a resistência celular em túbulos proximais (TP) isolados de ratos normais (grupo Controle) e ratos submetidos à isquemia de 35 min, 24 h antes do estudo (grupo Isquemia). TP do grupo Isquemia foram susceptíveis à hipóxia, porém, resistentes à lesão de reoxigenação. Além disto, apresentaram menor produção de hidroperóxidos. Portanto, a resistência renal isquêmica aparentemente está associada a mecanismos celulares, o estresse oxidativo e o aumento na expressão do p21 são possíveis mediadores destes mecanismos.

Abstract

KFOURI, F. **Role of p21 and oxidative stress on renal tubular resistance after acute ischemic injury.** (Thesis). São Paulo: University of Sao Paulo School of Medicine, 2007.

Renal tubular resistance has been studied for the understanding of ischemic acute renal failure (ARF). Subsequent ischemic episodes may induce renal resistance whose mechanisms seem to be related to cell alterations. P21 is a cell cycle inhibitor that may be induced by oxygen free radicals and may have a protective effect in ischemic ARF. This study aimed at evaluating the role of oxidative stress and p21 on tubular resistance in isolated renal tubules and in a model of acquired resistance after renal ischemia. Wistar rats were divided into 3 groups: **group 1** – sham; **group 2** – submitted to sham procedure and after 2 days submitted to 45 min ischemia and **group 3** – submitted to ischemia of 45 min followed by a second 45 min ischemia after 2 days. Plasma urea levels (114 ± 60 vs. 136 ± 44 mg/dL), serum creatinine (0.86 ± 0.2 vs. 0.98 ± 0.1 mg/dL) and creatinine clearance (0.21 ± 0.1 vs. 0.24 ± 0.1 mL/min/100g.) evaluated at 48 hours after the second procedure were similar between groups 2 and 3 (all NS). ARF recovery time was also similar between groups 2 and 3. Histology disclosed the same degree of acute tubular necrosis between groups 2 and 3. Lymphocytes infiltrate was similar among all groups whereas macrophages infiltrate was greater in group 3. Enhanced cell proliferation was observed in groups 2 and 3 when compared with group 1 (125 ± 28 cel/mm², $p < 0.05$), however it was greater in group 2 ($1,262 \pm 440$ cel/mm²) than group 3 (653 ± 300 cel/mm², $p < 0.05$ vs. group 2). Degree of apoptosis was similar between groups 2 and 3. The p21 expression was increased only in group 3 whereas it was similar in groups 1 and 2. Cell resistance was also evaluated in isolated renal proximal tubules (PT) from control and ischemia groups. In the latter group, animals were submitted to 35 min ischemia and PT were isolated one day later. PT from the ischemia group were sensitive to hypoxia but resistant to reoxygenation injury which was followed by lower hydroperoxides production. In conclusion, renal resistance obtained by an ischemia was associated with cell mechanisms involving oxidative stress and increased p21 expression as mediators of this protection.

Introdução

A insuficiência renal aguda (IRA) é uma síndrome caracterizada por altas taxas de morbidade e mortalidade. (1) A principal etiologia da IRA é necrose tubular aguda que, em 50% dos casos decorre de isquemia renal prolongada. Infelizmente, as estratégias terapêuticas para o tratamento da IRA resumem-se em medidas preventivas e de suporte, sendo que nenhuma terapêutica até hoje conseguiu diminuir a mortalidade destes pacientes. Isto se deve, pelo menos em parte, a falta de compreensão da fisiopatologia desta síndrome (2).

A diminuição da perfusão renal e da oferta de oxigênio durante a IRA isquêmica leva a alterações vasculares e tubulares. As alterações vasculares decorrem da vasoconstrição pré-glomerular (secundária à ativação do feedback tubuloglomerular), da perda da autorregulação renal, do aumento da atividade simpática, da resposta exacerbada a agentes vasoconstrictores como endotelina, adenosina e angiotensina II e da resposta diminuída a agentes vasodilatadores com acetilcolina, óxido nítrico e bradicinina. Além disso, pela diminuição da oferta de oxigênio existe lesão estrutural das células musculares lisas e principalmente

endoteliais. Células endoteliais lesadas expressam moléculas de adesão como P-selectin, ICAM (*intercellular adhesion molecule-1*) e proteína B7-1 e liberam mediadores inflamatórios como TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), interleucina-18 e radicais livres de oxigênio (RLO) acarretando prejuízo à microcirculação e leucotaxia. O infiltrado inflamatório é responsável pela produção de outros mediadores inflamatórios, amplificando a lesão da microcirculação e conseqüente lesão celular (3-5).

Durante a isquemia, ocorre a perda da integridade do citoesqueleto da célula tubular, migração da bomba NA/KATpase para membrana luminal, destacamento de células viáveis, necróticas e apoptóticas para a luz tubular, levando à obstrução da luz tubular com conseqüente “*backleak*” e prejuízo na reabsorção tubular (3;4). As células tubulares também produzem mediadores inflamatórios como TNF- α , interleucina-6, MCP-1(*monocyte chemoattractant protein-1*), TGF- β (*transforming growth factor- β*) e RLO promovendo ativação de enzimas intracelulares como fosfolipases e ativação de vias necróticas e apoptóticas (6).

Sutton e Molitoris (7) dividiram a IRA isquêmica em 4 fases: instalação, extensão, manutenção e recuperação. Durante a fase de instalação, predominam os efeitos da diminuição da perfusão tecidual e depleção de ATP. Na fase de extensão podem ser encontradas ao mesmo tempo áreas isquêmicas, áreas em recuperação, presença de lesão de reperfusão e processo inflamatório. Na fase de manutenção não

são encontradas regiões com isquemia grave, porém, ocorre aumento do processo inflamatório e fatores relacionados à resposta celular intrínseca, como apoptose; finalmente, a fase de recuperação é caracterizada pela diminuição do processo inflamatório, aumento de fatores de crescimento e regeneração epitelial.

Atualmente, o poder de regeneração tubular, a resistência celular e os mecanismos pelos quais ocorre esta recuperação após isquemia têm sido intensamente estudados, pois a compreensão destes mecanismos poderia auxiliar no entendimento da fisiopatologia da IRA.

Diversos autores descreveram resistência renal adquirida após episódio isquêmico (8-10). Zager e cols. (11;12) demonstraram que ratos submetidos à IRA isquêmica prévia são resistentes à subsequente isquemia realizada no pico da lesão funcional. Estes autores demonstraram também que túbulos proximais isolados de animais submetidos à isquemia prévia são resistentes à hipóxia, sugerindo que fatores celulares são responsáveis por esta resistência, uma vez que neste modelo experimental, fatores extrínsecos como inflamação e alterações hemodinâmicas são excluídos (13).

Dentre os primeiros mediadores estudados na resistência renal isquêmica encontram-se os RLO, os quais são liberados após episódios breves e longos de isquemia. Apesar do seu papel deletério, intensamente estudado, os RLO funcionam estimulando mecanismos de

proteção como a produção de antioxidantes. Existem estudos mostrando que na resistência isquêmica, ocorre aumento na expressão de superóxido dismutase (SOD), glutathione e aumento sérico de vitamina E (14;15).

Outros mediadores possivelmente envolvidos na resistência renal isquêmica são as proteínas de choque de baixo peso molecular (HSP). A expressão destas proteínas se encontra aumentada em animais submetidos à isquemia, e a função das mesmas está relacionada com a estabilidade do citoesqueleto, com a produção celular de glutathione e com a diminuição da apoptose celular (16). A expressão de uma destas proteínas de choque, HSP 32, também conhecida como hemeoxigenase-1(HO-1) encontra-se aumentada em modelos de resistência isquêmica e tem sido estudada devido ao seu papel protetor (17;18).

Os mecanismos pelos quais a HO-1 protege a célula ainda não estão completamente estabelecidos. Em estudo com enxerto renal de ratos, no qual foi induzida a expressão da HO-1 houve aumento na expressão do fator antiapoptótico Bcl-XL, proteína da família Bcl-2. Outro estudo mostra a diminuição da expressão da protease Caspase-3, conhecida via apoptótica, após a indução da HO-1 (18). Outro fator, induzido pela HO-1e relacionado à apoptose, é o p21, um inibidor do ciclo celular (19).

O papel da inflamação na IRA isquêmica é controverso. A importância do infiltrado inflamatório e a participação dos diferentes tipos celulares

tanto na lesão tecidual como no processo de regeneração ainda não estão definidos (6). Alguns estudos sugerem que mais importante do que o infiltrado celular, é a ativação das células tanto endoteliais como inflamatórias, uma vez que lesão tecidual e pior função renal nem sempre se relacionam diretamente com infiltrado celular (20). Certos autores acreditam que os infiltrados de neutrófilos e macrófagos são manifestações inespecíficas de resposta inflamatória, sendo que especificamente os macrófagos podem estar relacionados a processos regenerativos celulares. Entretanto, o infiltrado de linfócitos T ocorre tardiamente, é mais específico, e relaciona-se com pior evolução da IRA, pois animais *knockouts* CD4/CD8 e deficientes em células T (*nu/nu*) apresentam melhor evolução da IRA (21;22). A participação da inflamação na resistência isquêmica ainda é desconhecida (17;20;23;24).

Na regeneração tubular após a IRA, células remanescentes entram no ciclo celular a fim de se multiplicarem e reconstruir o tecido renal. O ciclo celular é composto por duas fases: interfase e mitose. Para a realização da mitose, a célula deve passar por algumas fases e pontos de transição durante a interfase. Após abandonar o estado quiescente (G0), a célula inicia um período de crescimento e síntese protéica (G1), para então passar para à fase de síntese de DNA (S). A transição entre estas duas fases é o primeiro ponto crítico do ciclo, pois é onde se verifica o preparo celular para a síntese de DNA, afastando-se a possibilidade de dano ao DNA antes de sua duplicação. Após a síntese do DNA e antes da

mitose (M), existe uma fase de transição chamada fase G2, onde ocorre o segundo ponto de regulação do ciclo. Durante todo o ciclo celular ocorre a expressão de diversas moléculas estimuladoras e inibidoras. Algumas dessas moléculas reguladoras são proteínas expressas de forma cíclica ao longo do ciclo e por isso, são chamadas ciclinas, as quais regulam positivamente o ciclo e se encontram sob a forma de dímeros com suas parceiras catalíticas, as quinases dependentes de ciclinas (cdk) (25).

Outra classe de proteínas reguladoras do ciclo celular são os inibidores das ciclinas/cdk. Existem dois grupos distintos de inibidores dos complexos ciclinas/cdk: o grupo Kip (*cdk inhibitory protein*), do qual fazem parte as proteínas p21, p27 e p57 e um grupo que inibe especificamente a ciclinaD/cdk4,6, chamado Ink4(*inhibitor for cdk4*) (25;26).

Reguladores do ciclo celular expressos durante este processo são fundamentais para que a regeneração tecidual seja o mais eficiente possível. Dentre os reguladores do ciclo celular, destaca-se o p21, um inibidor do ciclo que atua entre as fases G1 e S. Este inibidor está sendo amplamente estudado e demonstrou-se seu efeito protetor em diferentes tipos de IRA (27).

Acreditando que a ausência do p21 pudesse facilitar a proliferação celular e, portanto, acelerar a recuperação da IRA, Megyesi e cols. (28) induziram lesão nefrotóxica e isquêmica em camundongos *knockouts* para o gene do p21 (p21^{-/-}). Observaram, paradoxalmente, que sua

ausência acarretou maior proliferação celular, porém com maior mortalidade dos animais e aumento da gravidade da IRA. É possível que após a lesão do DNA por cisplatina, a presença do p21 permita o bloqueio do ciclo celular antes da duplicação do material genético defeituoso. Porém, existem indícios de que esta proteção possa estar relacionada também à inibição de vias apoptóticas como a via das caspases (29;30).

Na IRA isquêmica, um modelo de lesão renal não tóxico para os genes, os mecanismos de proteção do p21 não estão determinados. De alguma forma, o p21 parece ser um fator de sobrevivência celular após a lesão isquêmica e sua ausência leva à IRA mais grave.

Megyesi e cols. (26) demonstraram que células de camundongos p21^{-/-} são mais susceptíveis à lesão induzida pela cisplatina e pela exposição celular ao H₂O₂; assim, a expressão do p21, de alguma maneira correlaciona-se à resistência celular e ao estresse oxidativo.

É possível que o p21 seja um dos mediadores de resistência renal, uma vez que a exposição prévia à cisplatina faz com que o rim desenvolva resistência a uma segunda agressão pelo mesmo agente. Esta proteção correlacionou-se com menor grau de apoptose e provavelmente foi mediada pelo aumento na expressão do p21. Entretanto, ainda não há estudos que tenham pesquisado o p21 como mediador da resistência isquêmica (31).

Alguns estudos têm utilizado drogas que mimetizam o efeito protetor da resistência isquêmica, como o hemin, que estimula a expressão e a atividade da HO-1, a eritropoetina recombinante humana que modula tanto a expressão de HSP como vias apoptóticas ou a geranylgeranylacetona, que estimula a produção de HSP 70 (17;32;33).

Além disso, a resistência isquêmica tem se mostrado promissora em modelos experimentais de transplante. Os estudos sugerem que o tempo de normalização da função renal é menor em rins previamente submetidos a isquemias curtas, provavelmente pelo desenvolvimento de resistência à isquemia fria e quente (34-36).

Portanto, os mecanismos de resistência renal isquêmica ainda não estão completamente esclarecidos. A compreensão destes mecanismos pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias visando à prevenção ou atenuação da IRA.

Objetivos

Este estudo tem como objetivo avaliar o papel do estresse oxidativo e do p21 em modelo de resistência adquirida após isquemia renal, e em túbulos renais, isolados após isquemia.

Métodos

Foram utilizados ratos machos *Wistar sp.*, com peso inicial entre 160 e 230g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Estudo in vivo

Grupo 1: Os ratos foram sham-operados, após 48 h realizado outro procedimento sham e após 2 dias foram realizados os estudos.

Grupo 2: Os animais foram sham-operados e após 48 h submetidos à isquemia de 45 min; após 2 dias foram realizados os estudos.

Grupo 3: Os ratos foram submetidos à isquemia de 45 min e após 48 h à outra isquemia de 45 min; após 2 dias foram realizados os estudos.

Durante todo o estudo os animais foram mantidos “*ad libitum*” em gaiola metabólica com livre acesso à água e dieta normal em sal e proteínas (Nuvilab- Nuvital-Curitiba, PR, Brasil).

Organograma do estudo *in vivo*

Modelo de isquemia/reperfusão

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico intraperitoneal (50 mg/kg, IP) e submetidos à laparotomia. As artérias renais foram isoladas, clampeadas e após 45 min, os clamps foram retirados observando-se a reperfusão renal bilateralmente.

Modelo de procedimento Sham

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, IP), submetidos à laparotomia e dissecação dos pedículos renais, porém os rins não foram submetidos à isquemia.

Estudos de função renal

Para avaliação funcional foi realizada dosagem de uréia plasmática no início do estudo (Dia 0), 48 h após o primeiro procedimento (Dia 2) e 48 h após o segundo procedimento (Dia 4). No dia 4, foi realizada também dosagem de creatinina sérica e clearance de creatinina.

Foi realizada dosagem de uréia plasmática nos dias 0, 2, 4, 7 e 10 em um subgrupo de animais dos grupos 2 (n=4) e 3 (n=4). As amostras de sangue utilizadas foram coletadas pela veia caudal dos animais e as

medidas de uréia plasmática foram realizadas utilizando-se o método enzimático- colorimétrico da uréase (kit Labtest Diagnóstica, cat.27, ref. 260104).

Para a realização do clearance de creatinina (ClCr), os animais foram mantidos em gaiola metabólica com livre acesso à água, sem acesso à ração, e foi coletada urina por 24 horas. Imediatamente após o término da coleta de urina, os animais foram sacrificados e foram coletadas amostras de sangue para dosagem de creatinina.

O clearance de creatinina foi calculado segundo a fórmula:

$$\text{Clearance de creatinina} = UCr \times V / SCr,$$

UCr -creatinina urinária (mg/dL), *V* - volume urinário (mL/min), *SCr* - creatinina plasmática (mg/dL).

A dosagem plasmática e urinária de creatinina foi realizada pelo método colorimétrico (kit Labtest Diagnóstica, cat.35).

A leitura das dosagens de uréia e creatinina foram realizadas utilizando-se o espectrofotômetro de chama, modelo 143 da Instrumentation Laboratory, Inc, EUA.

Análise Histológica

Ao final do protocolo experimental, os animais foram anestesiados utilizando-se pentobarbital sódico (50 mg/kg, IP) para a retirada dos rins.

O tecido retirado foi fixado com solução de Dubosque Brasil por 45 min, pós-fixado em formalina a 10% e embebido em parafina. A partir dos cortes em parafina foram preparadas lâminas para imuno-histoquímica, TUNEL (deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphohate Nick-end) e realizada coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (NIKON), em 25 campos (40 X ∞ /0,17 WD 0,65), sem que o patologista soubesse quais eram os grupos.

Imuno-histoquímica para ED-1, PCNA e CD3 (37-39).

Desparafinização

As lâminas foram imersas em xilol por 30 min em estufa a 60°C, seguido por 2 baterias de xilol em temperatura ambiente, de 5 min cada uma. A seguir, as lâminas foram mergulhadas em álcool absoluto 2 vezes por 1 min e em seguida em álcool 95%, 3 vezes por 1 min. Após esta etapa, as lâminas foram hidratadas em água corrente e destiladas por 5 min.

Os anticorpos primários utilizados neste estudo foram:

1) Anticorpo monoclonal IgG-mouse anti rat CD68, clone ED1 (Cedarlane, cód.MCA341R) para pesquisa de macrófagos/ monócitos.

2) Anticorpo monoclonal IgG-anti proliferating cell nuclear antigen (PCNA), clone PC10 (Dako, cod M0879) para pesquisa de células em proliferação.

3) Anticorpo monoclonal IgG-anti CD3, clone F7.2.38 (Dako, cod M7254) para pesquisa de linfócitos T.

Pesquisa de antígeno ED-1

O tecido desparafinado foi submetido à exposição antigênica por tratamento enzimático com 25 mg de tripsina (Sigma Chemical, CO, St Louis, EUA), diluída em PBS (salina tamponada com fosfato, 0,01M), pH 7,4, durante 20 min a 37°C. A seguir, as lâminas foram lavadas com água destilada, mergulhadas em tampão PBS e em 2 banhos de 10 min com peróxido de hidrogênio 3% (H₂O₂ 3%), para o bloqueio da peroxidase endógena. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente, destilada e tampão PBS e incubadas com anticorpo monoclonal primário anti-ED1 diluído em solução de PBS e BSA1% (albumina de soro bovino) em concentração de 1:1600, *overnight* a 4°C. Em seguida, o material foi lavado em PBS e incubado com anticorpo secundário Envision peroxidase (DAKO, Envision System, HRP, cód.1491) por 30 min em temperatura

ambiente e novamente submetido a 3 lavagens em PBS.

Para revelação foi utilizado cromógeno DAB (3,3' Diaminobenzidine, Sigma Chemical, CO, St Louis, EUA, cód D 5637) (60 mg) diluído em tampão PBS (100 mL) e H₂O₂ 3% (1 mL). As lâminas permaneceram nesta solução por 5 min e em seguida foram lavadas em água corrente e destilada.

Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Carazzi por 90 segundos, lavados em água corrente e destilada, desidratados e montados em lamínula com permount.

Pesquisa de PCNA

As lâminas, imersas em tampão ácido cítrico (0,01M, pH 6,0), foram colocadas, em microondas, potência máxima (700 W), por 18 min para a recuperação antigênica. A seguir, foram lavadas com água destilada e mergulhadas em tampão PBS. Após a lavagem, os cortes foram submetidos a 2 banhos de 10 min com H₂O₂ 3%, para o bloqueio da peroxidase endógena. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e em seguida foi realizado bloqueio com leite em pó a 6% (solução de leite Molico 6g e PBS 100 mL) por 30 min. A seguir, os cortes foram lavados com tampão PBS e incubados com anticorpo monoclonal primário anti-PCNA diluído em solução de PBS e BSA1% (albumina de soro bovino) em concentração de 1:1300, *overnight*

a 4°C. Em seguida, o material foi lavado em PBS e incubado com anticorpo secundário Envision peroxidase por 30 min em temperatura ambiente e novamente submetido a 3 lavagens em PBS. Para revelação foi utilizado cromógeno DAB (60 mg) diluído em tampão PBS (100 mL) e H₂O₂ 3% (1 mL). As lâminas permaneceram nesta solução por 5 min, sendo em seguida lavadas em água corrente e destilada.

Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Carazzi por 90 segundos, lavados em água corrente e destilada, desidratados e montados em lamínula com permount.

Pesquisa de antígeno CD3

Os cortes, em tampão Tris 10 mmol/L/EDTA 1 mmol/L, pH 9,0, foram colocados em *steamer* por 40 min, para a recuperação antigênica. Após esta etapa, foram lavados com água destilada e mergulhados em PBS (0,01 M, pH 7,4) para em seguida ser realizado bloqueio da peroxidase endógena, colocando-se as lâminas em 2 banhos de 10 min com H₂O₂ 3%. As lâminas foram então lavadas em água corrente e destilada e em seguida foi realizado bloqueio com leite em pó a 6% por 30 min. A seguir, realizaram-se 3 lavagens com tampão PBS e incubação com anticorpo monoclonal primário anti-CD3 diluído em solução de PBS e BSA 1% (albumina de soro bovino) em concentração de 1:30, *overnight* a 4°C.

O material foi então lavado em PBS e incubado com anticorpo secundário Envision peroxidase, por 30 min em temperatura ambiente, sendo novamente submetido a 3 lavagens em PBS.

Para revelação foi utilizado cromógeno DAB (60 mg) diluído em tampão PBS (100 mL) e H_2O_2 3% (1 mL). As lâminas permaneceram nesta solução por 5 min, sendo em seguida lavadas em água corrente e destilada.

Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Carazzi por 90 segundos, lavados em água corrente e destilada, desidratados e montados em lamínula com permount.

Pesquisa de apoptose- método TUNEL (40)

Para pesquisa de apoptose foi utilizada técnica de TUNEL. Cortes de parafina após serem submetidos ao protocolo de desidratação e reidratação foram lavados em PBS, pH=7,4, e tratados com proteinase k (20 μ g/mL - Sigma Chemical, cód P6556) por 15 min em temperatura ambiente. Após esta etapa, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 3% por 30 min. As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt enzyme 1:12 reaction buffer) durante 1 h a 37°C. Em seguida, os cortes foram incubados com anti-digoxigeninconjugate (Apop Tag®Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, cod. S7101, Chemicon International,

Temecula, CA, USA) por 30 min em temperatura ambiente. As lâminas foram então reveladas com cromógeno DAB (60mg) diluído em tampão PBS (100 mL) e H₂O₂ 3% (1 mL). As lâminas permaneceram nesta solução por 6 min e em seguida foram lavadas em água corrente e destilada. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Carazzi por 90 segundos, lavados em água corrente e destilada, desidratados e montados em lâmina com permount.

Reação da polimerase em cadeia - método da transcriptase reversa (RT-PCR) (41)

Todas as soluções utilizadas para a extração de RNA foram feitas com água purificada pelo sistema Mili-Q (Milipore, Mili-Q Element A10 System, Massachusetts, EUA) e tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) a 60°C *overnight*. Antes da utilização a água tratada com DEPC foi autoclavada a 121°C por 20 min.

O fragmento renal congelado foi retirado do freezer (– 80°C), pesado (100 mg) e colocado em tubo Falcon de 50 mL, ao qual foi acrescentado 1,0 mL de solução de extração (Trizol Reagente, Invitrogen, cód15596026) e homogeneizado com dispersador de tecidos (IKA-Labortechnik Ultra-Turrax, modelo T25, Alemanha).

O homogenato foi transferido para um tubo Eppendorf de 2,0 mL, acrescentou-se 200 μ L de solução contendo clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e álcool isoamílico (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA), na proporção de 24:1. Foi realizada homogeneização por 10 segundos em vórtex e incubação em temperatura ambiente por 3 min. Depois deste período, o tecido homogeneizado foi centrifugado a 12.000g por 15 min em centrífuga refrigerada a 4°C (Eppendorf, modelo 5403). Após a centrifugação, a fase aquosa sobrenadante, que contém o RNA, foi cuidadosamente transferida para outro tubo Eppendorf de 2 mL, contendo isopropanol gelado (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) na proporção 1:1 (fase aquosa: isopropanol). Esta solução foi mantida em temperatura ambiente por 10 min e então centrifugada a 12.000g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e, ao sedimento foi adicionado 1 mL de etanol a 70% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Esta solução também foi centrifugada (12.000g, 10 min, 4°C), o sobrenadante desprezado e o sedimento foi ressuspensão com 200 μ L de água DEPC (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA).

A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro (HITACHI U-2000, Pleasanton, EUA), medindo-se a densidade óptica (D.O.) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Foi feito o cálculo da concentração de RNA, expresso em μ g/mL, a partir da absorbância no comprimento de onda 260 nm. A leitura de 1 D.O., nesta absorbância, corresponde a uma solução pura de RNA em fita simples na concentração de 40 μ g/mL. A

leitura no comprimento de onda 280 nm foi utilizada para determinar a contaminação das amostras com proteínas. Foram aceitos valores entre 1,5 e 2,0 baseando-se na razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm.

A integridade das moléculas de RNA foi conferida através de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) em tampão MOPS (morfolino propanosulfonato) 0,2 M (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA), acetato de sódio a 5 mM, EDTA a 0,5 mM (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA), pH 7,0.

Foram consideradas adequadas amostras que apresentaram duas bandas individualizadas referentes às subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal.

Síntese do DNA complementar (cDNA) - reação de transcriptase reversa (RT)

Para a síntese de cDNA, o RNA extraído foi diluído a uma concentração ideal de 0,2 µg/µL e aliquoteado 14 µL desta solução. Adicionou-se 1 µL de oligo dT primer (500 µg/mL) à solução que foi aquecida a 70°C, em termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc, Watertown, MA, EUA) por 5 min e em seguida transferida para o gelo por 5 min. A seguir, foi acrescentado à solução 5 µL de tampão 5 vezes concentrado (Tris-HCl 250 mM, pH = 8,3, KCl 375 mM e MgCl₂ 15 mM), 1,25 µL de dNTPMix (dATP, dGTP, dCTP e dTTP, 10 mM, pH neutro), 1

μL de inibidor de RNase e 1 μL (200 u) da enzima transcriptase reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Vírus). Esta solução foi aquecida a 40°C por 50 min e posteriormente mantida a 70°C durante 15 min para inativação da enzima.

O produto final contendo o conjunto dos cDNAs correspondente ao RNA isolado foi mantido em freezer (-20°C). Para a reação de transcriptase reversa foram utilizados reagentes Promega® (Promega, San Louis, EUA).

Reação da polimerase em cadeia (PCR)

A reação da polimerase em cadeia foi utilizada para a análise semiquantitativa da expressão dos genes p21, p27 e $\beta 2$ microglobulina, sendo este último utilizado como controle uma vez que é um gene expresso constitutivamente.

Cada reação de PCR foi padronizada variando-se o número de ciclos, a temperatura de anelamento e a concentração de cloreto de magnésio (Tabela 1). As condições foram consideradas ideais quando obtivemos bandas únicas analisadas em gel de agarose 1,5%.

Para se realizar a PCR foi alíquotado 1 μL de cDNA e transferido para um tubo Eppendorf de 200 μL , acrescentou-se 2,5 μL de tampão 10 vezes

concentrado (Tris-HCl 20mM em pH 8,0; KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, 50% glicerol, 0,5% tween 20 e 0,5% nonidet-P40); 1,5 µL ou 2,0 µL de cloreto de magnésio 25 mM; 1 µL de dNTPMix 10 mM; 1 µL de cada primer de amplificação (10 µM); 0,5µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e 16 µL de água miliQ.

A solução foi levada ao termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc, Watertown, MA, EUA) para dar seguimento à reação. A programação do termociclador para os diversos RNAm estudados e as seqüências dos primers utilizados estão descritos na Tabela 1.

Depois de completada a reação os produtos da PCR foram armazenados em freezer (-20°C).

Para a reação de PCR foram utilizados reagentes Promega® (Promega, San Louis, EUA).

Eletroforese em gel de Agarose 1,5%

Para a visualização dos resultados, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. O gel de corrida foi preparado dissolvendo-se 1,5 g de agarose (Invitrogen, Carlsbad, EUA) em 90 mL de água Mili-Q fervente. Quando a temperatura da solução atingiu 60°C, acrescentou-se 10 mL de tampão TAE (tris-acetato 0,04M e

EDTA 0,001 M, pH 8,0) e 4 μ L de brometo de etídio 10 mg/mL (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA). Esta solução foi colocada em cuba de eletroforese e mantida em temperatura ambiente até a solidificação do gel, quando então se acrescentou tampão de corrida (70 mL de tampão TAE + 700 mL de água Mili-Q), e o pente foi retirado visualizando-se os orifícios para deposição das amostras.

Em cada orifício foram pipetados 15 μ L de solução contendo 6 μ L de “*gel loading buffer*” (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) e 25 μ L de amostra. Em um dos orifícios foi colocado o padrão do DNA formado por fragmentos que variam em 100 pares de bases (DNA ladder 100bp, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA).

A eletroforese foi realizada com voltagem de 3-5 volts/cm² até que as marcas do “*gel loading buffer*” fossem visualizadas na metade do gel. Após a eletroforese, o gel foi retirado da cuba e colocado contra luz UV (transiluminador UVP, EUA) e as bandas fotografadas com filme Polaroid 667 (Polaroid, St Albans, Inglaterra).

A análise semiquantitativa da intensidade óptica foi feita através do software Imagemaster (versão 2.0, Pharmacia biotech, Buckinghamshire, Inglaterra), os valores obtidos para p21 e p27 foram divididos pelos respectivos valores de β 2 microglobulina.

Tabela 1- Sequencia dos *primers*, temperatura de anelamento, número de ciclos e volume de cloreto de magnésio utilizado para cada PCR.

Gene	Seqüência dos primers	T°C anelamento	N° ciclos	MgCl (µl)	Produto
β2 microglobulina	5'-CTCCCCAAATTCAAGTGTA CTCTG-3'	55	25	1,5	249pb
	5'-GAGTGACGTGTTTAACTCTGCAAGC-3'				
p21	5'ATGTCCGATCCTGGTGATGTCCGA-3'	60	35	2,0	499pb
	5'-TCAGGGCTTTCTCTTG CAGAAGAC-3'				
p27	5'GCAGCTTGCCCGAGTTCTAC-3'	60	35	2,0	335pb
	5'-TTCTTGGGCGTCTGCTCCAC-3'				

Estudo in vitro

Ratos machos *Wistar sp.*, com peso inicial entre 160 e 230g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram utilizados para o estudo e separados da seguinte forma:

Grupo Controle: rins de animais normais foram retirados para isolamento dos túbulos proximais.

Grupo Isquemia: os ratos foram submetidos à isquemia renal bilateral de 35 min e após 24 h seus rins foram retirados para isolamento dos túbulos proximais.

Após o isolamento, os túbulos proximais (TP) de ambos os grupos foram estudados da seguinte forma:

TP oxigenados- mantidos sob PO_2 normal por 60 min.

TP H/R- submetidos à hipóxia 15 min e reoxigenação 45 min.

Organograma do estudo *in vitro*

Separação de túbulos proximais de ratos(42)

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, IP) e submetidos à laparotomia. A veia cava posterior e a artéria mesentérica foram ligadas e a aorta cateterizada com tubo de polietileno (PE100). A aorta foi ligada acima das artérias renais e foi realizada incisão na porção distal da veia cava, para dar vazão ao perfusato. Os rins foram perfundidos com 60 mL da solução A (NaCl 112,0 mM, NaHCO₃ 25,0 mM, KCl 5,0 mM, CaCl₂ 1,6 mM, NaH₂PO₄ 2,0 mM, MgSO₄ 1,2 mM, glicose 5,0 mM, Hepes 2,5 mM manitol 10 mM, glutamina 1,0 mM, ácido butírico 1,0 mM e lactato de sódio 1,0 mM, pH 7,2) heparinizada com 4000 UI de heparina sódica e oxigenada com mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (1L/min). Em seguida, os rins foram perfundidos com 60 mL da solução A acrescida de 15 mg de collagenase tipo V (Sigma Chemical Co., USA) e 15 mg de hialuronidase (Sigma Chemical Co., USA) para digestão *in vivo* do tecido.

A seguir, os rins foram removidos e descapsulados, a córtex renal retirada e cortada em fragmentos de 1 mm. Os fragmentos foram lavados 3 vezes em solução A, através da centrifugação a 1000g por 40 segundos a 4°C.

Após a lavagem, o tecido foi incubado em 60 mL de solução A oxigenada contendo 40 mg de collagenase tipo V e 10 mg de hialuronidase II, para segunda etapa da digestão. A digestão foi

executada a 37°C sob agitação (75 oscilações/min) e ocorreu no máximo em 35 min, sendo que após 15 min iniciou-se a retirada dos fragmentos digeridos, repetindo-se este procedimento em intervalos de 5 min. A suspensão de túbulos foi mantida oxigenada em mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (1L/min) durante toda a digestão.

Os fragmentos digeridos foram colocados em 30 mL de solução A oxigenada contendo 1 g de albumina sem ácidos graxos (Sigma Chemical Co, EUA), pH 7,2, para neutralização da colagenase; posteriormente, a suspensão de túbulos foi filtrada em peneira plástica e lavada 2 vezes em solução A, através da centrifugação a 1000g por 40 segundos a 4°C, para remoção da albumina.

A seguir, o tecido foi suspenso em 30 mL de solução de percoll 45%, colocado sobre 5 mL de solução de percoll a 100% e centrifugado a 15000g por 10 min a 4°C em ultracentrífuga (Hitachi, Japão). As soluções utilizadas para o gradiente de percoll foram:

1. Solução diluente de percoll (mM): NaCl 1085, NaHCO₃ 119, KCl 50, NaH₂PO₄ 20, MgSO₄ 1,2, glicose 50, Hepes 100.
2. Solução B: 45 mL de água destilada e 5 mL da solução diluente de percoll, oxigenada com carbogênio, pH 7,2.
3. Solução de percoll a 100%: 45 mL de percoll e 5 mL da solução diluente de percoll, oxigenada com carbogênio pH 7,2.

4. Solução de percoll a 45%: 33 mL da solução B e 27 mL da solução de percoll a 100%.

Ao final, ocorreu a formação de uma monocamada de túbulos na interface entre a solução de percoll a 100% (abaixo) e 45% (acima). Esta camada era constituída principalmente de túbulos proximais (95%), conferidos através de microscopia óptica (400x).

Esta monocamada foi removida através de pipeta plástica e lavada 2 vezes com solução A para remoção do percoll. A seguir, os túbulos isolados foram suspensos em 60 mL da solução C oxigenada (NaCl 106 mM, NaCO₃ 18 mM, KCl 5 mM, CaCl 1 mM, NaH₂PO₄ 2 mM, MgSO₄ 1mM, glicose 5 mM, Hepes 2,5 mM, glutamina 2mM, ácido butírico 10 mM e lactato de sódio 4 mM, pH7,2).

A suspensão de túbulos foi separada em alíquotas de 6 mL para o início do protocolo de hipóxia/reoxigenação.

Modelo de hipóxia/reoxigenação. (42)

Os túbulos proximais isolados foram submetidos à hipóxia através da infusão de uma mistura gasosa contendo 95% de N₂ e 5% de CO₂ (3L/min) por 5 min e mantidos em hipóxia por mais 10 min. A seguir foram reoxigenados por 5 min com mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂ (L/min) e mantidos por 40 min.

Dosagem de Desidrogenase Láctica (DHL)

A lesão celular foi avaliada pela liberação de DHL. Conforme descrito por Bermeyer(43), alíquotas de 1 mL de suspensão de túbulos foram retiradas no início do experimento, após 15 min e após 60 min. Estas foram centrifugadas a 1500g por 2 min, a 4°C. Após esta etapa o sobrenadante foi retirado e o sedimento foi lisado com 1 mL de Triton X-100 a 1,5%.

A atividade de DHL foi obtida dividindo-se o valor do sobrenadante pelo valor total (sobrenadante + sedimento), para se obter o percentual de DHL liberado.

Dosagem de hidroperóxido- Método Xilenol Orange (44)

A técnica consiste na mensuração da produção de hidroperóxidos, como via final da peroxidação lipídica de membranas. Os hidroperóxidos são produzidos através de reação de oxidação do Fe⁺⁺ em condições

ácidas. O Fe^{+++} produzido modifica a coloração do Xilenol Orange. Alíquotas de 1 mL de suspensão de TP foram retiradas aos 60 min e sonicadas no Thornton T₇ (Thornton – INPEC eletrônica Ltda., São Paulo-Brasil), durante um minuto. Alíquotas de 100 μL foram colhidas, adicionadas a 900 μL da solução Xilenol Orange e mantidas em temperatura ambiente por 15 min para completar a reação. A leitura colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro (Hitachi U-6000) em 560 nm. O resultado da absorbância foi corrigido pela constante de dissociação do hidroperóxido e do butil hidroperóxido $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e pelo valor da proteína do sedimento.

Solução Xilenol Orange: O ácido sulfúrico (H_2SO_4) 25 mM foi diluído em metanol a 90%. A esta solução foram adicionados: 100 μM de Xilenol Orange (Sigma Chemical CO., St. Louis - USA), 4 mM de hidroxitolueno butilado (BHT, Sigma Chemical CO., St. Louis - USA), agente antioxidante que estabiliza a reação e 250 μM de Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), substrato da reação.

Dosagem de proteína (44)

Soluções:

Solução A - bicarbonato de sódio a 2%, 0,4% de hidróxido de sódio, 1 mL de sulfato de Cobre a 1% e 1 mL de solução tartarato de sódio potássio a 2% em 100 mL.

Solução B - reagente de fenol (Folin) 2N diluído 1:1 em água destilada.

Reação:

A 100 μ L da amostra acrescentou-se 100 μ L de solução de Lauril Sulfato de Sódio (SDS) a 1%, 1 mL da solução A e incubou-se esta mistura por 10 min. A seguir, acrescentou-se 100 μ L da solução B e incubou-se novamente por mais 30 min. Ao final, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Hitachi U2000) em 550 nm.

Análise Estatística

Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de distância K-S para a determinação da normalidade.

Os dados paramétricos foram representados na forma de média e desvio padrão da amostra.

Os grupos foram comparados entre si, através do teste T de Student para amostras independentes. Quando mais que duas amostras foram analisadas, utilizou-se Análise de Variância para medidas não-repetidas (ANOVA), com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

A interação entre os diferentes grupos e tempos foi comparada através do teste de ANOVA two-way, com pós-teste de Student-Newman-Keuls.

Resultados

Estudos in vivo:

No dia 2, a uréia plasmática foi significativamente maior no grupo 3 quando comparado aos grupos 1 e 2 ($p < 0,05$ vs grupos 1 e 2), porém, os valores de uréia no dia 4 foram semelhantes entre os grupos 2 e 3 (Tabela 2). Assim como a uréia, os valores de creatinina sérica e do clearance de creatinina também foram semelhantes entre os grupos 2 e 3, no dia 4 (Tabela 3).

A análise longitudinal mostrou que não houve incremento estatisticamente significativo na uréia plasmática dos animais do grupo 3 quando comparados os valores encontrados nos dias 2 e 4 (103 ± 40 vs 136 ± 44 mg/dL, n.s.) (Tabela 2 e Gráfico 1).

Não houve diferença na uréia plasmática dos animais dos grupos 2 e 3 no dia 7 (82 ± 25 vs 83 ± 20 mg/dL, n.s.) e dia 10 (53 ± 11 vs 54 ± 11 mg/dL, n.s.).

Tabela 2 - Valores de uréia plasmática (mg/dL) nos dias 0, 2, e 4.

	GRUPO 1 (n=7)	GRUPO 2 (n=7)	GRUPO 3 (n=8)
Dia 0	35±6	45±12	44 ±12
Dia 2	36±7	46±15	103±40† ^a
Dia 4	33±11	114±60* ^b	136±44† ^b

Valores descritos em média e desvio padrão

* p<0,05 vs dias 0 e 2; † p<0,05 vs dia 0

^a p<0,05 vs grupo 1 e grupo 2; ^b p<0,05 vs grupo 1

Tabela 3 - Valores de creatinina (mg/dL) e clearance de creatinina (mL/min100g) e volume urinário (mL/min) no dia 4.

	GRUPO 1 (n=7)	GRUPO 2 (n=7)	GRUPO 3 (n=8)
SCr	0,45±0,1	0,86±0,2 ^a	0,98±0,1 ^a
Cl Cr/100g	0,55±0,3	0,21±0,1 ^a	0,24±0,1 ^a
Volume urinário	0,008±0,003	0,007±0,003	0,012±0,005

Valores descritos em média e desvio padrão

^a p<0,05 vs grupo 1

Gráfico1– Valores de uréia plasmática nos dias 0, 2 e 4.

Histologia, Imuno-histoquímica e TUNEL

Os rins dos animais do grupo 1 mostraram-se normais à microscopia óptica, enquanto os animais do grupo 2 e do grupo 3 apresentaram necrose tubular aguda, sendo que no grupo 3 foram encontradas regiões com aglomerados de células em regeneração (Figura 1).

O infiltrado de linfócitos foi semelhante entre os 3 grupos ($7,3 \pm 2,8$ vs $13,4 \pm 9,2$ vs $8,6 \pm 3,7$ cél/mm², n.s.) (Figura 2 e Gráfico 2). O infiltrado de macrófagos foi maior no grupo 3 ($23,5 \pm 11,6$ cél/mm², p<0,05) quando

comparado ao grupo 1 ($6,02 \pm 1,9$ cél/mm²) e grupo 2 ($10,42 \pm 9,8$ cél/mm²) (Figura 3 e Gráfico 3).

A proliferação celular foi maior nos grupos 2 e 3 em comparação ao grupo 1 ($125,5 \pm 27,8$ cél/mm², $p < 0,05$), porém, esta foi mais intensa no grupo 2 ($1.262,4 \pm 440,9$ cél/mm²) que no grupo 3 ($653,4 \pm 300,1$ cél/mm²) ($p < 0,05$ vs grupo 2) (Figura 4 e Gráfico 4).

O grau de apoptose foi semelhante entre os grupos 2 e 3 ($13 \pm 2,7$ vs 15 ± 10 cél/mm²), porém menor no grupo 1 ($2,5 \pm 1,2$ cél/mm², $p < 0,05$) (Figura 5 e Gráfico 5).

Figura1- **Grupo 1 (A)**-Rim histologicamente normal. **Grupo 2 (B)**-Necrose tubular aguda. Túbulos acentuadamente dilatados, com debris celulares nas luzes. Não se vêem mais as bordas em escova, os núcleos variam de tamanho, alguns exibindo cariólise. Os nucléolos são evidentes e os citoplasmas reduzidos de volume em função da descamação. **Grupo 3 (C)**- Necrose tubular aguda com nódulos regenerativos. As alterações descritas para o Grupo 2 também se aplicam a este, mas acrescidas de aglomerados de células epiteliais, dispostas desorganizadamente, com núcleos pleomórficos de padrão regenerativo, na região central à direita.

Figura2- Semelhante infiltrado linfocitário entre os grupos 1 (A), 2 (B) e 3 (C) (400x).

Figura 3- Presença de maior infiltrado de macrófagos no Grupo 3 (C) (1000x) quando comparado aos grupos 1 (A) (400x) e 2 (B) (400x).

Gráfico 2– Contagem medular de linfócitos T (células CD3 positivas), no dia 4.

Gráfico 3 – Contagem medular de macrófagos (células ED-1 positivas), no dia 4.

Figura 4- Aumento da proliferação celular nos animais do Grupo 2 (B) quando comparados aos grupos 1 (A) e 3 (C). Maior proliferação celular no Grupo 3 (C) quando comparado ao Grupo 1(A) (400

Figura 5-Grau de apoptose semelhante entre os grupos 2 (B) e 3 (C), maior do que a apoptose encontrada no grupo 1 (A) (1000x).

Gráfico 4 – Contagem de células tubulares em proliferação (PCNA), no dia 4.

Gráfico 5 – Contagem total de células apoptóticas (TUNEL positivas), no dia 4.

Expressão mRNA -p21

Encontrou-se aumento significativo na expressão do mRNA do p21 no grupo 3, enquanto, os grupos 1 e 2 foram semelhantes entre si (Gráfico 6 e Figura 6).

Não houve diferença na expressão do p27 entre os grupos. (Figura 6)

Gráfico 6 – Aumento da expressão do mRNA do gene p21 no grupo 3.

Figura 6 – Expressão do mRNA dos genes p21, p27 e β2 microglobulina, no dia 4.

Estudos in vitro

A liberação de DHL (%) dos TP oxigenados dos grupos Controle e Isquemia foi semelhante no início do estudo; porém aos 15 min e aos 60 min, a liberação de DHL no grupo Isquemia foi menor do que no grupo Controle ($7,8 \pm 1,7$ vs $11,7 \pm 2,8\%$, $p < 0,05$) e ($10,9 \pm 3,1$ vs $18,8 \pm 4,1\%$, $p < 0,05$) (gráfico 7) respectivamente.

Não houve diferença na liberação de DHL durante a hipóxia (15 min) nos TP dos grupos Controle e Isquemia ($34,1 \pm 10,7$ vs $44,6 \pm 10,9\%$, n.s.) enquanto que após a reoxigenação, houve liberação de DHL significativamente menor no grupo Isquemia ($40,3 \pm 8,9$ vs $55,4 \pm 9,7\%$, $p < 0,05$) (Gráfico 8).

Gráfico 7 – Liberação de DHL dos TP oxigenados dos grupos Controle e Isquemia.

Gráfico 8 – Liberação de DHL dos TP submetidos à hipóxia e reoxigenação dos grupos Controle e Isquemia.

Os TP do grupo Isquemia, submetidos à hipóxia e reoxigenação, apresentaram produção significativamente menor de hidroperóxidos quando comparados ao grupo Controle ($1,01 \pm 0,38$ vs $2,67 \pm 0,34$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína, $p < 0,05$) (gráfico 10).

Gráfico 9 – Valores de hidroperóxidos aos 60 min nos grupos Controle e Isquemia.

Discussão

Após isquemia, mecanismos de lesão e de regeneração são invariavelmente desencadeados, pois a sinalização intracelular para ambos está relacionada e, assim, lesão e regeneração são partes de uma mesma resposta.

No presente estudo, os ratos do grupo 3 foram submetidos à segunda isquemia no pico de lesão funcional, com redução importante da função renal. No entanto, o segundo episódio isquêmico não acarretou piora na função renal. A creatinina sérica, o clearance de creatinina e o grau de apoptose no grupo 3 não foram diferentes dos resultados obtidos no grupo 2, demonstrando-se, portanto resistência renal após episódio de IRA isquêmica. Além disso, a evolução da IRA nos grupos 2 e 3 foi semelhante. Apesar de ter sido submetido a dois episódios isquêmicos, o grupo 3 não apresentou retardo na recuperação da função renal, fato este demonstrado pelos níveis semelhantes de uréia nos dias 7 e 10.

A resistência renal pode ser observada mesmo que no momento da segunda isquemia, os animais estejam no ápice da lesão funcional. Zager e cols. (11) realizaram em ratos, isquemia de 40 min, seguida após 48 h de outra isquemia de 40 min. A avaliação funcional foi realizada através de clearance de iothalamato e, embora os animais já iniciassem a

segunda isquemia com clearance menor, foi observada resistência à isquemia. No entanto, as condições em que ocorre a resistência renal isquêmica ainda permanecem desconhecidas. Cochrane e cols. (45) relataram que ratos submetidos a 3 ciclos isquêmicos de 2 min, seguidos de isquemia de 45 min, apresentavam proteção quando comparados àqueles submetidos à isquemia sem pré-condicionamento prévio. Este benefício não foi obtido quando a isquemia foi realizada após 3 ciclos isquêmicos de 5 min cada.

Behrends e cols. (9) realizaram estudos em porcos e não conseguiram demonstrar proteção após 3 ciclos isquêmicos de 10 min, seguidos de isquemia de 60 min. Outro estudo recente, também em porcos, não conseguiu demonstrar resistência em modelo de isquemia em rim único (46).

Existem diversos estudos mostrando uma fase precoce de resistência pós-isquemia obtida minutos ou horas após breves episódios isquêmicos (pré-condicionamento); porém, se este benefício permanece após intervalos maiores de tempo ainda é controverso. Aparentemente, a resistência tardia (após dias ou semanas) é mais bem caracterizada após períodos longos de isquemia prévia (8;47).

Park e cols. (10) demonstraram que camundongos submetidos à isquemia de 30 min e, após 8 dias submetidos a novo insulto de 30 ou 35 min, apresentaram proteção total à segunda agressão. Quando a

isquemia inicial era de 15 min, a proteção obtida era apenas parcial, sugerindo que a proteção é proporcional à lesão inicial.

Há várias hipóteses para se explicar a resistência isquêmica. Provavelmente, os mecanismos envolvidos na proteção precoce e tardia são diferentes (47;48). O óxido nítrico (NO) como mediador da resistência renal isquêmica foi estudado por diversos autores, sendo interessante a participação das diferentes isoformas de NO sintase, NO sintase endotelial (NOS_e) e indutível (NOS_i), neste processo (49;50). Ogawa e cols. (49) aumentaram a proteção renal conferida pelo pré-condicionamento isquêmico após a administração de L-arginina, sugerindo a participação do NO. Outro estudo demonstrou que camundongos *knockout* para NOS_e não apresentam fase precoce de resistência renal isquêmica, sendo que este mesmo resultado foi obtido com o uso de L-NAME, porém, o uso de aminoguanidina (bloqueio específico de NOS_i) não foi capaz de interferir nesta proteção (51;52). Por outro lado, a resistência isquêmica tardia foi estudada tanto em camundongos *knockout* para NOS_e, como em camundongos *knockout* para NOS_i, sendo que apenas aqueles que não expressavam NOS_i perdiam o efeito de resistência tardia (53). Estes estudos sugerem, portanto, que a NOS_e tem papel importante na fisiopatologia da resistência isquêmica precoce, diferentemente da fase tardia de proteção que parece depender da NOS_i.

Após isquemia renal, células endoteliais e do epitélio tubular lesadas liberam substâncias quimiotáticas que promovem a adesão e infiltração de leucócitos. Entretanto, o papel dos diferentes tipos de células inflamatórias na IRA não está estabelecido, existindo grande controvérsia quanto ao tipo de infiltrado proeminente e sua real função (23).

No presente estudo, o infiltrado medular de linfócitos foi semelhante entre os três grupos. Não foi evidenciado aumento do infiltrado de linfócitos nos grupos 2 e 3, porque o momento da avaliação é precoce para se observar este tipo de infiltrado.

Ysebaert e cols. (54) evidenciaram nas primeiras 12h após isquemia em ratos, um aumento significativo da atividade de MPO (mieloperoxidase), sem que houvesse aumento do infiltrado tecidual de neutrófilos ou macrófagos. Após 24 h, ocorreu aumento importante no infiltrado de macrófagos, indicando diapedese e infiltração tecidual clássica. Somente em fase mais tardia (5-10 dias) o infiltrado linfocitário passou a ser proeminente, com diminuição da expressão de macrófagos. Embora os linfócitos sejam proeminentes apenas em fases mais tardias da IRA, existem evidências de sua participação como principal mediador de lesão, segundo a teoria “hit-and-run”. Esta teoria sugere que, em fases iniciais, estas células ativadas se liguem à camada endotelial também ativada, promovendo diminuição do fluxo intravascular e reação

inflamatória sem infiltrar o tecido e, em fases mais tardias, estas células voltam a aderir ao endotélio, com diapedese e infiltração tecidual (23;55).

Existem evidências da participação da inflamação em modelos de resistência renal isquêmica, porém, os trabalhos ainda não são conclusivos. Foi evidenciado por Kaizu e cols. (17) que após indução da expressão de HO-1, animais submetidos à IRA isquêmica apresentaram redução do infiltrado de macrófagos (imuno-histoquímica para ED-1) e da expressão de moléculas de adesão ICAM-1.

Sabe-se que proteínas hepáticas de fase aguda (α_1 glicoproteína ácida e α_1 anti-tripsina) aumentam durante a IRA isquêmica. Daemen e cols. (24) administraram essas proteínas a animais submetidos à isquemia durante a fase de reperfusão e isto ocasionou a diminuição do infiltrado de neutrófilos, da atividade de mieloperoxidase e da expressão de TNF α . Estes autores sugerem que este possa ser um dos mecanismos envolvidos na resistência isquêmica. Por outro lado, em um estudo recente, leucócitos purificados de camundongos submetidos à isquemia de 30 min foram transferidos a camundongos nu/nu (células T-deficientes) os quais, após 7 dias, foram submetidos à isquemia e apresentaram resistência à IRA sendo que esta proteção não se correlacionou com a atividade de MPO (20).

Diferentemente do infiltrado linfocitário, o presente estudo mostrou um maior infiltrado de macrófagos nos animais do grupo 3. Estas células

ainda apresentam papel controverso na IRA isquêmica (56;57). Como neste modelo foi encontrada resistência renal, o maior infiltrado de macrófagos poderia relacionar-se às funções regenerativas destas células.

Persy e cols. (58) demonstraram que camundongos *knockout* para osteopontina apresentavam menor infiltrado de macrófagos durante IRA isquêmica. Isto, porém, não se correlacionou com qualquer benefício funcional nestes animais. Sabe-se que macrófagos ativados são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias, radicais livres de oxigênio e MPO. Por outro lado, tem sido descrita uma importante ação destas células como acceptor de debris necróticos e de células apoptóticas, além de serem responsáveis pela produção de diversos fatores de crescimento promotores de reepitelização, angiogênese e turnover de matrix extracelular, condições fundamentais para regeneração tecidual (59).

Para que a regeneração tecidual ocorra adequadamente, o balanço entre proliferação celular, necrose, apoptose e a coordenação do ciclo celular é fundamental (26). Park e cols. (60), em modelo experimental de IRA isquêmica, demonstraram intensa proliferação celular, principalmente no segmento S3 após 24 a 72 horas do insulto inicial. Posteriormente, foi demonstrada a indução precoce da expressão do p21 após a IRA isquêmica. O estímulo para esta indução pode ser o aumento na

formação de RLO, já que essa associação é descrita em alguns estudos (61;62).

Os mecanismos de proteção do p21 na lesão isquêmica não estão determinados, mas sabe-se que a parada do ciclo celular em seus checkpoints é pré-requisito para que ocorram reparo e regeneração celular após a isquemia e, portanto, a inibição do ciclo celular permite que ocorra regeneração celular antes que a célula se multiplique (25).

Hochegeer e cols. (63) demonstraram o aumento da expressão do p21 após longos períodos de isquemia (30 e 45 min), o mesmo não ocorrendo após períodos curtos de isquemia. Megyesi e cols. (27) descreveram o aumento na expressão do p21 com apenas 30 min após liberação do clamp isquêmico, e esta expressão praticamente desaparece após 48 h da isquemia. No presente estudo, os ratos dos grupos 1 e 2 não apresentaram aumento da expressão do p21, porém no grupo 3 houve um aumento significativo desta expressão, sugerindo seu envolvimento como mediador da resistência renal à isquemia.

Os achados na imuno-histoquímica para PCNA são condizentes com os achados na expressão do p21, pois houve uma menor proliferação celular nos animais do grupo 3 quando comparados ao grupo 2.

Estudos *in vivo* e *in vitro* de camundongos p21^{-/-} demonstraram maior lesão celular, aumento do tamanho dos núcleos celulares, poliploidias e

maior expressão de 14-3-3 σ (inibidor do ciclo celular responsável pelo controle da transição entre as fases G2 e M). A pausa entre as fases G2 e M possivelmente proporciona o retorno da célula para a fase de síntese de DNA, justificando-se a poliploidia encontrada nestes estudos (25;26;64). Além de falhas na coordenação do ciclo celular, diversos estudos correlacionam a ausência do p21 com um maior grau de apoptose (29;30).

Na IRA isquêmica, a produção de mediadores inflamatórios e RLO ativam vias intrínsecas de morte celular, ocasionando necrose e apoptose. As principais vias reguladoras da apoptose na IRA são a família de proteínas BCL-2, via fosfatidil inositol 3' (PI3') e via das MAPKinases (Mitogen Activated Protein Kinases) e sua subfamília de proteínas relacionadas ao estresse (SAPKinases). Nesta última via, na isquemia renal, destacam-se os fatores pró-apoptóticos p38 e jun N-terminal kinase (JNK) e anti-apoptóticos extracelular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 (10;65).

Existem evidências sugerindo que, pelo menos em parte, a resistência renal isquêmica se deva a um menor grau de apoptose. Entretanto, os meios pelos quais isso ocorre ainda não estão definidos. Foi demonstrado que o aumento na expressão de HO-1 está associado à menor apoptose. Outro estudo correlaciona a resistência renal isquêmica à menor ativação da JNK e p38 (10;18). Apesar dos animais do grupo 3

terem sido submetidos a duas isquemias, o grau de apoptose foi semelhante ao encontrado nos ratos do grupo 2. Além disso, os animais do grupo 3 apresentaram aumento na expressão do p21. Shim e cols. (66) demonstraram em estudo *in vitro* que o p21 atua como inibidor da expressão da JNK. Inguaggiato e cols. (19) demonstraram *in vitro* que o aumento da expressão de HO-1 induz à expressão do p21, e aumenta a resistência a estímulos apoptóticos. Portanto, o presente estudo sugere que o menor grau de apoptose encontrado na resistência isquêmica é parcialmente decorrente do aumento na expressão do p21.

O primeiro episódio isquêmico leva à produção de radicais livres de oxigênio, que funcionam como estímulo para produção de p21 (3;61). Durante a segunda isquemia ocorre a produção exacerbada da proteína p21, que possivelmente atua como um mediador da resistência renal. A fisiopatologia desta resistência parece correlacionar-se a fatores intrínsecos celulares, pois o aumento do p21 é responsável pela menor proliferação celular, apoptose e adequada coordenação do ciclo celular. O resultado são túbulos resistentes à lesão de reoxigenação, provavelmente por menor estresse oxidativo.

O próprio procedimento de isolamento tubular acarreta certo grau de lesão celular, expressa em túbulos mantidos sob PO₂ normal (42). O presente estudo demonstrou que TP isolados de rins isquêmicos e controles são semelhantes no início do procedimento, porém, os TP do

grupo isquemia apresentaram menor lesão celular no decorrer do procedimento, caracterizando resistência celular e sugerindo o desenvolvimento de mecanismos de resistência independentes de fatores extracelulares.

Túbulos proximais isolados de ratos submetidos à hipóxia e reoxigenação, caracteristicamente apresentam aumento significativo de liberação de DHL em decorrência da lesão hipóxica, e posterior elevação de DHL em decorrência da lesão causada pela reoxigenação (42). Nossos resultados demonstram que TP isolados de rins submetidos à isquemia prévia são susceptíveis a hipóxia. Apresentam, porém, resistência à reoxigenação, já que não houve aumento na liberação de DHL após a reoxigenação.

Um dos principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lesão de reoxigenação é o estresse oxidativo, decorrente da formação e ação dos radicais livres de oxigênio (3). Neste estudo, demonstrou-se resistência após a reoxigenação e os menores valores de peróxido encontrados nos túbulos do grupo isquemia, sugerem que a proteção contra a lesão da reoxigenação pode ser atribuída, em parte, à menor produção de radicais livres.

Zager e cols. (13) demonstraram que TP isolados de ratos submetidos à isquemia prévia apresentavam menor produção de malondialdeído (MDA), após estímulo com H_2O_2 , quando comparados

com túbulos de ratos normais, sugerindo resistência ao estresse oxidativo.

Os achados do presente estudo sugerem que a resistência encontrada correlacionou-se a mecanismos celulares, sendo o estresse oxidativo e o p21 mediadores envolvidos na resistência tubular à isquemia.

Conclusões

1. Os animais submetidos a duas isquemias (grupo 3) apresentaram resistência isquêmica, demonstrada pelos resultados de uréia, creatinina sérica e clearance de creatinina.
2. A resistência renal isquêmica encontrada no grupo 3, pelo menos em parte, se deve a mecanismos intrínsecos relacionados ao aumento na expressão do p21, sendo este achado condizente com a menor proliferação celular (PCNA) e menor grau de apoptose (TUNEL) encontrado neste grupo.
3. Túbulos proximais isolados de animais submetidos à isquemia foram resistentes ao procedimento de isolamento, fato este demonstrado pela menor liberação de DHL nos TP oxigenados deste grupo.
4. Túbulos proximais isolados de animais submetidos à isquemia foram resistentes à reoxigenação, conforme mostra a menor liberação de DHL aos 60 min nos TP deste grupo. Este achado possivelmente se deve à menor produção de radicais livres, sugerida pela menor produção de hidroperóxidos nestes túbulos.

Anexos:

Anexo1- Dados relativos à função renal dos animais dos Grupos 1, 2 e 3.

Grupo	Uréia plasmática (mg/dL) Dia 0	Uréia plasmática (mg/dL) Dia 2	Uréia plasmática (mg/dL) Dia 4	SCr (mg/dL) Dia 4	UCr (mg/dL) Dia 4	Volume urinário (mL/min)	Peso rato (g)	Cl Cr (mL/min) Dia 4	ClCr/100g (mL/min.100g) Dia 4
Grupo 1									
Rato 1	46,77	39,40	41,60	0,50	54,39	0,006	190,00	0,62	0,32
Rato 2	18,95	40,80	46,80	0,53	25,00	0,009	150,00	0,43	0,28
Rato 3	37,42	23,60	18,90	0,36	32,91	0,012	180,00	1,12	0,62
Rato 4	17,11	40,80	37,40	0,69	63,16	0,007	215,00	0,63	0,29
Rato 5	34,47	31,60	17,10	0,24	109,40	0,004	180,00	1,70	0,94
Rato 6	35,16	42,20	34,50	0,19	52,99	0,008	205,00	2,20	1,00
Rato 7	41,57	33,10	35,20	0,63	45,61	0,010	196,00	0,73	0,37
Média	35,06	35,93	33,07	0,45	54,78	0,008	188,00	1,06	0,55
Desvio Padrão	6,10	6,80	11,12	0,19	27,40	0,003	21,05	0,66	0,31
Grupo 2									
Rato 1	40,00	40,80	72,30	0,79	34,27	0,011	175,00	0,47	0,26
Rato 2	49,60	60,50	41,10	0,63	22,59	0,012	170,00	0,45	0,26
Rato 3	49,40	38,10	124,20	0,71	18,39	0,019	192,00	0,51	0,26
Rato 4	66,00	71,00	176,00	1,00	18,09	0,023	227,00	0,41	0,18
Rato 5	31,60	31,90	176,90	1,29	34,42	0,009	235,00	0,24	0,10
Rato 6	30,10	30,20	48,20	0,68	87,17	0,004	170,00	0,52	0,30
Rato 7	47,40	47,70	159,90	0,94	13,51	0,013	145,00	0,19	0,13
Média	44,87	45,74	114,09	0,86	32,63	0,007	187,71	0,40	0,21
Desvio Padrão	12,34	15,14	59,71	0,23	25,37	0,003	32,69	0,13	0,08
Grupo 3									
Rato 1	47,20	75,80	119,50	1,00	34,30	0,023	177,00	0,78	0,44
Rato 2	55,20	101,40	177,00	0,91	10,68	0,032	166,00	0,38	0,22
Rato 3	34,90	178,10	176,90	1,15	11,22	0,022	155,00	0,21	0,14
Rato 4	35,80	59,70	181,00	0,88	17,17	0,021	155,00	0,41	0,26
Rato 5	45,00	79,90	55,60	0,87	70,53	0,006	216,00	0,49	0,22
Rato 6	67,00	141,00	144,80	1,24	22,51	0,015	175,00	0,27	0,15
Rato 7	30,10	72,90	129,60	1,00	27,17	0,015	155,00	0,43	0,28
Rato 8	37,50	113,90	102,50	0,76	14,19	0,020	160,00	0,38	0,24
Média	43,64	103,0	136,20	0,97	24,78	0,012	168,86	0,37	0,22
Desvio Padrão	12,17	40,68	44,04	0,17	21,04	0,005	22,07	0,10	0,05

Anexo 2- Dados relativos à imuno-histoquímica (CD3, ED1, PCNA e TUNEL) dos animais dos Grupos 1, 2 e 3.

	CD3 (cél./mm ²)	ED1 (cél./mm ²)	PCNA (cél./mm ²)	TUNEL (cél./mm ²)
Grupo 1				
Rato 1	7,64	7,72	3,84	1
Rato 2	9,88	6,28	5,64	4
Rato 3	8,36	6,88	4,36	2
Rato 4	3,32	3,2	6,24	3
Média	7,30	6,02	5,02	2,50
Desvio Padrão	2,8	1,91	0,96	1,18
Grupo 2				
Rato 1	10,92	2	63,32	10
Rato 2	7,08	9,64	69,64	17
Rato 3	22,64	26,88	24,92	11
Rato 4	8,08	9,92	42,92	13
Rato 5	3,52	3,68	51,68	14
Média	13,38	10,43	47,29	13,25
Desvio Padrão	9,21	9,75	16,11	2,17
Grupo 3				
Rato 1	3,72	12,76	18,16	19
Rato 2	7,72	36,4	45,44	30
Rato 3	13,32	34,88	30,4	11
Rato 4	11,28	12,32	17,92	3
Rato 5	7,00	21,12	18,52	14
Média	8,63	23,48	28,07	14,85
Desvio Padrão	3,69	11,61	11,20	9,81

Anexo 3- Dados relativos aos túbulos próximos isolados do Grupo Isquemia, medidas de liberação de DHL (%).

Inicial				
Experiência	TP basais	TP basais	TP basais	TP basais
1	4,8	3,7	4,9	6,3
2	5,7	6,4	4,5	5,2
3	5,2	6,7	8,3	8
4	6,5	7,6	7,8	6,2
5	9,3	7,6	10	10,3
Média	6,30	6,40	7,10	7,20
Desvio Padrão	1,79	1,60	2,34	2,00
15 min.				
	TP oxigenados	TP oxigenados	TP hipóxicos	TP hipóxicos
1	6,3	7,5	36	37,2
2	5,2	7,5	49,9	52,9
3	8	7,8	29,8	33,8
4	6,2	8	45,9	4,7
5	10,3	11	29,1	22,1
Média	7,20	8,36	38,14	30,14
Desvio Padrão	2,00	1,49	9,41	17,98
60 min.				
	TP oxigenados	TP oxigenados	TP reoxigenados	TP reoxigenados
1	9,3	9,1	41,4	39,9
2	13,2	11,6	58,8	60,5
3	7,5	8	33,5	33,4
4	9,7	9,7	49,9	37,1
5	17,5	13,4	27,4	31,6
Média	9,93	9,60	40,40	41,73
Desvio Padrão	4,90	4,49	24,42	24,19

Anexo 4 - Dados relativos aos túbulos proximais isolados do Grupo Controle, medidas de liberação de DHL (%).

Grupo Controle

Inicial				
Experiência	TP basais	TP basais	TP basais	TP basais
1	8,90	8,00	7,80	10,10
2	5,20	6,85	6,32	14,30
3	8,10	8,60	17,50	8,30
4	9,90	9,32	14,00	10,40
5	14,20	12,00	12,90	12,90
Média	9,26	8,95	11,70	11,20
Desvio Padrão	4,78	4,04	6,30	5,05
15 min.				
Experiência	TP oxigenados	TP oxigenados	TP hipóxicos	TP hipóxicos
1	9,50	9,20	49,50	48,90
2	8,30	8,30	52,30	53,40
3	13,80	13,90	31,30	31,30
4	11,00	13,90	51,50	58,50
5	14,90	14,70	37,10	31,80
Média	11,50	12,00	44,34	44,78
Desvio Padrão	6,06	5,59	22,99	21,45
60 min.				
Experiência	TP oxigenados	TP oxigenados	TP reoxigenados	TP reoxigenados
1	14,00	16,16	60,00	60,25
2	13,90	14,50	60,90	64,50
3	21,60	20,20	51,60	51,90
4	17,40	21,80	64,20	61,00
5	23,30	24,90	38,80	41,10
Média	18,04	19,51	55,10	55,75
Desvio Padrão	8,31	8,81	24,28	24,26

Anexo 5 - Dados relativos à dosagem de peróxido ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína) dos túbulos proximais isolados do Grupos Controle e Isquemia, medido aos 60 min.

Grupo Isquemia		
60 min		
Experiência	TP oxigenados	TP reoxigenados
1	0,38	0,43
2	0,44	0,36
3	0,58	0,69
4	0,69	0,67
5	0,89	0,34
Média	0,60	0,50
Desvio Padrão	0,30	0,25
Grupo Isquemia		
60 min		
Experiência	TP reoxigenados	TP reoxigenados
1	0,43	0,59
2	0,53	1,12
3	0,79	1,50
4	1,07	1,03
5	1,47	1,00
Média	0,86	1,01
Desvio Padrão	0,54	0,38
Grupo Controle		
60 min.		
Experiência	TP oxigenados	TP reoxigenados
1	0,86	1,95
2	1,25	2,46
3	1,38	3,51
4	1,81	3,04
5	1,40	2,39
Média	1,80	2,67
Desvio Padrão	0,83	0,33

Referências

- (1) Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* 2002 May;39(5):930-6.
- (2) Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med* 1996 May 30;334(22):1448-60.
- (3) Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003 Aug;14(8):2199-210.
- (4) Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 2004 Jul;114(1):5-14.
- (5) Abuelo JG. Normotensive ischemic acute renal failure. *N Engl J Med* 2007 Aug 23;357(8):797-805.
- (6) Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 2004 Aug;66(2):480-5.
- (7) Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2002 Nov;62(5):1539-49.
- (8) Joo JD, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. Ischemic preconditioning provides both acute and delayed protection against renal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 2006 Nov;17(11):3115-23.
- (9) Behrends M, Walz MK, Kribben A, Neumann T, Helmchen U, Philipp T, et al. No protection of the porcine kidney by ischaemic preconditioning. *Exp Physiol* 2000 Nov;85(6):819-27.
- (10) Park KM, Chen A, Bonventre JV. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, p38, and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment. *J Biol Chem* 2001 Apr 13;276(15):11870-6.

- (11) Zager RA, Baltes LA, Sharma HM, Jurkowitz MS. Responses of the ischemic acute renal failure kidney to additional ischemic events. *Kidney Int* 1984 Nov;26(5):689-700.
- (12) Zager RA, Jurkowitz MS, Merola AJ. Responses of the normal rat kidney to sequential ischemic events. *Am J Physiol* 1985 Jul;249(1 Pt 2):F148-F159.
- (13) Zager RA, Burkhart KM, Gmur DJ. Postischemic proximal tubular resistance to oxidant stress and Ca²⁺ ionophore-induced attack. Implications for reperfusion injury. *Lab Invest* 1995 May;72(5):592-600.
- (14) Chen CF, Tsai SY, Ma MC, Wu MS. Hypoxic preconditioning enhances renal superoxide dismutase levels in rats. *J Physiol* 2003 Oct 15;552(Pt 2):561-9.
- (15) Kadmehdazadeh M, Aryamanesh S, Faghihi M, Zahmatkesh M. Protection of rat renal vitamin E levels by ischemic-preconditioning. *BMC Nephrol* 2004 Apr 28;5:6.
- (16) Kelly KJ. Heat shock (stress response) proteins and renal ischemia/reperfusion injury. *Contrib Nephrol* 2005;148:86-106.
- (17) Kaizu T, Tamaki T, Tanaka M, Uchida Y, Tsuchihashi S, Kawamura A, et al. Preconditioning with tin-protoporphyrin IX attenuates ischemia/reperfusion injury in the rat kidney. *Kidney Int* 2003 Apr;63(4):1393-403.
- (18) Wagner M, Cadet P, Ruf R, Mazzucchelli L, Ferrari P, Redaelli CA. Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts. *Kidney Int* 2003 Apr;63(4):1564-73.
- (19) Inguaggiato P, Gonzalez-Michaca L, Croatt AJ, Haggard JJ, Alam J, Nath KA. Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis. *Kidney Int* 2001 Dec;60(6):2181-91.
- (20) Burne-Taney MJ, Liu M, Baldwin WM, Racusen L, Rabb H. Decreased capacity of immune cells to cause tissue injury mediates kidney ischemic preconditioning. *J Immunol* 2006 Jun 1;176(11):7015-20.
- (21) Rabb H, Daniels F, O'Donnell M, Haq M, Saba SR, Keane W, et al. Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-

reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000 Sep;279(3):F525-F531.

- (22) Burne MJ, Daniels F, El GA, Mauiyyedi S, Colvin RB, O'Donnell MP, et al. Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 2001 Nov;108(9):1283-90.
- (23) Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004 Aug;66(2):486-91.
- (24) Daemen MA, Heemskerk VH, van't VC, Denecker G, Wolfs TG, Vandenabeele P, et al. Functional protection by acute phase proteins alpha(1)-acid glycoprotein and alpha(1)-antitrypsin against ischemia/reperfusion injury by preventing apoptosis and inflammation. *Circulation* 2000 Sep 19;102(12):1420-6.
- (25) Price PM, Megyesi J, Safirstein RL. Cell cycle regulation: repair and regeneration in acute renal failure. *Kidney Int* 2004 Aug;66(2):509-14.
- (26) Megyesi J, Andrade L, Vieira JM, Jr., Safirstein RL, Price PM. Coordination of the cell cycle is an important determinant of the syndrome of acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002 Oct;283(4):F810-F816.
- (27) Megyesi J, Udvarhelyi N, Safirstein RL, Price PM. The p53-independent activation of transcription of p21 WAF1/CIP1/SDI1 after acute renal failure. *Am J Physiol* 1996 Dec;271(6 Pt 2):F1211-F1216.
- (28) Megyesi J, Andrade L, Vieira JM, Jr., Safirstein RL, Price PM. Positive effect of the induction of p21WAF1/CIP1 on the course of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2001 Dec;60(6):2164-72.
- (29) Megyesi J, Safirstein RL, Price PM. Induction of p21WAF1/CIP1/SDI1 in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced acute renal failure. *J Clin Invest* 1998 Feb 15;101(4):777-82.
- (30) Price PM, Safirstein RL, Megyesi J. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004 Feb;286(2):F378-F384.
- (31) Miyaji T, Kato A, Yasuda H, Fujigaki Y, Hishida A. Role of the increase in p21 in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol* 2001 May;12(5):900-8.

- (32) Suzuki S, Maruyama S, Sato W, Morita Y, Sato F, Miki Y, et al. Geranylgeranylacetone ameliorates ischemic acute renal failure via induction of Hsp70. *Kidney Int* 2005 Jun;67(6):2210-20.
- (33) Yang CW, Li C, Jung JY, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, et al. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J* 2003 Sep;17(12):1754-5.
- (34) Fuller TF, Freise CE, Feng S, Niemann CU. Ischemic preconditioning improves rat kidney graft function after severe ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 2005 Jan;37(1):377-8.
- (35) Torras J, Herrero-Fresneda I, Lloberas N, Riera M, Ma CJ, Ma GJ. Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. *Kidney Int* 2002 Jun;61(6):2218-27.
- (36) Lemos FB, Ijzermans JN, Zondervan PE, Peeters AM, van den ES, Mol WM, et al. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2003 Dec;14(12):3278-87.
- (37) Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Adv Exp Med Biol* 1985;186:409-19.
- (38) Waseem NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990 May;96 (Pt 1):121-9.
- (39) Alibaud L, Llobera R, Al ST, March M, Delsol G, Rubin B. A new monoclonal anti-CD3epsilon antibody reactive on paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 2000 Dec;48(12):1609-16.
- (40) Barcaui CB, Goncalves da Silva AM, Sotto MN, Genser B. Stem cell apoptosis in HIV-1 alopecia. *J Cutan Pathol* 2006 Oct;33(10):667-71.
- (41) Vieira JM, Jr., Rodrigues LT, Mantovani E, Delle H, Mattar AL, Malheiros DM, et al. Statin monotherapy attenuates renal injury in a salt-sensitive hypertension model of renal disease. *Nephron Physiol* 2005;101(4):82-91.

- (42) Yu L, Gengaro PE, Niederberger M, Burke TJ, Schrier RW. Nitric oxide: a mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Mar 1;91(5):1691-5.
- (43) Bergmeyer H. *Methods in Enzymatic analysis*. 2nd ed. New York, USA: 1974.
- (44) Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 1991 Oct;26(10):853-6.
- (45) Cochrane J, Williams BT, Banerjee A, Harken AH, Burke TJ, Cairns CB, et al. Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic, and morphologic injury from ischemic acute renal failure in the rat. *Ren Fail* 1999 Mar;21(2):135-45.
- (46) Orvieto MA, Zorn KC, Mendiola FP, Gong EM, Lucioni A, Mikhail AA, et al. Ischemia preconditioning does not confer resilience to warm ischemia in a solitary porcine kidney model. *Urology* 2007 May;69(5):984-7.
- (47) Guo Y, Wu WJ, Qiu Y, Tang XL, Yang Z, Bolli R. Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol* 1998 Oct;275(4 Pt 2):H1375-H1387.
- (48) Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 2000 Nov 24;87(11):972-83.
- (49) Ogawa T, Nussler AK, Tuzuner E, Neuhaus P, Kaminishi M, Mimura Y, et al. Contribution of nitric oxide to the protective effects of ischemic preconditioning in ischemia-reperfused rat kidneys. *J Lab Clin Med* 2001 Jul;138(1):50-8.
- (50) Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT. Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *BJU Int* 2000 Jun;85(9):1007-13.
- (51) Yamashita J, Ogata M, Itoh M, Yamasawa H, Shimeda Y, Takaoka M, et al. Role of nitric oxide in the renal protective effects of ischemic preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003 Sep;42(3):419-27.
- (52) Yamasawa H, Shimizu S, Inoue T, Takaoka M, Matsumura Y. Endothelial nitric oxide contributes to the renal protective effects of ischemic preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 2005 Jan;312(1):153-9.

- (53) Park KM, Byun JY, Kramers C, Kim JI, Huang PL, Bonventre JV. Inducible nitric-oxide synthase is an important contributor to prolonged protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. *J Biol Chem* 2003 Jul 18;278(29):27256-66.
- (54) Ysebaert DK, De Greef KE, Vercauteren SR, Ghielli M, Verpooten GA, Eyskens EJ, et al. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2000 Oct;15(10):1562-74.
- (55) Ysebaert DK, De Greef KE, De BA, Van Rompay AR, Vercauteren S, Persy VP, et al. T cells as mediators in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2004 Aug;66(2):491-6.
- (56) Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kitagawa K, Kobayashi K, Hashimoto H, et al. CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003 Oct;14(10):2503-15.
- (57) Wilson HM, Walbaum D, Rees AJ. Macrophages and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004 May;13(3):285-90.
- (58) Persy VP, Verhulst A, Ysebaert DK, De Greef KE, De Broe ME. Reduced postischemic macrophage infiltration and interstitial fibrosis in osteopontin knockout mice. *Kidney Int* 2003 Feb;63(2):543-53.
- (59) Kluth DC, Erwig LP, Rees AJ. Multiple facets of macrophages in renal injury. *Kidney Int* 2004 Aug;66(2):542-57.
- (60) Park SK, Kang MJ, Kim W, Koh GY. Renal tubule regeneration after ischemic injury is coupled to the up-regulation and activation of cyclins and cyclin dependent kinases. *Kidney Int* 1997 Sep;52(3):706-14.
- (61) Lee YJ, Lee JH, Han HJ. Extracellular adenosine triphosphate protects oxidative stress-induced increase of p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) expression in primary cultured renal proximal tubule cells: role of PI3K and Akt signaling. *J Cell Physiol* 2006 Dec;209(3):802-10.
- (62) Tarry-Adkins JL, Ozanne SE, Norden A, Cherif H, Hales CN. Lower antioxidant capacity and elevated p53 and p21 may be a link between gender disparity in renal telomere shortening, albuminuria, and longevity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006 Feb;290(2):F509-F516.

- (63) Hochegger K, Koppelstaetter C, Tagwerker A, Huber JM, Heining D, Mayer G, et al. p21 and mTERT are novel markers for determining different ischemic time periods in renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007 Feb;292(2):F762-F768.
- (64) Price PM, Megyesi J, Safirstein RL. Cell cycle regulation: repair and regeneration in acute renal failure. *Semin Nephrol* 2003 Sep;23(5):449-59.
- (65) Kaushal GP, Basnakian AG, Shah SV. Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 2004 Aug;66(2):500-6.
- (66) Shim J, Lee H, Park J, Kim H, Choi E. A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases. *Nature* 1996 Jun 27;385(6585):804.