UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENFERMAGEM

MIRIAN WATANABE

INTERVENÇÃO FARMACOLÓGICA NA LESÃO RENAL AGUDA ISQUÊMICA EM RATOS: RESPOSTA FUNCIONAL E HISTOLÓGICA TEMPO DEPENDENTE

SÃO PAULO

2010

MIRIAN WATANABE

INTERVENÇÃO FARMACOLÓGICA NA LESÃO RENAL AGUDA ISQUÊMICA EM RATOS: RESPOSTA FUNCIONAL E HISTOLÓGICA TEMPO DEPENDENTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:
Enfermagem na Saúde do Adulto

Linha de Pesquisa:
Tecnologia na Saúde do Adulto

Orientadora:
Profª Drª Maria de Fátima Fernandes Vattimo

SÃO PAULO

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____

Data:___/___/_____

Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca "Wanda de Aguiar Horta"
Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo

Watanabe, Mirian
Intervenção farmacológica na lesão renal aguda isquêmica em ratos: reposta funcional e histológica tempo dependente / Mirian Watanabe. -- São Paulo, 2010.
89 p.

Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profª. Drª. Maria de Fátima Fernandes Vattimo

1. Isquemia 2. Insuficiência renal 3. Rim - Lesões
I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: MIRIAN WATANABE

Título: INTERVENÇÃO FARMACOLÓGICA NA LESÃO RENAL AGUDA ISQUÊMICA EM RATOS: RESPOSTA FUNCIONAL E HISTOLÓGICA TEMPO DEPENDENTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ /_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

Dedicatória

Aos **RATOS**

"Os verdadeiros heróis

dessa jornada..."

Agradecimentos

À Profª Drª Maria de Fátima Fernandes Vattimo que nesses anos de boa convivência sempre me orientou dividindo suas experiências e conhecimentos. Obrigada pelo apoio e confiança.

À Profª Fernanda T. Borges pela disponibilidade e atenção para concretização desse trabalho. Obrigada pela atenção.

Ao Edson A. Pessoa pela paciência e disponibilidade para realização de várias técnicas de laboratório. Obrigada pela disponibilidade mesmo na correria do dia a dia.

Ao pesquisador Dr Rildo Volpini. Obrigada pela colaboração.

À Neusa Silva pela companhia em todas as manhãs no LEMA. Obrigada pelo carinho.

Às amigas, Carolina, Cassiane, Luciana, Natália que sempre estavam dispostas a ajudar. Obrigada por tudo.

Aos membros do LEMA, Elisabete, Juliana, Gabriela, Sandra e Wanessa.

Às amigas da UTI do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, Cristiane, Kiyomi e Walquíria. Obrigada pelo apoio e compreensão.

A todos colaboradores da UTI do Hospital Alemão Oswaldo Cruz.

Aos meus pais Tadayuki e Kyoko, aos meus irmãos Reinaldo e Cláudia, aos novos membros da minha família Enzo, Lívia e Flávio que sempre compreenderam a minha ausência.

Muito Obrigada.

Watanabe M. Intervenção farmacológica na lesão renal aguda isquêmica em ratos: proteção funcional e histológica tempo dependente [tese]. São Paulo: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2010.

RESUMO

A gravidade da síndrome isquemia/reperfusão determina o prognóstico da lesão renal aguda (LRA). Agentes como o citrato de sildenafil (Sil) e a N-acetilcisteína (NAC) tem demonstrado efeito renoprotetor na LRA isquêmica com resultados ainda inconclusivos. Esse estudo investigou o efeito do Sil e da NAC na LRA com diferentes tempos de isquemia. Foram utilizados grupos de ratos Wistar, adultos e machos: *SHAM; Isquemia 30 min* (clampeamento dos pedículos renais por 30 min)*; Isquemia 30 + Sil* (Sil 0,25 mg/kg 60 min antes da isquemia renal)*; Isquemia 30 + NAC* (NAC 150 mg/kg antes e após a isquemia renal); *Isquemia 45* (clampeamento dos pedículos renais por 45 min)*; Isquemia 45 + Sil e Isquemia 45 + NAC*. Foram avaliadas a função renal (*clearance* de creatinina e fração de excreção de sódio-FENa); a lesão oxidativa (peróxidos urinários; substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS; óxido nítrico - NO e tióis no tecido renal); a síntese protéica da óxido nítrico sintase induzível – iNOS e da heme oxigenase-1 – HO-1 (*western blotting*) e análise histológica renal (área intersticial relativa - AIR e lesão tubulointersticial). Os grupos 30 min tratados com Sil e NAC demonstraram melhora da função renal, redução dos índices oxidantes e NO, ausência de iNOS e presença de HO-1. Nos grupos 45 min, o Sil manteve a função renal, porém demonstrou proteção tubular e oxidante; a NAC não demonstrou efeito protetor em nenhum dos parâmetros avaliados. Quanto à histologia, apenas o Sil induziu redução da AIR e da lesão tubulointersticial nos tempos 30 e 45 min. O estudo confirmou que as características funcionais e histológicas induzidas pelo tempo de isquemia na LRA determinam as respostas às manobras farmacológicas de

prevenção. A expressão HO-1 pode ser considerada um mediador de proteção renal.

Palavras chave: Isquemia/Reperfusão, Lesão Renal Aguda, Lesão Oxidativa.

Watanabe M. Pharmacological intervention in ischemic acute kidney injury in rats: functional and histological time dependent protection [tese]. São Paulo: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2010.

ABSTRACT

Severity of ischemic/reperfusion injury syndrome determines the prognosis of acute kidney injury (AKI). Agents such as sildenafil citrate (Sil) and N-acetylcysteine (NAC) have demonstrated renoprotective effect on ischemic AKI which data is still inconclusive. This study investigated the protective action of Sil and NAC in the AKI with different time of ischemia. Adult, male, Wistar rats were divided: *SHAM, Ischemia 30 min* (renal pedicles clamping for 30 min)*, Ischemia 30 + Sil* (Sil 0,25 mg/kg 60 min before renal ischemia)*, Ischemia 30 + NAC* (NAC 150 mg/kg before and after renal ischemia)*, Ischemia 45 min* (renal pedicles clamping for 45 min)*, Ischemia 45 + Sil, Ischemia 45 + NAC*. Renal function (creatinine clearance and urine sodium fractional excretion - FENa); oxidative injury (urinary peroxides, thiobarbituric acid reactive substances - TBARS, nitric oxide - NO and thiols in renal tissue); expression of inducible nitric oxide synthase - iNOS and heme oxygenase-1 – HO-1 (western blotting) and kidney histological analysis (fractional interstitial area - FIA and tubuleinterstitial injury) were evaluated. Sil and NAC treatment in 30 min renal ischemia induced increase in renal function, decrease in the rate of oxidation and NO levels, iNOS absence and HO-1 expression. In the Ischemia 45 groups, Sil it maintained renal function, however demonstrated tubular and oxidative protection; NAC produced no renoprotective effect on any of the parameters evaluated. Histology studies showed that, only Sil induced reduction in FIA and tubuleinterstitial injury at 30 and 45 min ischemic time. The study confirmed that the functional and histological characteristics induced by time of ischemia determine the renoprotective pharmacological agent action in the AKI. HO-1 expression can be a renal protection mediator.

Key word: Ischemia/Reperfusion, Acute Kidney Injury, Oxidative Injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: *Mecanismo de lesão na I/R renal* 19

Figura 2: *Sistema enzimático HO-1.* 22

Figura 3: *Protocolo experimental* 31

Figura 4: *Quantificação da expressão protéica da iNOS dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010*.....56

Figura 5: *Quantificação da expressão protéica da HO-1 dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 +NAC, São Paulo - 2010*.....57

Figura 6: *Fotos do aspecto macroscópico dos rins submetidos ao mecanismo de I/R após 48 horas.* 58

Figura 7: *Fotos dos cortes histológicos para avaliação da AIR (aumento de 400x).* 61

Figura 8: *Fotos dos cortes histológicos para avaliação da área tubulointersticial (aumento de 200x).* 64

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - *Resultados da função global renal dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010* 45

Tabela 2 - *Resultados de fração de excreção de sódio (FENa) dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010* 47

Tabela 3 – *Resultados de peróxidos urinários dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010* 49

Tabela 4 - *Resultados de tióis no tecido renal dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010* 51

Tabela 5 - *Resultados da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010* 53

Tabela 6 - *Resultados da determinação de óxido nítrico (NO) dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010* 55

Tabela 7 - *Resultados de área intersticial relativa (AIR) no tecido renal dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010* 60

Tabela 8 - *Resultados das alterações tubulointersticial no tecido renal dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo – 2010* 63

LISTA DE ABREVITURAS

AIR	área intersticial relativa
ATP	adenosina trifosfato
BR	bilirrubina
BV	biliverdina
BV/BR	biliverdina/bilirrubina
CO	monóxido de carbono
CrS	creatinina sérica
CrU	creatinina urinária
eNOS	óxido nítrico endotelial
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
FENa	fração de excreção de sódio
FG	filtração glomerular
FOX - 2	método xilenol laranja versão - 2
GC	guanilato ciclase
GERA	Grupo de Estudos em Lesão Renal Aguda
GMPc	monofosfato de guanosina cíclico
GSH	glutationa
GSSG	glutationa oxidada
HO	heme oxigenase
HO-1	heme oxigenase-1
HO-2	heme oxigenase-2
ICAM-1	moléculas de adesão intracelular
IL-1β	interleucina-1β
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
i.p.	intraperitoneal
I/R	isquemia e reperfusão
LEMA	Laboratório Experimental de Modelos Animais
LLC-PK1	células epiteliais renais
LRA	lesão renal aguda

MDA	malondealdeídeo
MPC-1	monócitos quimioatrativos-1
NAC	N-acetilcisteína
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
nNOS	óxido nítrico neural
PDE	fosfodiesterase
PDE-5	fosfodiesterase-5
RFG	ritmo de filtração glomerular
SHAM	controle cirúrgico
SOD	superoxido dismutase
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-γ	fator de necrose tumoral-alfa
TSR	terapias de substituição renal
VCAM	moléculas de adesão vascular
v.o.	via oral

LISTAS DE SÍMBOLOS

α	coeficiente de extinção molar ou absorvidade molar
°C	graus Celsius
g	grama
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
KDa	kilodalton
mA	miliampers
μl	microlitro
μM	micromolar
mg	miligrama
mg/dl	miligrama por decilitro
mg/kg	miligrama por quilograma
ml/min	militro por minuto
mm^2	milimitro quadrado
mM	milimolar
min	minutos
n	número de animais estudados
nm	unidade de medição de comprimento de onda de luz visível
nmol	nanomolar
O_2	oxigênio
$O_2^{\bullet-}$	superoxido
$OH^{\bullet-}$	radical hidroxila
$ONOO^-$	peróxido nitrito
p	nível de significância do resultado estatístico
rpm	rotações por minuto
vs	*versus*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 OBJETIVOS 27
2.1 Geral 27
2.2 Específicos 27
3 MATERIAL E MÉTODOS 28
3.1 Materiais..... 28
3.2 Procedimentos 29
3.3 Métodos. 32
3.4 Local. 40
3.5 Análise estatística. 41
4 RESULTADOS 42
4.1 Função global do grupo SHAM..... 42
4.2 Função renal. 43
4.3 Estresse oxidativo. 48
4.5 Determinação de óxido nítrico. 54
4.6 Síntese protéica de iNOS e HO-1..... 56
4.7 Análise histológica do tecido renal..... 58
5 DISCUSSÃO 65
6 CONCLUSÕES 79
REFERÊNCIAS 80
ANEXOS 89

1 INTRODUÇÃO

As doenças renais representam um grande problema de saúde pública mundial. Crescentes números estão associados à incidência de lesão renal aguda (LRA) em pacientes hospitalizados, portadores de doença renal crônica e doença renal crônica terminal. Segundo censo realizado no ano de 2006 pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, há atualmente 1,96 milhões de pacientes portadores de doença renal crônica que representam 1,87% da população adulta no Brasil[(1)]. O avanço tecnológico, apesar das melhorias na qualidade de vida dos tratamentos crônicos, pouco contribuiu para mudanças dessas cifras.

A LRA é uma das complicações mais frequentes em pacientes hospitalizados. O impacto da LRA na prática clínica é resultante de terapias de suporte de alto custo e maior permanência hospitalar, ressaltando que a severidade da LRA está diretamente relacionada às altas taxas de mortalidade no paciente crítico. Apesar da capacidade de recuperação renal com retorno dos valores de creatinina sérica iguais ou próximo aos níveis basais, o evento LRA pode comprometer a sobrevida em longo prazo, elevando o risco individual para desenvolver doença renal crônica, doença cardiovascular e morte[(2)].

A dificuldade em conter a estatística desfavorável da LRA se deve em parte a ausência de consenso quanto às melhores práticas na vigência da lesão e a indisponibilidade de protocolos de prevenção em pacientes com risco. Por outro lado, uma diversidade de estudos experimentais e clínicos tem divulgado intervenções farmacológicas com antioxidantes, imunossupressores e antiinflamatórios para prevenção ou atenuação da LRA. Contudo, os resultados pouco otimistas ainda não podem ser aplicados

integralmente na prática clínica, principalmente pela dificuldade em se estabelecer ao certo a extensão da lesão. Igualmente, as respostas funcionais e estruturais aos agentes renoprotetores variam em decorrência de características não modificáveis dos pacientes e também da escolha do melhor agente para a lesão vinculada.

O rim é um órgão de grande complexidade com estruturas bem definidas e capacidade de desempenhar várias funções de forma coordenada e perfeito controle de processos interdependentes[3]. A LRA isquêmica envolve mecanismos fisiopatológicos complexos como alterações na hemodinâmica renal, disfunção tubular, lesão de células endoteliais, ativação da resposta inflamatória e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). A hipóxia celular ativa mecanismo de adaptação celular como a indução da óxido nítrico sintase (NOS) e de citoproteção como a atividade da enzima heme oxigenase-1 (HO-1)[3].

A microcirculação renal é organizada segundo suas subdivisões em região cortical, medula externa e medula interna. A microcirculação da região cortical apresenta maiores fluxos sanguíneos e consequentemente, resulta em maior demanda de oxigênio (O_2) para néfrons corticais. À medida que se avança para regiões mais profundas da região medular externa e interna ocorre redução do fluxo sanguíneo renal e concomitantemente se limita a concentração de O_2 para os néfrons justaglomerulares. A microcirculação da região medular, particularmente a medula interna, segue com baixas concentrações de O_2, que aumentam pelo mecanismo contracorrente de difusão O_2 (*shunt*) entre a alça descendente arterial e alça ascendente venosa da *vasa recta* [4].

Sabe-se ainda que os segmentos dos néfrons localizados na região medular apresentam maior susceptibilidade à lesão isquêmica, destacando os segmentos S3 ou *pars recta* do túbulo proximal. Adicionalmente, esses segmentos se caracterizam pelo alto consumo de ATP (adenosina trifosfato) e O_2, necessários para o transporte ativo de solutos e também pela limitada capacidade para o metabolismo anaeróbico de glicólise [4].

Na clínica, a isquemia renal está frequentemente associada à disfunção de múltiplos órgãos e a sepse[5]. Segundo a definição *RIFLE*[*], aproximadamente dois terços dos pacientes evoluem com diagnóstico de LRA em unidades de terapia intensiva e de 4 a 5% desses pacientes recebem suporte de terapias de substituição renal (TSR)[6]. Estudos em modelos animais reproduzem o quadro de LRA isquêmica por meio de um modelo de isquemia/reperfusão (I/R), onde o fluxo sanguíneo renal é interrompido com uso de *clamps* vasculares durante 20 a 60 minutos (min), seguido por um período de reperfusão[7,8].

A persistente hipóxia celular induz a formação de moléculas de adesão que facilitam a interação leucócito-endotélio que ativa mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, eicosanóides e EROs[5,9]. A lesão endotelial consiste no desequilíbrio entre mediadores vasoconstritores como a endotelina, angiotensina II, tromboxane A_2, leucotrieno C_4, adenosina e vasodilatadores como as prostaglandinas E_2 e prostaciclina I_2, e o óxido nítrico (NO)[4,10]. A lesão e disfunção endotelial na LRA isquêmica manifesta-se com congestão na faixa externa da região medular, estase, focos hemorrágicos e presença de infiltrado inflamatório[7]. A lesão endotelial favorece a formação de moléculas de adesão intracelular (ICAM-1), moléculas de adesão vascular (VCAM) e as selectinas P e E que promovem a interação leucócito-endotelial, adesão plaquetária e obstrução mecânica da microvasculatura renal[11,12]. A disfunção endotelial é potencializada com a geração de mediadores inflamatórios pelas células do túbulo renal como "resposta mal adaptativa" à hipóxia. A produção de mediadores inflamatórios inclui citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-γ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1β (IL-1β) e citocinas quimiotáxicas como monócitos quimioatrativos-1 (MPC-1) e interleucina-8 (IL-8) [9,12] **(Figura 1)**.

---

[*] *RIFLE* – Definição e classificação de LRA. (R) risco, (I) *injury* ou lesão, (F) falência, (L) *loss* ou insuficiência, (E) *ESKD – end stage kidney disease* ou doença renal crônica terminal.
ADQI group. Crit Care 2004; 8(4):R204-12.

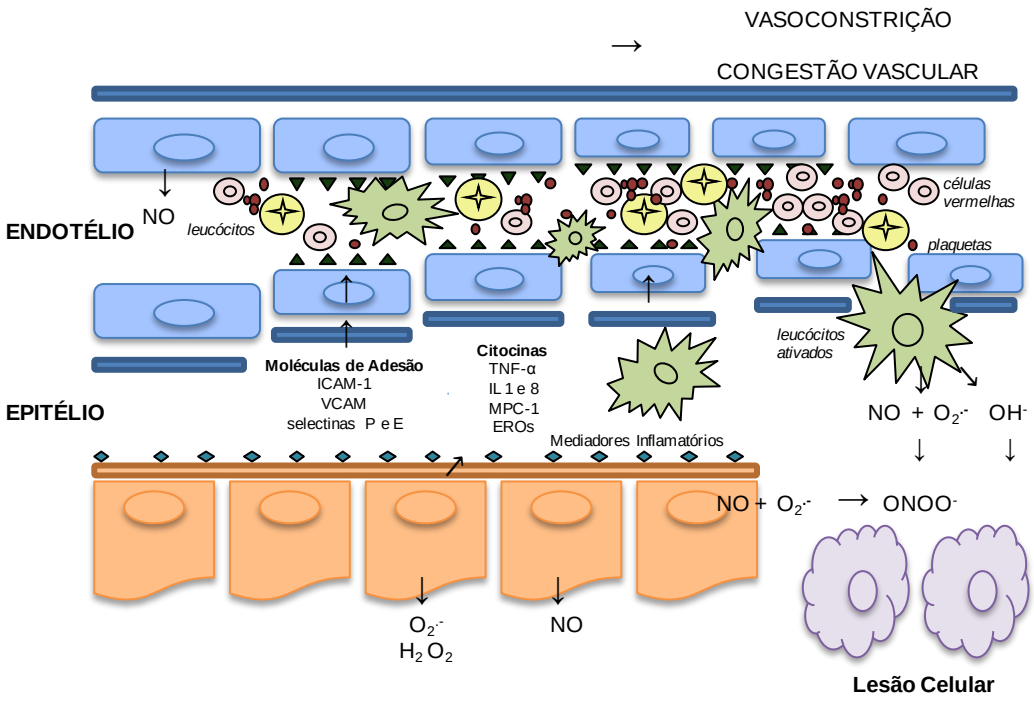

Figura 1: ***Mecanismo de lesão na I/R renal –*** *A ativação das moléculas de adesão no endotélio resulta na integração leucócito-endotelial. Os leucócitos ativos aumentam a geração de EROs (espécies reativas de oxigênio) e mediadores inflamatórios pela células tubulares que facilitam a agregação plaquetária e intensificam a resposta inflamatória. Esses eventos contribuem para a persistente hipóxia da região medular e a progressão da lesão isquêmica*[4,12].

FONTE: Adaptado de Brandy, Clarkson e Liberthal (2002)[4].

As EROs provenientes do mecanismo de reperfusão oxidam as proteínas, os lipídios e o DNA celular. A oxidação de proteínas da cadeia de transporte de elétrons resulta na redução da síntese de ATP, induz a peroxidação lipídica que altera a permeabilidade da membrana e a lesão do DNA interfere na produção de substratos para enzimas antioxidantes[5,9,13]. A reintrodução de O_2 resulta em um aumento significativo na geração do superoxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), aliada à redução da atividade antioxidante como a superoxido dismutase (SOD) ou depleção de substratos como a glutationa (GSH)[13]. O H_2O_2, disponível devido à baixa atividade de enzimas antioxidantes que impossibilitam a sua conversão em água em contato com o ferro livre liberado durante o mecanismo de

isquemia, é responsável pela formação do radical hidroxila ($OH^{\bullet-}$). Essa conversão é classicamente denominada reação de Fenton[13].

Outro importante mediador de lesão no modelo de I/R renal é o NO, potente vasodilatador, é sintetizado pela oxidação do aminoácido L-arginina por diferentes isoformas de NOS caracterizadas como: NOS endotelial (eNOS), NOS neural (nNOS) e NOS induzível (iNOS)[14,15]. A ação vasodilatadora de NO em células da musculatura lisa ocorre via ativação da guanilato ciclase (GC) e aumento nos níveis celulares da monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)[14,15]. A eNOS e a nNOS são responsáveis pela geração de NO em pequenas concentrações por curtos períodos para desempenho de funções fisiológicas. Em contrapartida, a iNOS, na presença de processos inflamatórios ou de citocinas pró-inflamatórias, mantém altas concentrações de NO que resultam em lesão celular[15]. Adicionalmente, o NO pode interagir com o radical $O_2^{\bullet-}$ e formar o peróxido nitrito ($ONOO^-$) que reage com as proteínas e induz a oxidação do grupamento tiol[13]. O NO também pode interagir com o grupo sulfidrila das proteínas, formar o composto S-tiolnitroso, liberar NO durante o processo isquêmico, manter o efeito vasodilatador e mediar várias funções biológicas dependentes ou independentes da GMPc[15,16]. A presença do radical $O_2^{\bullet-}$ em tecidos de órgãos isquêmicos, representada pela reação $O_2^{\bullet-} + NO \rightarrow ONOO^-$, inativa a ação de NO e reduz a biodisponibilidade dessa molécula[15] **(Figura 1)**.

Contudo, o papel de NO é incerto no mecanismo de I/R renal. Estudos *in vivo* demonstram efeitos benéficos com a administração de inibidores de iNOS em modelos de LRA isquêmica em ratos[17], embora outros demonstrem a indução de iNOS e formação de NO como mecanismos de proteção renal[18].

A lesão isquêmica induz desestruturação das proteínas heme, liberando heme-livre, que são partículas tóxicas para as células renais[19,20]. As heme proteínas estão presentes na hemoglobina, mioglobilina, citocromo mitocondrial e microsomal, prostaglandinas sintase, catalase, glutationa peroxidase, GC, NOS, NAPH oxidase, entre outros[19,20]. A formação de

heme livre é uma importante via de lesão isquêmica que induz mecanismos de adaptação e proteção celular com o sistema heme oxigenase (HO)[21,22].

O sistema enzimático HO é responsável pela degradação de heme e formação de quantidades equimolares de monóxido de carbono (CO), ferro e biliverdina (BV) que subsequentemente é convertida a bilirrubina (BR). Esses subprodutos exercem ação vasodilatadora, antioxidante, antiinflamatória e também atuam como moduladores da resposta imune[22,23]. Existem duas isoformas de HO descritas: a HO-1 sendo a forma induzível e a heme oxigenase-2 (HO-2) como a forma constitutiva. Essas enzimas são produtos de diferentes genes e apresentam características moleculares e bioquímicas distintas quanto ao local de expressão e o mecanismo de regulação enzimática[21,22,23]. A expressão da proteína HO-1 acontece na região do córtex e da medula externa renal e a HO-2 é expressa constitutivamente no ramo ascendente espesso da alça de Henle e no túbulo proximal[21]. A HO-2 exerce o papel regulador fisiológico de funções celulares, enquanto a expressão de HO-1 pode ser rápida e fortemente induzida na presença de vários estímulos ou apenas o próprio substrato heme[22,23].

A isoforma HO-1, conhecida também como *heat shock protein* 32 é descrita como um sistema citoprotetor efetivo. O aumento da atividade de HO-1 contribui para maior degradação de heme livre que reduz a ação tóxica desse pró-oxidante[24]. Outro mecanismo de proteção é a geração de biliverdina/bilirrubina (BV/BR) que está associado à ação antioxidante, comprovada por meio de estudo em animais submetidos a I/R renal com redução de biomarcadores de lesão oxidativa[25] e ação direta como sequestradores de EROs[15] **(Figura 2)**.

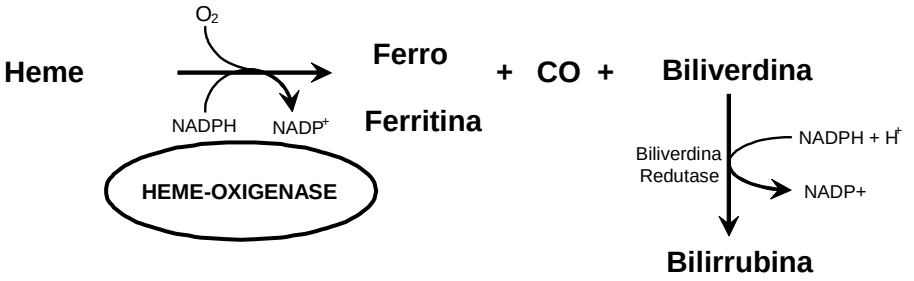

Figura 2: ***Sistema enzimático HO*** *- Abertura do anel heme na presença de NADPH, liberação de ferro, monóxido de carbono (CO) e biliverdina (BV). Subsequentemente, a BV é convertida em bilirrubina sob ação da biliverdina redutase.*

FONTE: Adaptado de Hill-Kapturczak, Chang e Agarwal (2002)[22].

A molécula gasosa CO é um dos mais interessantes subprodutos do metabolismo de heme. A geração de CO pela HO-1 exerce ação protetora e vasodilatadora sobre o endotélio[23]. A HO-1 é responsável pela modulação da expressão e atividade da NOS e limita a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) que aumentam a biodisponibilidade e a ação vasodilatadora de NO[26]. A administração de indutores de HO-1 confirma o aumento na expressão de HO-1 e da eNOS, enquanto reduz a expressão da iNOS[15]. O CO apresenta algumas particularidades que merecem destaque. A liberação desta molécula gasosa HO-1/CO, bem como a sua ação vasodilatadora prolongada são responsáveis pelo restabelecimento da homeostase celular em ambientes isquêmicos[15,27]. A molécula CO e a NO são ativadas por meio da estimulação da GC e elevação dos níveis da GMPc que conferem a proteção vascular por vasodilatação[15].

Estudos *in vitro* ou *in vivo* relacionados à LRA demonstram a atividade da enzima HO por meio da administração de indutores e inibidores químicos. Estudo em modelo animal de LRA associado à rabdomiólise demonstrou proteção funcional com a indução de HO-1 e redução considerável da taxa de mortalidade. A administração do inibidor para HO-1 (tin-protoporfirina) agravou a disfunção e induziu maiores taxas de mortalidade[28]. A indução

de HO-1 promoveu efeito protetor na função renal em modelos animais de rabdomiólise, toxicidade induzida pela cisplatina e na nefrite nefrotóxica[29]. A administração do inibidor da atividade de HO induziu piora da função renal avaliada por meio do aumento nos níveis de creatinina sérica e extensa lesão no epitélio das células tubulares[30].

No Grupo de Estudos em Lesão Renal Aguda (GERA) - EEUSP, a investigação em cultura de células epiteliais renais (LLC-PK1) revelou que a administração do indutor químico de HO-1 elevou a viabilidade celular e reduziu a apoptose[31]. Estudos realizados em modelo de LRA por isquemia[32,33] e a toxicidade pelo sulfato de polimixina B[34] demonstraram efeito protetor funcional renal via mecanismo antioxidante após a administração do indutor de HO-1.

Entretanto, sabe-se que a ativação do sistema HO/BV/BR/CO ocorre tanto em ambientes fisiológicos de homeostasia, como também pode ser exacerbada em modelos patológicos como resposta de retroproteção adicional para o estímulo.

O sistema HO é de interesse nesse estudo pela expressão funcional descrita acima. Entre os agentes farmacológicos, com efeito renoprotetor na LRA isquêmica e provável interface com HO-1 destacam-se o citrato de sildenafil e a N-acetilcisteína (NAC).

O citrato de sildenafil pertence a uma nova classe de drogas vasoativas, na qual o mecanismo de ação ocorre por meio da inibição seletiva da enzima fosfodiesterase tipo-5 (PDE-5). A família das fosfodiesterases (PDEs) desempenha importante papel na modulação de diversos processos fisiológicos e está distribuída em vários tecidos do nosso organismo[35]. O sildenafil induz a expressão de eNOS e iNOS para liberação de NO através da estimulação via GC/GMPc e relaxamento da musculatura lisa[18,36].

O pré-condicionamento com sildenafil em animais submetidos à isquemia renal demonstrou manutenção da função endotelial e ação

vasodilatadora via ação de NO[18]. A LRA isquêmica é caracterizada pela disfunção endotelial, ativação de moléculas de adesão que promovem a interação leucócito-endotelial e ativação da cascata de resposta inflamatória[10,12]. A administração de sildenafil demonstrou menor infiltração de leucócitos no tecido renal após o mecanismo de I/R em ratos[37]. Efeitos benéficos do sildenafil também foram demonstrados em ratos diabéticos com melhora da função renal e da lesão inflamatória no tecido renal[38].

Em resposta a lesão endotelial, as células epiteliais do túbulo renal geram mediadores com potencial inflamatório, destacando-se as citocinas TNF-α e IL-6 que ativam as caspases pró-apoptóticas, e inibem as proteínas antiapoptóticas como a Bcl-2[12]. Estudo experimental com modelo de nefrotoxicidade em ratos induzida por cisplatina com pré-condicionamento com sildenafil demonstrou redução da expressão de proteínas pró-apoptóticas e aumento nos níveis de proteínas antiapoptóticas[39]. Outro efeito pleiotrópico demonstrado pelo sildenafil é a sua ação antioxidante. Estudos em modelos animais com nefropatia diabética descreveram redução na geração de EROs e restabelecimento do equilíbrio redox nas células após o tratamento com sildenafil[38].

Por outro lado, as células possuem mecanismos de proteção antioxidante endógenos como os tióis, substratos compostos que contem grupo sulfidrila, como a GSH. A NAC é uma fonte do grupo sulfidrila e atua como sequestrador de $OH^{\bullet-}$ e H_2O_2 [40]. Estudos experimentais com modelo de nefrotoxicidade induzida por radiocontraste[41] e também em modelo isquêmico[42] do Laboratório Experimental de Modelos Animais (LEMA) EEUSP demonstraram efeito protetor da NAC sobre a função renal e redução dos níveis de peróxidos urinários.

A proteção endotelial da NAC parece estar diretamente relacionada com a sua ação antioxidante e posterior efeito vasodilatador no endotélio determinado por meio do equilíbrio entre a geração de $O_2^{\bullet-}$e NO. A presença de NAC em condições patológicas, como no mecanismo de I/R tecidual, promove a ação protetora antioxidante através da redução dos níveis de

EROs e consequentemente menor formação de $O_2^{\bullet -}$e $ONOO^-$, prevalecendo a ação vasodilatadora de NO[40]. Estudos demonstraram o efeito protetor de NAC na LRA isquêmica, com melhora da função renal e redução dos níveis de infiltração de linfócitos e macrófagos[43], aumento nos níveis de antioxidantes endógenos e redução de marcadores de lesão oxidativa[44].

Em síntese, é fato que os diferentes tempos de isquemia determinam manifestações funcionais e estruturais renais variadas, envolvendo mecanismos de lesão que vão desde o sofrimento celular transitório até a necrose. Todos esses mediados por infiltração de leucócitos, liberação de EROs e ERNs, ativação da cascata de resposta inflamatória e lesão endotelial que comprometem segmentos renais localizados na região medular e expansão gradativa para áreas do córtex renal. A hipótese desse estudo é que pelas características anatômicas e funcionais dos modelos de hipoperfusão renal, estratégias de proteção ou resgate da função renal incorram em respostas diferentes, provavelmente tempo dependentes, em virtude do grau de lesão e eventos fisiopatológicos ativados. Frente a esses dados, o citrato de sildenafil e a NAC serão utilizados como protetores celulares e funcionais na LRA isquêmica nos diferentes tempos de isquemia renal de 30 e 45 min.

A utilização de dois agentes com ações renoprotetoras primárias distintas, um mais vasodilatador e outro prevalecendo a ação antioxidante que culminam em ativação de uma via em comum, o NO, poderá elucidar mecanismos envolvidos na fase de lesão isquêmica determinada pelo tempo.

Muitas intervenções farmacológicas são utilizadas para minimizar ou abolir mecanismos de lesão celular durante a evolução da LRA[7,19,45], no entanto, até o momento, não se sabe ao certo qual é a melhor intervenção nos diferentes cenários descritos em que a hipoperfusão parece ser a causa primária de disfunção renal[19,44].

Estudos experimentais relacionados à identificação de possibilidades farmacoterâpeuticas que possam vir a ser aplicadas na clínica ainda se

justificam pela ausência, até o momento, de medidas que tenham se traduzido em impacto na epidemiologia dessa síndrome. Confirma-se, portanto, a necessidade de novas intervenções que possam reduzir o curso natural da LRA e evitar formas mais graves com suporte de TSR, além de ter papel relevante na sobrevida do paciente crítico com LRA.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- ✓ Caracterizar os estágios de resposta funcional e histológica renal de ratos submetidos ao modelo de I/R renal de 30 e 45 min pré-condicionados com citrato de sildenafil ou NAC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar em grupos de animais submetidos a 30 e a 45 min de isquemia renal e pré-condicionados com citrato de sldenafil ou NAC:
    - A função renal por meio do *clearance* de creatinina e da fração de excreção de sódio (FENa);
    - O perfil oxidativo da lesão renal, liberação de NO, a expressão protéica de iNOS e HO-1;
    - As características histológicas renais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1 Reagentes

A água utilizada em todos os experimentos foi tratada com o sistema Nanopure da Barnsead.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico da marca Sigma- EUA, exceto quando especificado no texto.

3.1.2 Lista de abreviaturas de reagentes e soluções

BCIP	4-bromo-3-cloro fosfato
BHT	2[6] –di-tert-butil-p-cresol
DTNB	5,5'- ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico)
DTPA	dietilenotriamina - N,N,N',N'- pentaacetato
Fe^{2+}	ferro II (ferroso)
Fe^{3+}	ferro III (férrico)
$NaNO_2$	nitrito de sódio
NBT	cloreto de nitrotetrabenzólico
NO_2^-	nitrito
TCA	ácido tricloroacético
TBS	solução salina-trizma
TBST	solução salina-trizma com detergente tween 20
TEMED	N,N,N',N'- tetrametil etileno diamina

3.1.3 Animais

Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA **(Anexo A)**.

Foram utilizados ratos da raça Wistar, machos, adultos, pesando entre 260-310 g. Os animais dos diversos grupos permaneceram com livre acesso à água e alimentos em condições térmicas adequadas, com ciclos alternados de dia e noite.

3.2 PROCEDIMENTOS

3.2.1 Modelo de lesão renal aguda isquêmica

Os animais foram anestesiados com Thiopentax® (Cristália,Brasil) (tiopental sódico: 40-50 mg/kg), intraperitoneal (i.p.) e submetidos à laparotomia. Os animais do grupo isquemia foram submetidos à isquemia renal através do clampeamento bilateral dos pedículos renais durante 30 ou 45 min, utilizando clamps vasculares não traumáticos. Após esse período, os *clamps* foram removidos com o restabelecimento da perfusão renal. Os animais foram avaliados até a recuperação anestésica e devolvidos ao biotério, onde permaneceram em repouso por 24 horas para recuperação do ato cirúrgico.

3.2.1 Administração de citrato de sildenafil

O citrato de sildenafil (Viagra® - Pfizer, Brasil) foi diluído em água, e os animais receberam o pré-tratamento com 0,25 mg/kg, via oral (v.o.) por gavagem, 60 min antes do período de isquemia renal.

3.2.2 Administração de N-acetilcisteína

A NAC utilizada foi a apresentação de via parenteral (Fluimucil® - Zambon, Brasil). Os animais receberam 300 mg/kg, via i.p. divididos em duas doses, 60 min antes do período de isquemia renal e após 10 min do período de reperfusão[46].

3.2.3 Apresentação dos grupos experimentais

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

SHAM - simulação do ato cirúrgico sem clampeamento dos pedículos renais.
Isquemia 30 min - clampeamento dos pedículos renais por 30 min
Isquemia 30 min + Sildenafil
Isquemia 30 min + NAC
Isquemia 45 min - clampeamento dos pedículos renais por 45 min
Isquemia 45 min + Sildenafil
Isquemia 45 min + NAC

3.2.4. Protocolo experimental

Os animais de cada grupo foram submetidos a um procedimento específico e pré-determinado **(Figura 3)**.

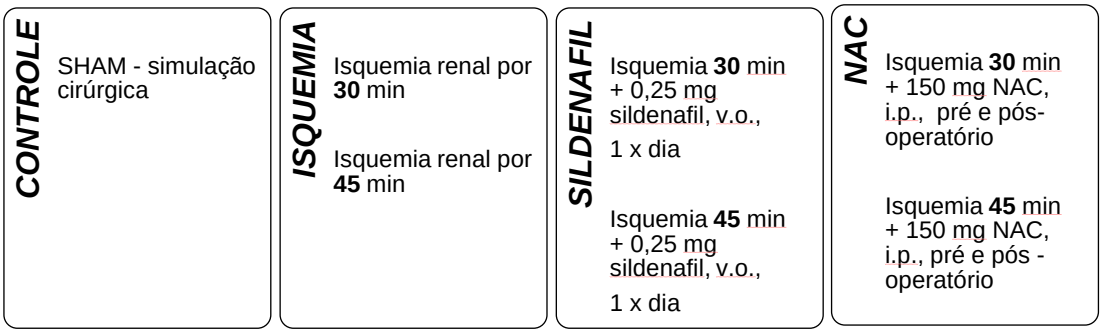

Figura 3: *Protocolo experimental*

3.2.5 Gaiolas metabólicas

Os animais dos diversos grupos, após a recuperação do ato cirúrgico, foram colocados em gaiolas metabólicas para mensuração do volume urinário de 24 horas e coleta de amostra urinária para realização de estudos de função renal e estresse oxidativo.

3.2.6 Coleta de amostra e preparo do tecido renal

Após a retirada das gaiolas metabólicas, os animais foram anestesiados novamente com tiopental sódico 60 mg/kg, i.p. e submetidos à

laparotomia para coleta de sangue por meio da punção da aorta abdominal para estudos de função renal.

O rim direito de cada animal foi retirado, imediatamente resfriado e acondicionado a – 4 ºC para estudos posteriores de mensuração das enzimas antioxidantes e síntese protéica da iNOS e HO-1.

O rim esquerdo foi retirado, imerso em solução de metacarne e resfriado a – 4°C por 24 horas. Após esse período, o tecido renal foi acondicionado em álcool 70%, desidratado e embebido em parafina para cortes histológicos. A coloração do tecido renal foi realizada com hematoxilina - eosina e montagem final das lâminas para posterior análise histológica.

Ao final do experimento, foi realizada a eutanásia do animal, segundo as normas éticas para manuseio de animais em laboratório de pesquisa.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Função Renal

3.3.1.1 *Clearance* de creatinina

A filtração glomerular (FG) foi avaliada por meio da metodologia do *clearance* de creatinina a partir da dosagem das creatininas sérica e urinária. A dosagem de creatinina urinária e plasmática foi determinada por colorimetria pelo método de *Jaffé*[47].

O *clearance* de creatinina foi calculado através da fórmula **(1)**:

$$\boldsymbol{Clearance\ de\ creatinina} = \frac{creatinina\ urinária \times fluxo\ urinário}{creatinina\ sérica} \qquad \textbf{(1)}$$

Os valores do *clearance* de creatinina por 100 gramas foram expressos em ml/min.

3.3.1.2 Fração de excreção de sódio

A fração de excreção de sódio (FENa) foi calculada a partir da mensuração de sódio urinário e sérico através do analisador de eletrólitos 9180 (Roche, Brasil) pelo método eletrodo íon seletivo. Foi utilizado como diluente o Snap Park® (Roche, Brasil) para preparo da solução padrão e solução para mensuração de eletrólitos sérica e urinária. O controle para mensuração das amostras foi realizado com Isetrol® (Roche, Brasil).

A FENa foi calculada por meio da fórmula **(2)**[48]:

$$\boldsymbol{FENa} = \frac{Sódio\ urinário\ \times creatinina\ sérica}{creatinina\ urinária\ \times sódio\ sérico} \times 100 \qquad \textbf{(2)}$$

3.3.2 Estresse Oxidativo

3.3.2.1 Método FOX-2 para peróxidos urinários

O método xilenol laranja versão-2 (FOX-2) consiste na determinação dos níveis de peróxido através de método ferro-xilenol laranja[49,50].

Os peróxidos oxidam o íon Fe^{2+} para íon Fe^{3+} quando diluídos em solução ácida. O xilenol laranja [ácido (o-cresolsulfonaftalina 3', 3''- bis (metilamino) ácido diacético] apresenta alta seletividade para o íon Fe^{3+} produzindo um complexo de coloração azul-arroxeado, representado pela equação **(1)**[50]:

$$Fe^{2+} + ROOH \rightarrow Fe^{3+} + RO + OH^{-} \quad \textbf{(1)}$$

A preparação da solução FOX-2 segue a seguinte sequência: 90 ml de metanol e 10 ml de água bidestilada, 100 µM xilenol laranja, 4 mM BHT (2[6] –di-tert-butil-p-cresol), 25 mM da solução de ácido sulfúrico e 250 µM de sulfato ferroso de amônio - (Vetec Química, Brasil). A resultante da somatória dos reagentes acima consistiu na solução denominada FOX. Na etapa seguinte, 100 µl da amostra urinária foi acrescentada em 900 µl da solução FOX-2. A solução foi homogeneizada e permaneceu em repouso durante 30 min em temperatura ambiente. A leitura foi realizada por espectrofotometria em absorbância de 560 nm (α= 4,3 x 10^4 M^{-1} cm^{-1}), após a retirada de resíduos de proteínas ou outros materiais por meio da centrifugação[50,51].

Os valores foram estabilizados em nmol de peróxidos urinários por grama de creatinina urinária[52,53].

3.4.2.2 Análise de tióis solúveis não-protéicos no tecido renal

A quantificação de tióis seguiu-se com a homogeneização do tecido renal dos animais dos diferentes grupos com 2 ml solução de 10 mM de acetato de sódio, tween-20 a 0,5% e 100 µM DTPA (dietilenotriamina-N,N,N',N'-pentaacetato) em pH 6,5. O homogenato foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min a 4°C para retirada de *debris* teciduais. Uma alíquota foi reservada para imediata mensuração de proteínas totais. A segunda alíquota foi precipitada com ácido tricloroacético (TCA) a 10% (1:1) e novamente centrifugada a 5000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a mensuração de tióis totais.

O volume de 400 µl das amostras precipitadas e diluídas foram homogeneizadas em 200 µl da solução com 1 mM de DTNB (5,5'- ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) e 100 mM de tampão Tris em pH 8,0. Após 10 min em temperatura ambiente, a quantidade de tióis foi determinada pela média da absorbância demonstrada em 412 nm (α= 13,6 x 10^3 M^{-1} cm^{-1})[54].

O equacionamento da mensuração de tióis solúveis foi ajustado para a contagem de proteínas total presentes no tecido renal que exigiu a mensuração de proteínas por meio do uso do Kit (BioRad, EUA) baseado no método Brad-ford, utilizando a albumina sérica bovina como padrão[55].

Todos os valores obtidos foram estabilizados em nmol de tióis por mg de proteína totais[54].

3.3.2.3 Dosagem de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) na urina

A dosagem de TBARS na urina consiste na detecção de aldeídos reativos ao ácido tiobarbitúrico[56]. Na primeira etapa, 0,4ml da amostra de urina foi diluída a 0,6 ml de água destilada com acréscimo de 1,0ml de TCA 17,5% e 1,0ml de ácido tiobarbitúrico 0,6% (pH 2). A solução foi homogeneizada e colocada em água fervente (banho-maria) durante 20 min para reação com ácido tiobarbitúrico.

Na etapa seguinte, a solução foi retirada do banho-maria e resfriada em gelo para a adição de 1,0ml de TCA 70%, homogeneizada e permaneceu em repouso por 20 min em tubo de ensaio ocluído. Após esse período, a solução foi centrifugada durante15 min a 3.000 rpm e a leitura por espectrofotometria foi realizada em absorbância de 534 nm (α= 1,56 x 10^5 M^{-1} cm^{-1})[56,57].

Os valores foram expressos em nmol de TBARS por grama de creatinina urinária.

3.3.3 Determinação de óxido nítrico

A síntese de NO foi avaliada por meio da quantificação de nitrito (NO_2^-), metabólito estável do NO, pelo método de Griess[17,58]. A reação é colorimétrica e se baseia na reação dos nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido (pH entre 2,5 e 5,0) formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea. Cerca de 100 μl da amostra urinária dos diversos grupos foi

adicionada a 100 μl do reagente que permaneceu em repouso por 15 min. A leitura foi realizada em absorbância de 545 nm em leitor de ELISA. A absorbância das amostras foi comparada a uma curva padrão de nitrito de sódio ($NaNO_2$) na concentração de 0,1 a 1,0 μM[58].

O equacionamento da mensuração de NO foi ajustado para valores de creatinina urinária e todos os valores obtidos foram estabilizados em nmol de NO por grama de creatinina urinária[59].

3.3.4 Síntese protéica da iNOS e HO-1 por técnica de *Western blotting*

Preparo da amostra

Os fragmentos do tecido renal foram homogeneizados manualmente com 500 μl da solução RIPA e centrifugados por 10 min a 4ºC, 4 μl do sobrenadante foi retirado e homogeneizado com tampão de denaturação (120 mM tris-HCl; SDS 4%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,1% e 0,72 mM β-mercaptoetanol) para a eletroforese de proteína em gel[60].

Separação das proteínas em gel de acrilamida

A eletroforese em gel é uma técnica de separação de proteínas ao longo do gel em uma única direção, conforme o seu peso molecular durante a aplicação de uma diferença de potencial[61]. A primeira etapa para a separação de proteína consiste no preparo de dois tipos de géis: o gel de separação e o gel de alinhamento. O gel de separação foi preparado da seguinte maneira: 3,38 ml de uma solução de acrilamida 30%; 3,75 ml de Tris-HCL 1M (pH=8,8); 0,2 ml de SDS 10% e água mili-Q até completar 9,9

ml de solução. Em seguida, foram adicionados 50 µl de persulfato de amônia 10% e 10 µl de TEMED (N,N,N',N'- tetrametil etileno diamina). O gel de alinhamento ou empilhador foi preparado com 6,1 ml de água mili-Q; 1,33 ml de solução de acrilamida 30%; 2,5 ml de Tris-HCI 0,5M (pH=6,8); 100 µl de SDS 10%; 50 µl de persulfato de amônia 10% e 10 µl de TEMED. Os géis foram polimerizados em cuba especial para eletroforese vertical, o Mini-Protean II® (BioRad, EUA) e preenchidos com tampão de corrida (1 mM glicina; 1 mM Tris-base pH=8,3 e SDS 0,05%). A amostra preparada foi colocada nos poços do gel de alinhamento e a eletroforese foi realizada com voltagem constante de 100 volts (300 mA), por aproximadamente 60 min para separação das proteínas ao longo do gel[60].

Transferência

A transferência do gel para uma membrana de nitrocelulose é realizada com o objetivo de tornar as proteínas acessíveis à detecção do anticorpo[61]. Após a eletroforese, o gel de separação foi lavado com tampão de transferência gelado (20% metanol, 15,6 mM tris-base e 120 mM glicina, pH 8,1 à 8,4) por 10 min. Em uma bandeja com tampão de transferência foi mergulhada uma placa de transferência com a esponja, o papel filtro, o gel, a membrana de nitrocelulose, novamente o papel filtro e a esponja, finalizando com o fechamento da placa. Este complexo foi mergulhado em uma cuba, contendo tampão de transferência gelado e a transferência foi realizada com voltagem constante de 100 volts. Após 60 min de transferência, o complexo foi desfeito e a membrana foi então lavada com solução salina-trizma com detergente Tween 20 (TBST - 10 mM tris-HCI (pH=7,5), 150 mM NaCL e Tween 20 a 0,1%) para detecção do anticorpo de interesse[60].

Imunodetecção

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas separadas eletronicamente foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS (10 mM Tris-HCL (pH 7,5), 200 e mM NaCl) para bloqueio dos sítios inespecíficos, durante 12 horas. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes em tampão TBST com agitação durante 10 min e incubadas com o anticorpo policlonal anti-iNOS (Santa Cruz, EUA), produzidos em ratos, ou anti-HO-1 (Stressgen, EUA), produzido em coelhos. Os anticorpos foram diluídos 1:1000 vezes e as membranas foram incubadas durante aproximadamente 60 min. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes em solução salina-trizma (TBS) durante 10 min, a seguir foram lavadas novamente três vezes em TBST durante 10 min e incubadas com o anticorpo secundário imunoglobulina G conjugado a fosfatase alcalina anti-rato e anti-coelho (Stressgen, EUA) respectivamente na diluição 1:1000 em TBS e albumina 1%, durante 60 min. Foram realizadas novas lavagens, quando as membranas foram então submetidas aos tampões de revelação NBT/BCIP (cloreto de nitrotetrabenzólico / 4-bromo-3-cloro fosfato indolil) até a visualização das bandas. Após o aparecimento das bandas, a reação foi interrompida com água mili-Q. A massa molecular da iNOS e da HO-1 detectadas foram determinadas por comparação com a migração da proteína padrão (All Blue – BioRad, EUA)[60].

3.3.5 Análise histológica do tecido renal

3.3.5.1 Morfometria: área intersticial relativa

Foram realizados estudos de morfometria para avaliação da expansão da área intersticial relativa (AIR)[56]. As imagens obtidas pela microscopia óptica foram captadas por meio de vídeo-câmera de luz conectada a um

analisador de imagens. Foram analisados 20 campos medindo 0,174 mm^2 de cada animal e avaliada a fração percentual do córtex ocupado pelo interstício. Em seguida foi determinada a porcentagem da área intersticial em relação a cada campo, excluindo-se os glomérulos.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópico óptico Axioskop 40 (Carl Zeiss, Alemanha).

3.3.5.2 Área de lesão tubulointersticial: escala de Shih

A quantificação das alterações tubulointersticiais foi realizada através da escala de Shih. As alterações tubulointersticiais foram definidas como presença de necrose tubular, infiltrado inflamatório, dilatação tubular e atrofia tubular. As quantificações da lesão tubulointersticial foram graduadas na escala de 0 a 4, onde **0** = normal; **0,5** = pequenas áreas focais; **1** = envolvimento de menos de 10% do córtex renal; **2** = envolvimento de menos de 10 a 25% do córtex renal; **3** = envolvimento de 25 a 75% do córtex renal e **4** = envolvimento de mais de 75% do córtex renal[62,63].

3.4 LOCAL

Os experimentos descritos acima foram desenvolvidos no LEMA da EEUSP, coordenado pela Profª Drª Maria de Fátima Fernandes Vattimo e no Laboratório de Biologia Celular da Disciplina de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada a ANOVA para a análise de variância e o teste *post hoc* com *Least Significants Differences* (método Fisher de mínima diferença significativa).

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão. Os valores $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1. FUNÇÃO RENAL GLOBAL DO GRUPO SHAM

Nesse estudo, foram realizados grupos controle piloto para sildenafil, NAC e também para SHAM (controle sem clampeamento dos pedículos renais). Observou-se que os grupos Sildenafil e NAC apresentaram comportamento funcional idêntico ao grupo SHAM. Dessa forma, objetivando a redução do número final de animais empregados no estudo de acordo com as normas para manuseio ético de animais para fins científicos, aceitou-se o grupo SHAM como controle de normalidade para os demais.

4.2. FUNÇÃO RENAL

4.2.1 *Clearance* de creatinina

Conforme demonstrados na **Tabela 1**, os animais dos grupos Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45 e Isquemia 45 + Sildenafil apresentaram variabilidade significante de peso em relação ao grupo SHAM (Isquemia 30 + NAC: 267±6; Isquemia 45: 274±8; Isquemia 45 + Sildenafil: 269±12 *vs* SHAM: 296±7; $p < 0,05$).

A função renal foi mensurada por meio do *clearance* de creatinina. O grupo SHAM apresentou resultados de função renal que foram considerados referência de normalidade (SHAM: 0,97±0,02).

A isquemia renal de 30 e 45 min demonstrou redução significativa nos valores de *clearance* de creatinina em relação ao grupo SHAM (Isquemia 30: 0,12±0,01; Isquemia 45: 0,04±0,01 *vs* SHAM: 0,97±0,02; $p<0,001$).

Apesar da grande diferença entre a função renal dos grupos Isquemia 30 e 45, não se constatou relevância estatística (Isquemia 30: 0,12±0,01; Isquemia 45: 0,04±0,01). Na comparação da creatinina sérica, os animais submetidos à isquemia renal por 45 min apresentaram aumento significativo desse parâmetro quando comparados com o grupo Isquemia 30 (Isquemia 45: 2,9±0,2 *vs* Isquemia 30: 2,1±0,3; $p<0,05$). Outra variável que apresentou significância foi a redução do parâmetro fluxo urinário no grupo Isquemia 45 *versus* Isquemia 30 (Isquemia 45: 0,014±0,002 *vs* Isquemia 30: 0,031±0,03; $p<0,001$).

Observou-se que os grupos Isquemia 30 tratados com sildenafil ou NAC apresentaram melhora da função renal quando comparados com o grupo Isquemia 30 (Isquemia 30 + Sildenafil: 0,55±0,07; Isquemia 30 + NAC: 0,57±0,08 *vs* Isquemia 30: 0,12±0,01; $p<0,001$).

Os grupos Isquemia 30 + Sildenafil e Isquemia 30 + NAC também apresentaram redução dos níveis de creatinina sérica (Isquemia 30 + Sildenafil: 0,8±0,2; Isquemia 30 + NAC: 0,6±0,1 *vs* Isquemia 30: 2,1±0,3; p<0,001), seguida pelo aumento dos valores de creatinina urinária (Isquemia 30 + Sildenafil: 43,5±1,4; Isquemia 30 + NAC: 43,2±4,5 *vs* Isquemia 30: 19,6±2,7; p<0,001) e redução do fluxo urinário (Isquemia 30 + Sildenafil: 0,023±0,001; Isquemia 30 + NAC: 0,022±0,001 *vs* Isquemia 30: 0,031±0,001; p<0,001).

Por outro lado, os tratamentos dos grupos Isquemia 45 mostraram pequenas diferenças entre os valores de *clearance* de creatinina, porém sem significância estatística (Isquemia 45 + Sildenafil: 0,08±0,01; Isquemia 45 + NAC: 0,02±0,01; Isquemia 45: 0,04±0,01). Observou-se uma tendência de redução da função renal quando instituído o tratamento com NAC (Isquemia 45 + NAC: 0,02±0,01; Isquemia 45: 0,04±0,01).

O grupo Isquemia 45 + Sildenafil apresentou redução dos valores de creatinina sérica (Isquemia 45 + Sildenafil: 2,4±0,2 *vs* Isquemia 45: 2,9±0,2; p<0,05), acompanhado pelo aumento do parâmetro fluxo urinário quando comparado com o grupo isquemia 45 (Isquemia 45 + Sildenafil: 0,025±0,004 *vs* Isquemia 45: 0,014±0,002; p<0,001).

Tabela 1 - *Resultados da função global renal dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010*

Grupos	n	Peso (gramas)	Fluxo urinário (ml/min)	CrU (mg/dl)	CrS (mg/dl)	Clcr /100 g (ml/min)
SHAM	7	296±7	0,011±0,001	77,2±7,4	0,3±0,1	0,97±0,02
Isquemia 30	6	292±4	0,031±0,001[a]	19,6±2,7[a]	2,1±0,3[a]	0,12±0,01[a]
Isquemia 30 + Sildenafil	6	293±8	0,023±0,001[ac]	43,5±1,4[ace]	0,8±0,2[ce]	0,55±0,07[ace]
Isquemia 30 + NAC	6	267±6[b]	0,022±0,001[ac]	43,2±4,5[ace]	0,6±0,1[ce]	0,57±0,08[ace]
Isquemia 45	5	274±8[b]	0,014±0,002[c]	14,8±1,3[a]	2,9±0,2[ad]	0,04±0,01[a]
Isquemia 45 + Sildenafil	5	269±12[b]	0,025±0,004[ade]	17,5±1,8[a]	2,4±0,2[af]	0,08±0,01[a]
Isquemia 45 + NAC	5	295±7	0,015±0,002[c]	12,4±1,2[a]	3,9±0,2[ae]	0,02±0,01[a]

Sendo: CrU – creatinina urinária, CrS – creatinina sérica; Clcr - *clearance* de.creatinina.

[a]p < 0,001 *vs* SHAM
[b]p < 0,05 *vs* SHAM
[c]p < 0,001 *vs* Isquemia 30
[d]p < 0,05 *vs* Isquemia 30
[e]p < 0,001 *vs* Isquemia 45
[f]p < 0,05 *vs* Isquemia 45
Os valores representam média ± erro padrão.

4.2.2 Fração de excreção de sódio

A FENa é considerada como um teste informativo da integridade dos túbulos renais em pacientes portadores de LRA, sendo que valores de FENa acima de 1% indicam disfunção tubular[48].

A **Tabela 2** representa os valores da FENa urinária dos diversos grupos. O grupo SHAM apresentou valores da FENa inferiores a 1% indicativo de normalidade da função tubular (SHAM: 0,29±0,03).

Os animais submetidos à isquemia renal apresentaram valores da FENa acima de 1%, sendo que o grupo Isquemia 45 apresentou valores ainda superiores ao grupo Isquemia 30 (Isquemia 45: 8,98±1,67 *vs* Isquemia 30: 2,77±0,70; $p<0,001$).

Os grupos Isquemia 30 + Sildenafil e Isquemia 30 + NAC apresentaram valores da FENa inferiores a 1% e semelhantes ao grupo SHAM (Isquemia 30 + Sildenafil: 0,61±0,13; Isquemia 30 + NAC: 0,73±0,22; SHAM: 0,29±0,03). A administração de sildenafil nos animais com isquemia renal de 45 min demonstrou também redução dos valores de FENa na comparação com o grupo isquemia 45 (Isquemia 45 + Sildenafil: 5,41±1,10 *vs* Isquemia 45: 8,98±1,67; $p<0,05$).

O pré-condicionamento com NAC no grupo Isquemia 45 induziu discreta elevação do parâmetro FENa quando comparado ao grupo Isquemia 45, porém, sem confirmação estatística (Isquemia 45 + NAC: 11,51±1,91; Isquemia 45: 8,98±1,67).

Dados de redução da FENa podem estar associadas com a recuperação de função tubular.

Tabela 2 - *Resultados de fração de excreção de sódio (FENa) dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010*

Grupos	**n**	**FENa (%)**
SHAM	7	0,29±0,03
Isquemia 30	6	2,77±0,70
Isquemia 30 + Sildenafil	6	0,61±0,13
Isquemia 30 + NAC	6	0,73±0,22
Isquemia 45	5	8,98±1,67[ac]
Isquemia 45 + Sildenafil	5	5,41±1,10[bd]
Isquemia 45 + NAC	5	11,51±1,91[ac]

Sendo: FENa – fração de excreção de sódio.

[a]$p < 0,001$ *vs* SHAM
[b]$p < 0,05$ *vs* SHAM
[c]$p < 0,001$ *vs* Isquemia 30
[d]$p < 0,05$ *vs* Isquemia 45
Os valores representam média ± erro padrão.

4.3 ESTRESSE OXIDATIVO

4.3.1 Peróxidos urinários

O H_2O_2 está presente em todos os fluídos corporais, especialmente na urina. A mensuração dos níveis de peróxidos é considerada como biomarcador da geração de H_2O_2 e preditor da extensão de estresse oxidativo em modelos experimentais *in vivo*[51].

Os valores de peróxidos urinários do grupo SHAM apresentados na **Tabela 3** foram considerados como referência de normalidade (SHAM: 1,7±0,1).

Os grupos Isquemia 30 e 45 apresentaram elevação estatisticamente significante dos valores de peróxidos urinários quando comparados com o grupo SHAM (Isquemia 30: 5,9±0,2; Isquemia 45: 9,7±1,8 *vs* SHAM: 1,7±0,1; $p<0,001$). Ressaltando que o grupo Isquemia 45 apresentou maior nível de peróxidos urinários do que o grupo Isquemia 30 (Isquemia 45: 9,7±1,8 *vs* Isquemia 30: 5,9±0,2; $p<0,05$).

Os grupos Isquemia 30 + Sildenafil e Isquemia 30 + NAC apresentaram redução dos valores de peróxidos quando comparados com o grupo Isquemia 30 (Isquemia 30 + Sildenafil: 2,3±0,3; Isquemia 30 + NAC: 3,2±0,5 *vs* Isquemia 30: 5,9±0,2; $p<0,05$).

Por outro lado, entre os grupos Isquemia 45 tratados com sildenafil e NAC, apenas o grupo Isquemia 45 + Sildenafil apresentou redução significativa dos valores de peróxidos urinários (Isquemia 45 + Sildenafil: 4,0±0,6 *vs* Isquemia 45: 9,7±01,8; $p<0,001$). O grupo Isquemia 45 + NAC apresentou valores semelhantes ao grupo Isquemia 45 (Isquemia 45 + NAC: 7,8±1,6; Isquemia 45: 9,7±1,8).

Tabela 3 – *Resultados de peróxidos urinários dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010*

Grupos	**n**	**Peróxidos urinários (nmol / g creatinina urinária)**
SHAM	7	1,7±0,1
Isquemia 30	6	5,9±0,2[a]
Isquemia 30 + Sildenafil	6	2,3±0,3[bc]
Isquemia 30 + NAC	6	3,2±0,5[bc]
Isquemia 45	5	9,7±1,8[ab]
Isquemia 45 + Sildenafil	5	4,0±0,6[c]
Isquemia 45 + NAC	5	7,8±1,6[a]

[a]$p < 0,001$ *vs* SHAM
[b]$p < 0,05$ *vs* Isquemia 30
[c]$p < 0,001$ *vs* Isquemia 45
Os valores representam média ± erro padrão.

4.3.2 Tióis solúveis não protéicos no tecido renal

Existem vários mecanismos antioxidantes de defesa determinados por enzimas, destacando-se a família da glutationa peroxidase. A glutationa (GSH) é um simples tripeptídeo com o grupamento tiol localizado na sua cadeia lateral, onde suas funções biológicas estão centradas. A GSH está presente em todas as células e se constitui como o principal tampão redox. O grupamento tiol passa por repetidos ciclos de redução (GSH – o grupamento tiól encontra-se na forma de sulfidrila livre) e oxidação (GSSG – o grupamento tiólico de duas moléculas de GSH condesam através de uma ligação de dissulfeto)[64].

A **Tabela 4** demonstra o grupo SHAM com maiores concentrações de tióis no tecido renal (SHAM: 170,2±15,8) indicando referência de normalidade.

Os grupos submetidos à isquemia renal de 30 e 45 min apresentaram redução dos níveis de tióis no tecido renal quando comparados com o grupo SHAM (Isquemia 30: 117,1±10,1; Isquemia 45: 129,3±16,6 *vs* SHAM: 170,2±15,8; $p<0,05$).

O mesmo comportamento foi observado nos grupos que receberam tratamento com sildenafil e NAC nos tempos de isquemia renal 30 e 45 min (Isquemia 30 + Sildenafil: 117,1±10,1; Isquemia 30 + NAC: 110,6±10,7; Isquemia 45 + Sildenafil: 68,0±11,6; Isquemia 45 + NAC: 103,7±9,0 *vs* SHAM: 170,2±15,8; $p<0,05$). Observou-se que o grupo Isquemia 45 + Sildenafil apresentou menores níveis de tióis no tecido renal quando comparados com o grupo Isquemia 45 (Isquemia 45 + Sildenafil: 68,0±11,6 *vs* Isquemia 45: 129,3±16,6; $p<0,001$).

Tabela 4 - *Resultados de tióis no tecido renal dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010*

Grupos	**n**	**Tióis no tecido renal (nmol / mg de proteína)**
SHAM	7	170,2±15,8
Isquemia 30	6	117,1±10,1[b]
Isquemia 30 + Sildenafil	6	110,6±10,7[a]
Isquemia 30 + NAC	6	89,4±4,0[a]
Isquemia 45	5	129,3±16,6[b]
Isquemia 45 + Sildenafil	5	68,0±11,6[ac]
Isquemia 45 + NAC	5	103,7±9,0[a]

[a]$p < 0,001$ *vs* SHAM
[b]$p < 0,05$ *vs* SHAM
[c]$p < 0,005$ *vs* Isquemia 45
Os valores representam média ± erro padrão.

4.3.3 Dosagem de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) na urina

O malondealdeídeo (MDA) é um dos aldeídos frequentemente analisados em métodos analíticos quantitativos e qualitativos para determinação dos índices de peroxidação lipídica. O MDA é um dos principais produtos da cascata de peroxidação lipídica e pode ser detectado indiretamente através da dosagem de TBARS urinário, no qual o ácido tiobarbitúrico reage com várias substâncias dentre elas o MDA[57].

A **Tabela 5** apresenta os resultados de TBARS urinários dos diversos grupos. Os resultados encontrados seguiram o padrão descrito para os valores de peróxidos urinários.

Os grupos Isquemia 30 e 45 apresentaram elevação dos níveis de TBARS urinário quando comparados com o grupo SHAM (Isquemia 30: 113,7±15,6; Isquemia 45: 116,8±33,0 *vs* SHAM: 56,7±7,2; $p<0,005$).

Os animais tratados com sildenafil e NAC submetidos à isquemia renal por 30 min apresentaram redução dos níveis de TBARS urinários quando comparados com o grupo Isquemia 30 (Isquemia 30 + Sildenafil: 47,5±2,1; Isquemia 30 + NAC: 58,1±6,7 *vs* Isquemia 30: 113,7±15,6; $p<0,005$).

O grupo Isquemia 45 + Sildenafil apresentou redução dos níveis de TBARS urinários quando comparado com o grupo Isquemia 45 (Isquemia 45 + Sildenafil: 44,9±7,2 vs Isquemia 45: 116,8±33,0; $p<0,005$). Por outro lado, o grupo tratamento Isquemia 45 + NAC se manteve semelhante ao grupo Isquemia 45 (Isquemia 45 + NAC: 117,1±13,4; Isquemia 45: 116,8±33,0).

Tabela 5 - *Resultados da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010*

Grupos	**n**	**TBARS urinário (nmol / g de creatinina urinária)**
SHAM	7	56,7±7,2
Isquemia 30	6	113,7±15,6[a]
Isquemia 30 + Sildenafil	6	47,5±2,1[b]
Isquemia 30 + NAC	6	58,1±6,7[b]
Isquemia 45	5	116,8±33,0[a]
Isquemia 45 + Sildenafil	5	44,9±7,2[bc]
Isquemia 45 + NAC	5	117,1±13,4[a]

Sendo TBARS – Substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico

[a]$p < 0,005$ *vs* SHAM
[b]$p < 0,005$ *vs* Isquemia 30
[c]$p < 0,005$ *vs* Isquemia 45
Os valores representam média ± erro padrão.

4.4 DETERMINAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A **Tabela 6** demonstra os valores da determinação de NO urinário dos diversos grupos.

Os grupos Isquemia 30 e Isquemia 45 apresentaram elevação dos níveis de NO urinário quando comparados com o grupo SHAM, confirmando o envolvimento de NO na fisiopatologia da LRA (Isquemia 30: 76,6±6,6; Isquemia 45: 76,2±14,5 *vs* SHAM: 30,2±2,2; p<0,001).

A administração prévia de sildenafil e NAC reduziu a liberação de NO em animais com isquemia renal de 30 min na comparação com o grupo Isquemia 30 (Isquemia 30 + Sildenafil: 35,5±3,5; Isquemia 30 + NAC: 31,1±2,4 *vs* Isquemia 30: 76,6±6,6; p<0,005) com valores semelhantes ao grupo SHAM (Isquemia 30 + Sildenafil: 35,5±3,5; Isquemia 30 + NAC: 31,1±2,4; SHAM: 30,2±2,2).

Quanto ao tempo de isquemia renal de 45 min, apenas o tratamento com sildenafil apresentou diminuição significativa dos valores de NO urinário na comparação com o grupo Isquemia 45 (Isquemia 45 + Sildenafil: 46,9±5,3 vs Isquemia 45: 76,2±14,5; p<0,005). Os animais submetidos à isquemia renal de 45 min e tratados com NAC mantiveram valores de NO semelhantes ao grupo Isquemia 45 (Isquemia 45 + NAC: 82,9±5,0; Isquemia 45: 76,2±14,5).

Tabela 6 - *Resultados da determinação de óxido nítrico (NO) dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010*

Grupos	**n**	**NO urinário (μmol / g de creatinina urinária)**
SHAM	7	30,2±2,2
Isquemia 30	6	76,6±6,6[a]
Isquemia 30 + Sildenafil	6	35,5±3,5[b]
Isquemia 30 + NAC	6	31,1±2,4[b]
Isquemia 45	5	76,2±14,5[a]
Isquemia 45 + Sildenafil	5	46,9±5,3[c]
Isquemia 45 + NAC	5	82,9±5,0[a]

Sendo NO - óxido nítrico

[a]$p < 0,001$ *vs* SHAM
[b]$p < 0,005$ *vs* Isquemia 30
[c]$p < 0,005$ *vs* Isquemia 45
Os valores representam média ± erro padrão.

4.5 SÍNTESE PROTÉICA DA iNOS E HO-1 POR TÉCNICA DE *WESTERN BLOTTING*

Western blotting é um método de biologia molecular e bioquímica para detectar proteínas em homogenato de células ou em extrato de tecidos biológicos[61]. A imunodetecção foi realizada para semiquantificar iNOS e HO-1. A banda referente à iNOS é de aproximadamente 130 KDa e da HO-1 apresenta aproximadamente 32 KDa.

A **Figura 4** ilustra a expressão protéica de iNOS. Observa-se que os grupos Isquemia 45 e o Isquemia 45 + NAC expressaram iNOS. Enquanto que a **Figura 5** demonstra a expressão protéica de HO-1 em todos os grupos de animais submetidos à isquemia renal, onde os grupos Isquemia 30, Isquemia 45 e Isquemia 45 + NAC expressaram esta enzima com maior intensidade.

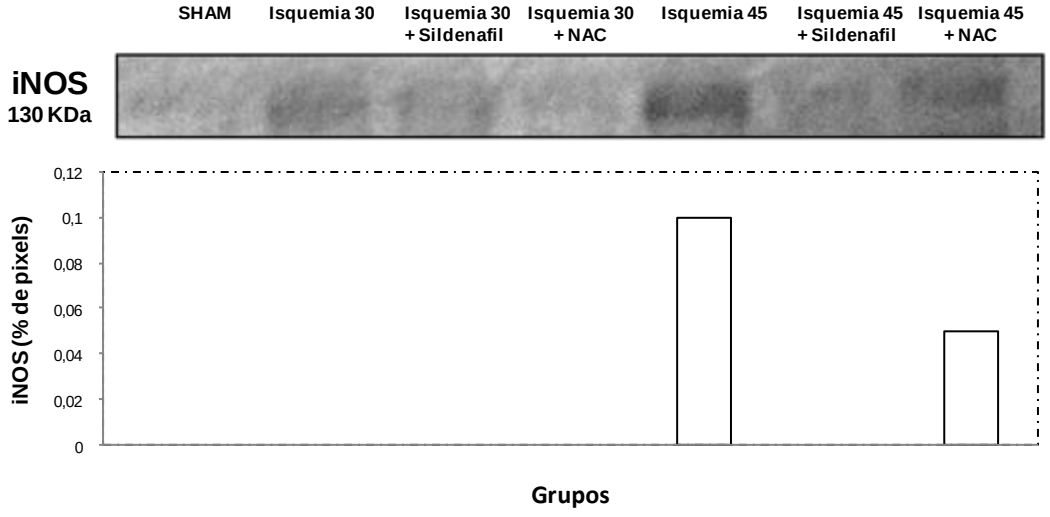

Figura 4: *Quantificação da expressão protéica da iNOS dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo – 2010.*

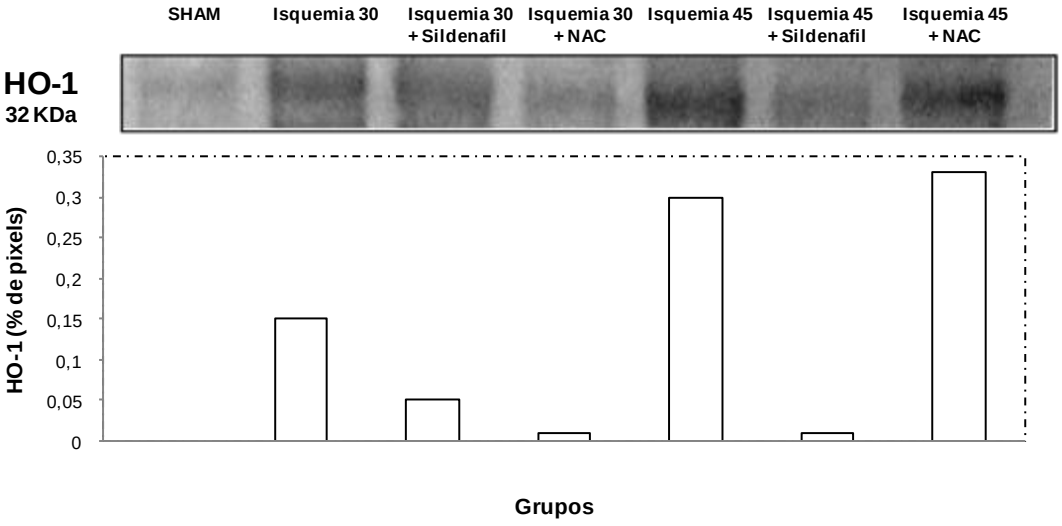

Figura 5: *Quantificação da expressão protéica da HO-1 dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo – 2010.*

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO RENAL

A **Figura 6** representa o aspecto visual nitidamente diferente, entre os grupos SHAM, Isquemia 30 e Isquemia 45. É possível observar delimitação da área isquêmica e intensificação da palidez na região cortical, após a manobra de hipoperfusão por 45 min o que diferenciou do rim 30 min.

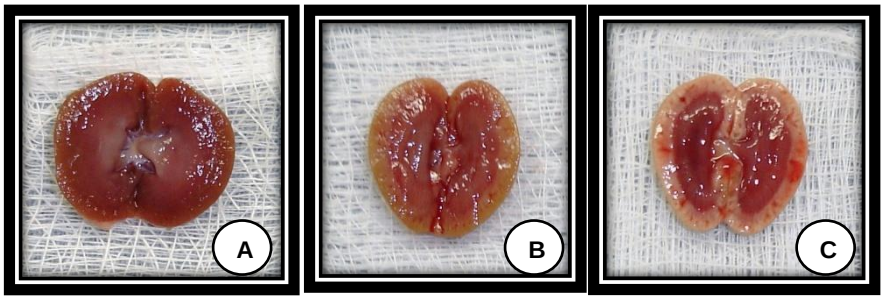

Figura 6: *Fotos do aspecto macroscópico dos rins submetidos ao mecanismo de I/R após 48 horas. Foto (**A**) rim normal, (**B**) rim com 30 min de isquemia (**C**) rim com 45 min de isquemia.*

4.6.1. Avaliação morfométrica: avaliação da expansão da área intersticial relativa

A morfometria foi realizada para avaliação da expansão da AIR do tecido renal. A **Tabela 7** representa os valores da AIR dos diversos grupos.

Os grupos Isquemia 30 e 45 min apresentaram maior porcentagem de expansão da AIR quando comparados com o grupo SHAM (Isquemia 30: 14,6±0,7; Isquemia 45: 18,8±2,1 *vs* SHAM: 6,8±0,4; $p<0,001$). A lesão isquêmica evoluiu com a progressão do tempo de isquemia, sendo que o grupo Isquemia 45 apresentou maior AIR em relação ao grupo Isquemia 30 (Isquemia 30: 14,6±0,7 *vs* Isquemia 45: 18,8±2,1; $p<0,05$).

Os animais submetidos à isquemia 30 min e pré-condicionados com sildenafil ou NAC não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Isquemia 30 (Isquemia 30 + Sildenafil: 14,4±1,9; Isquemia 30 + NAC: 13,8±0,4; Isquemia 30: 14,6±0,7).

Por outro lado, o grupo Isquemia 45 + Sildenafil apresentou redução da AIR quando comparado ao grupo Isquemia 45 (Isquemia 45 + Sildenafil: 14,8±0,7 *vs* Isquemia 45: 18,8±2,1; $p<0,05$). O tratamento Isquemia 45 + NAC manteve a porcentagem de AIR semelhante ao grupo Isquemia 45 (Isquemia 45 + NAC: 18,6±0,7; Isquemia 45: 18,8±2,1).

Tabela 7 - *Resultados de área intersticial relativa (AIR) no tecido renal dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo - 2010*

Grupos	**n**	**AIR (%)**
SHAM	7	6,8±0,4
Isquemia 30	6	14,6±0,7[a]
Isquemia 30 + Sildenafil	6	14,4±1,9[a]
Isquemia 30 + NAC	6	13,8±0,4[a]
Isquemia 45	5	18,8±2,1[ab]
Isquemia 45 + Sildenafil	5	14,8±0,7[ac]
Isquemia 45 + NAC	5	18,6±0,7[ab]

Sendo AIR – área intersticial relativa

[a]$p < 0,001$ *vs* SHAM
[b]$p < 0,05$ *vs* Isquemia 30
[c]$p < 0,05$ *vs* Isquemia 45
Os valores representam média ± erro padrão.

A **Figura 7** ilustra a AIR dos grupos SHAM (A), Isquemia 30 (B), Isquemia 45 (C), Isquemia 30 + Sildenafil (D), Isquemia 45 + Sildenafil (E), Isquemia 30 + NAC (F) e Isquemia 45 + NAC (G).

O grupo SHAM (A) não demonstrou alterações celulares tubulares nos cortes histológicos. Por outro lado, os grupos Isquemia 30 (B) e Isquemia 45 (C) foram caracterizados por edema e infiltrado inflamatório difuso do interstício, achatamento de células tubulares com dilatação da luz tubular, áreas de desnudamento da membrana basal e necrose tubular no córtex dos animais. O tratamento com sildenafil e NAC reduziu as alterações tubulares nos grupos Isquemia 30 + Sildenafil (D), Isquemia 30 + NAC (F) e Isquemia 45 + Sildenafil (E). O grupo Isquemia 45 + NAC (G) permaneceu semelhante ao grupo Isquemia 45.

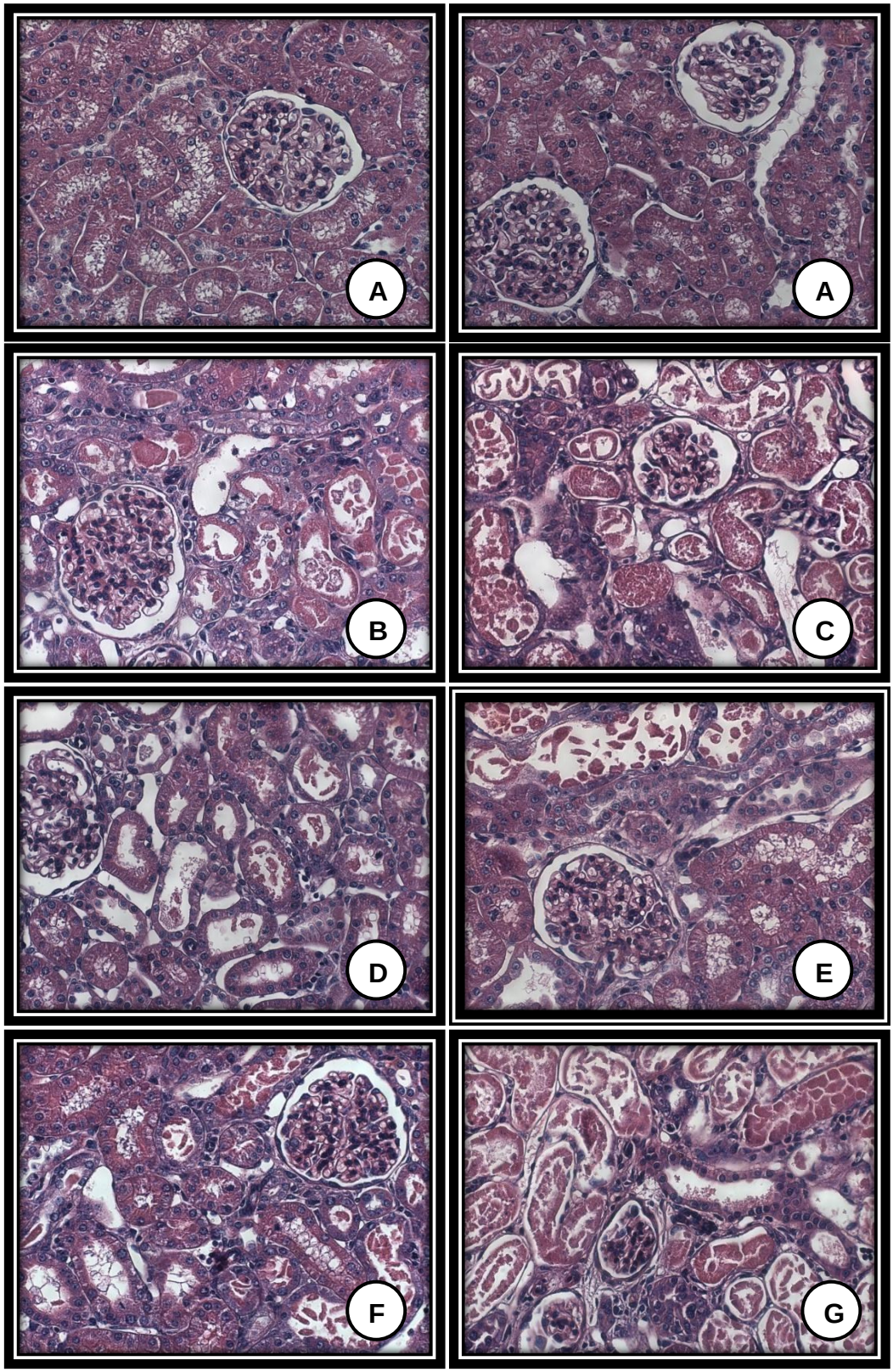

Figura 7: *Fotos dos cortes histológicos para avaliação da AIR (aumento de 400x) dos grupos: SHAM (A), Isquemia 30 (B), Isquemia 45 (C), Isquemia 30 + Sildenafil (D), Isquemia 45 + Sildenafil (E), Isquemia 30 + NAC (F) e Isquemia 45 + NAC (G).*

4.6.2 Análise de lesão tubulointersticial: escala Shih

A lesão tubulointersticial foi avaliada por meio da escala de Shih sendo que os graus de lesão foram graduados de 0 a 4. A **Tabela 8** apresenta o grau de lesão tubulointersticial dos diversos grupos segundo a escala de Shih.

Nesse parâmetro, os grupos Isquemia 30 e Isquemia 45 apresentaram maior quantitativo de lesão tubulointersticial quando comparados com o grupo SHAM (Isquemia 30: 2,5±0,2; Isquemia 45: 3,2±0,2 *vs* SHAM: 0,2±0,1; $p<0,001$).

O tratamento com sildenafil em animais com rins isquêmicos por 30 min não induziu diferença estatisticamente significante em relação ao grupo Isquemia 30, apesar da diferença de graduação na escala de Shih (Isquemia 30 + Sildenafil: 1,8±0,3; Isquemia 30: 2,5±0,2). A administração de NAC em animais submetidos à isquemia renal por 30 min manteve a redução da área tubulointersticial na comparação como grupo Isquemia 30 (Isquemia 30 + NAC: 1,6±0,4 *vs* Isquemia 30: 2,5±0,2; $p<0,05$).

O efeito protetor de sildenafil foi confirmado no grupo Isquemia 45 + Sildenafil com redução significativa do grau de lesão tubulointersticial em relação ao grupo Isquemia 45 (Isquemia 45 + Sildenafil: 2,2±0,4 *vs* Isquemia 45: 3,2±0,2; $p<0,05$). Por outro lado, o grupo Isquemia 45 + NAC apresentou resultados semelhantes ao grupo Isquemia 45 (Isquemia 45 + NAC: 3,6±0,2; Isquemia 45: 3,2±0,2).

Tabela 8 - *Resultados das alterações tubulointersticial no tecido renal dos grupos: SHAM, Isquemia 30, Isquemia 30 + Sildenafil, Isquemia 30 + NAC, Isquemia 45, Isquemia 45 + Sildenafil, Isquemia 45 + NAC, São Paulo – 2010*

Grupos	n	Quantificação das alterações tubulointersticial
SHAM	7	0,2±0,1
Isquemia 30	6	2,5±0,2[a]
Isquemia 30 + Sildenafil	6	1,8±0,3[a]
Isquemia 30 + NAC	6	1,6±0,4[ab]
Isquemia 45	5	3,2±0,2[a]
Isquemia 45 + Sildenafil	5	2,2±0,4[ac]
Isquemia 45 + NAC	5	3,6±0,2[a]

[a]$p < 0,001$ *vs* SHAM
[b]$p < 0,05$ *vs* Isquemia 30
[c]$p < 0,05$ *vs* Isquemia 45
Os valores representam média ± erro padrão.

A **Figura 8** representa as alterações tubulointersticiais segundo a classificação da escala de Shih dos grupos SHAM (A), Isquemia 30 (B), Isquemia 45 (C), Isquemia 30 + Sildenafil (D), Isquemia 45 + Sildenafil (E), Isquemia 30 + NAC (F) e Isquemia 45 + NAC (G).

O grupo SHAM (A) não apresentou alterações tubulointersticiais classificação 0 ou 0,5 no tecido normal ou pequenas áreas focais. Os grupos Isquemia 30 (B), Isquemia 30 + Sildenafil (C), Isquemia 30 + NAC (D) e o Isquemia 45 + Sildenafil (F) mantiveram grau 2 com envolvimento de menos de 10 a 25% de alterações tubulointersticiais. O grupo Isquemia 45 (E) apresentou grau 3 que representa o envolvimento de 25 a 75% da área no córtex renal. Curiosamente, o grupo Isquemia 45 + NAC (G) demonstrou alteração tubulointersticial superior a 75% no córtex renal.

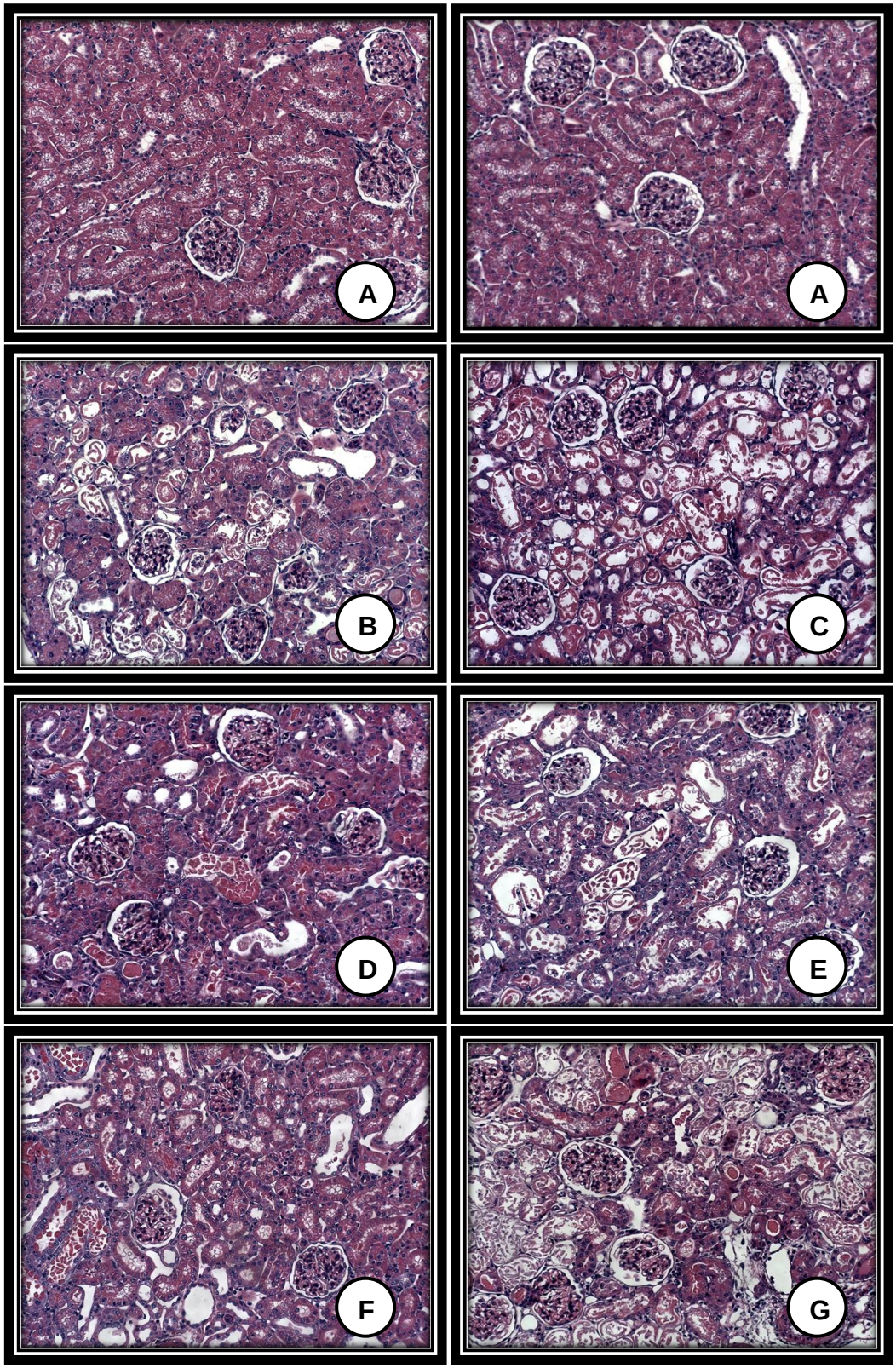

Figura 8: *Fotos dos cortes histológicos para avaliação da área tubulointersticial (aumento de 200x) dos grupos: SHAM (A), Isquemia 30 (B), Isquemia 45 (C), Isquemia 30 + Sildenafil (D), Isquemia 45 + Sildenafil (E); Isquemia 30 + NAC (F); Isquemia 45 + NAC (G).*

5 DISCUSSÃO

Dados relacionados à LRA em modelos animais de I/R renal, realizados predominantemente em ratos ou em camundongos, representam cerca de 40% dos estudos publicados na *Kidney International* e *Nephrology Dialysis Transplantation* no último triênio[7]. Vários deles, provenientes de pesquisa básica, contribuíram para o esclarecimento dos mecanismos fisiopatológicos e para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas para prevenção de LRA e redução na severidade da lesão tubular frente ao insulto isquêmico ou tóxico[65]. A aplicabilidade e viabilidade desses modelos são resultantes da similaridade da resposta inflamatória, congestão medular e lesão tubular apresentadas, quando comparados com dados obtidos de biópsia renal em pacientes com LRA[66]. Há que se ressaltar, contudo, que os modelos experimentais com animais visam elucidar mecanismos envolvidos e não se propõem a compor integralmente o modelo clínico de lesão, considerando as inúmeras variáveis individuais no humano.

Adicionalmente, é correto afirmar que, até o momento, as incertezas quanto ao sucesso no uso de terapias farmacológicas na atenuação do desgaste funcional na LRA desestimularam a implantação de protocolos intervencionistas. Há ainda que se estratificar melhor as características do paciente e conhecer as minúcias fisiopatológicas da síndrome. Nessa linha de posicionamento, explorar as repercussões funcionais do modelo de I/R, isolando a variável tempo, foi a proposta desta investigação.

O modelo de I/R renal consiste no clampeamento da artéria renal ou do pedículo renal por um período variado de 15 a 60 min com subsequente reperfusão[7,66]. No modelo reproduzido nesse estudo, a extensão e a severidade da lesão renal se mostraram diretamente relacionadas ao tempo

de isquemia consideradas as diversas observações que serão mencionadas a seguir.

Observou-se nesse estudo a existência de diferença de peso corporal entre alguns grupos de animais. Ressalta-se que esse fator não foi considerado relevante por não ter impacto sobre a função renal global e as outras variáveis estudadas, uma vez que a variação de peso não consistiu em diferenças de maturidade funcional dos animais utilizados no estudo[41].

No presente estudo, os animais submetidos ao clampeamento bilateral dos pedículos renais por 30 min apresentaram aumento do parâmetro fluxo urinário e variações nos níveis de creatinina sérica e urinária, que se refletiram na redução do *clearance* de creatinina. Os animais submetidos à isquemia renal por 45 min apresentaram maior redução no RFG, do parâmetro fluxo urinário e aumento dos níveis de creatinina sérica. Outros estudos também confirmaram esse dado de lesão funcional mais relevante quando aumentado o tempo de hipoperfusão, como o modelo de I/R em rim isolado submetido à hemoperfusão, no qual o *clearance* de creatinina, o volume urinário, a hemodinâmica renal e o consumo de O_2 deterioravam gradativamente com o aumento tempo de isquemia [67]. Modelos *in vivo* apresentam dados semelhantes de perda de função renal de acordo com a evolução do tempo de isquemia, demonstrado por meio da elevação sérica de uréia e creatinina[68].

A redução do RFG consiste em alterações da hemodinâmica glomerular, seguidas de lesão e obstrução tubular, aumento da pressão intratubular e a ativação do mecanismo de *feedback* tubuloglomerular[65]. Estudos confirmaram que animais submetidos à isquemia renal apresentaram aumento do fluxo urinário e redução da osmolalidade devido à inabilidade de manter a concentração urinária[69]. Nesses estudos, a mensuração da FENa apresentou um pico de elevação nas primeiras 48 horas após a lesão e associação direta com o parâmetro fluxo urinário, confirmando o descompasso na retenção de sódio após o insulto isquêmico[69]. No estudo ora apresentado, os animais com isquemia renal de 30 min apresentaram aumento significativo do fluxo urinário e da FENa que

confirmaram a presença de lesão tubular. A comparação entre os grupos isquêmicos 30 e 45 min mostrou que os animais com isquemia renal de 45 min apresentaram maiores valores da FENa, pressupondo lesão tubular mais exuberante no grupo de isquemia mais longa.

Considerando que os valores de função renal apresentados correspondem ao período entre 24 e 48 horas após o insulto, alguns conceitos funcionais emergiram dessas observações e serão citadas a seguir.

Primeiro, a redução do *clearance* de creatinina associada à elevação do fluxo urinário e da FENa no grupo Isquemia 30 pode corresponder a quadro clássico de recuperação funcional pós-insulto de hipoperfusão, com necrose em algumas áreas da porção fina túbulo proximal, pequena perda de células tubulares e redução moderada do RFG. A fase de recuperação é o período, no qual, ocorre a melhora da função renal com reparo e regeneração do tecido. Inicialmente, acontece o aumento do fluxo urinário e pequena redução dos níveis de creatinina sérica que poderão permanecer elevados por alguns dias, mesmo após o início da recuperação das células tubulares. Essa diurese osmótica pós-necrose tubular aguda reflete a excreção inapropriada de sódio e água acumulada, também da uréia filtrada e de outros solutos retidos durante a fase de manutenção. Ocasionalmente, a diurese pode ser inapropriada e excessiva sendo decorrente da baixa capacidade de reabsorção tubular em relação ao processo de FG[4]. Sendo assim, se aplicados esses conceitos, é possível que os animais 30 minutos estivessem nesse momento de reorganização celular tubular, porém ainda com *clearance* de creatinina alto.

Segundo, a redução mais significativa do fluxo urinário pode estar diretamente relacionada à maior área de necrose e disfunção tubular no grupo Isquemia 45. O período de isquemia renal prolongado pode ter induzido necrose envolvendo todo o túbulo proximal, com severa redução do RFG. Considerando as afirmações feitas acima para episódio de 30 min e retomando a necrose celular com possibilidade de obstrução tubular, é de se pressupor um quadro de lesão mais agressivo no modelo 45.

A reperfusão, se por um lado, restabelece o fluxo sanguíneo renal, por outro lado, gera H_2O_2, $O_2^{\bullet-}$ e o radical $OH^{\bullet-}$[9]. A formação de EROs e o processo inflamatório são determinantes da progressão da lesão renal. Nesse estudo, os animais com isquemia renal de 30 e 45 min apresentaram dados compatíveis com lesão oxidativa evidenciados por meio do aumento de peróxidos urinários, redução dos níveis de tióis no tecido renal e elevação dos níveis de TBARS urinários. Ressaltando que maiores níveis de lesão oxidativa foram apresentados pelo grupo de animais submetidos à isquemia renal de 45 min, com aumento da liberação de peróxidos urinários, consumo do grupamento de tióis para formação de enzimas antioxidantes e indicação de maiores níveis de peroxidação lipídica.

Na clínica, sabe-se que pacientes com diagnóstico de LRA apresentaram altos níveis do grupo carbonila (avaliação do índice de lesão oxidativa) e redução do grupamento de tióis (avaliação da capacidade antioxidante), quando comparados com indivíduos saudáveis ou portadores de insuficiência renal crônica[70]. Modelo *in vivo* de I/R renal demonstrou envolvimento de lesão oxidativa no tecido renal com baixos níveis de enzimas antioxidantes, presença de biomarcadores de oxidação e liberação de NO[15].

A participação de NO em modelo de I/R renal pode ser descrita em duas fases: os níveis de NO permanecem em baixas concentrações no período imediato após a isquemia, o que favorece a vasoconstrição do endotélio devido a prevalência de mediadores constritores como a endotelina[10,59]. A reperfusão e a reoxigenação celular resultam em maiores concentrações de NO, principalmente em células do túbulo renal, por meio da indução da iNOS, na presença de citocinas pró-inflamatória e de EROs[14,15,59]. Nesse estudo, os animais submetidos à isquemia renal por 30 e 45 min apresentaram altos níveis de NO urinário, sendo que a expressão protéica da iNOS esteve presente no grupo Isquemia 45. A disfunção e as lesões tubulares na isquemia renal estão associadas à indução de iNOS e consequentemente, ao aumento nos níveis de NO. A administração do inibidor seletivo para iNOS pode conferir efeito protetor na função

renal[17,59,70]. A liberação de NO na presença do $O_2^{\bullet-}$ facilita a formação de $ONOO^-$, metabólito envolvido com a lesão oxidativa via nitrolização de proteínas[11,71]. Adicionalmente, já foi demonstrado que a baixa biodisponibilidade de NO em condições patológicas é complementada pela ativação da HO-1 e pela formação de subprodutos da degradação de heme[15].

Vários estímulos como H_2O_2, NO e heme livre induzem a HO-1 como resposta benéfica e adaptativa secundária ao mecanismo de I/R[21,24]. Nesse estudo, a isoforma induzível HO-1 foi expressa em todos os grupos submetidos à isquemia renal, confirmando o seu envolvimento enzimático no modelo de I/R renal.

A lesão isquêmica se inicia na junção corticomedular localizada na faixa externa da região medular, segue para o segmento S3 do túbulo proximal, evoluindo até as regiões da medula interna e finalmente envolvendo os segmentos tubulares distais[8]. A lesão do segmento S3, que é limitada e variável após o período de 20 a 30 min, torna-se mais consistente e confluente com o aumento do tempo de isquemia. A isquemia renal de 45 min é representada por uma lesão extensa e necrótica na faixa externa da medula e grau variado de necrose cortical[8]. Esse fato pôde ser ludicamente observado nas imagens dos rins dos grupos SHAM, Isquemia 30 e 45, ressaltando que se trata de constatação macroscópica e com componente subjetivo.

Segundo a análise histológica do tecido renal nesse estudo, os animais submetidos à isquemia renal de 30 min apresentaram elevação da AIR, com edema e infiltrado inflamatório difuso do interstício, achatamento das células tubulares com dilatação da luz tubular, áreas focais de desnudamento da membrana basal e necrose tubular que confirmam o envolvimento de 10 a 25% do córtex renal. Sabe-se que a isquemia renal *in vivo* induz rapidamente inúmeras alterações estruturais e funcionais em células epiteliais do túbulo proximal e de células endoteliais da microvasculatura renal[10,72].

A isquemia renal de 45 min apresentou aumento ainda mais relevante da AIR, com grandes áreas de edema, infiltrado inflamatório, necrose, dilatação e atrofia tubular que representam o envolvimento de 25 a 75% da área cortical. Estudo em modelo de LRA isquêmica de 45 min em ratos confirmou esses dados com o aumento da atividade de neutrófilos no tecido renal e presença de lesão representada por degeneração citoplasmática, processo inflamatório, áreas de necrose, dilatação tubular, atrofia e descolamento celular[68]. Essas manifestações fisiológicas confirmaram a hipótese de que as diferenças estruturais determinam comportamento funcional particular para os casos de isquemia renal de 30 e 45 min, e complementam as observações relacionadas à função renal incluindo o fluxo urinário, *clearance* de creatinina e FENa descritas no inicio dessa seção. Estudos demonstram que aos 60 min de isquemia, o grau de necrose cortical aproximou-se ao infarto, acompanhado de lesão de néfrons distais, lesão endotelial e disfunção renal associada à lesão tubular e redução do RFG[8].

Avançando no estudo, abordou-se as distorções funcionais e estruturais nos modelos de isquemia 30 e 45 min por meio de terapias farmacológicas já incorporadas na clínica ou descritas em literatura: o citrato de sildenafil e a NAC. Essas intervenções foram instituídas com o objetivo de verificar a resposta ao agente, na dependência do grau de lesão estabelecida.

É consenso que o pré-condicionamento com fármacos ou sequestradores de EROs é largamente empregado em estudos experimentais de modelo animal. A dificuldade consiste em se estabelecer o momento mais apropriado para uma intervenção de sucesso. Por outro lado, sabe-se que a partir da quarta hora após o mecanismo de I/R renal, os rins isquêmicos evoluem com presença de mediadores inflamatórios e alterações histopatológicas que alcançam o pico máximo de lesão celular em 24 horas[68]. Portanto, nesse estudo optou-se pelo pré-condicionamento com os fármacos já mencionados para investigar a ação protetora na fase de iniciação e extensão da lesão renal isquêmica.

O citrato de sildenafil é um inibidor seletivo da PDE-5 que degrada a GMPc e mantém a ação vasodilatadora de NO em células da musculatura lisa[73]. Nesse contexto, o sildenafil tem sido também considerado por suas ações pleiotrópicas renais caracterizadas por propriedades: antioxidante, antiinflamatória e protetora vascular. O pré-condicionamento com sildenafil frente ao mecanismo de I/R renal de 30 min demonstrou efeito protetor com melhora da função glomerular e tubular, menores níveis de desequilíbrio redox, redução de NO urinário e cortes histológicos do tecido renal com menor AIR e menor área de lesão tubulointersticial. Estudos demonstram que ratos com nefropatia diabética induzida pela administração de estreptozocina tratados com sildenafil estabilizaram os níveis de lesão oxidativa e manifestaram controle do processo inflamatório[38]. Adicionalmente, a administração do inibidor PDE-5 em modelo animal de LRA induzida pelo mecanismo de I/R e cisplatina demonstrou efeito protetor na função renal por meio da indução de iNOS e eNOS[18,39].

A ação protetora parcial do sildenafil também foi observada em animais submetidos à isquemia renal de 45 min, vista pela redução dos índices de oxidação, menores áreas de infiltrado inflamatório e alterações tubulares e menor liberação de NO. A ausência da expressão protéica de iNOS também foi observada se coadunando com a redução na liberação de NO. Entretanto, apesar da apresentação de dados em favor da administração do inibidor de PDE-5 na lesão isquêmica, os animais submetidos à isquemia por 45 min não apresentaram melhora da função renal, avaliada por meio do *clearance* de creatinina. Considerando a melhora da função tubular e redução de marcadores de peroxidação lipídica e NO, esperava-se que a FG acompanhasse essa tendência. De fato, houve melhora no RFG do grupo Isquemia 45 + Sildenafil quando comparado com o grupo Isquemia 45, porém, não se constatou diferença estatisticamente significante. Contudo, a diferença numérica observada reflete a resposta biológica e complementa o perfil de lesão observado, ou seja, apesar da ausência de constatação estatística, o grupo Isquemia 45 min tratado com sildenafil se comportou como o esperado: melhor do que o Isquemia 45 em

termos funcionais, confirmando o efeito renoprotetor do sildenafil em termos funcionais globais.

O baixo índice de lesão oxidativa no grupo Isquemia 45 + Sildenafil foi demonstrado pela redução dos níveis de peróxidos urinários, tióis no tecido renal e TBARS urinário. O mecanismo associado ao estresse oxidativo é determinado pela redução dos níveis de antioxidantes ou a geração excessiva de EROs e ERNs que facilitam a formação de radicais livres, porém, a redução dos níveis de enzimas antioxidantes na situação de lesão pressupõe o consumo da reserva endógena e a ativação desse sistema de defesa antioxidante[74].

O mecanismo de ação de sildenafil que merece destaque é a indução de NO via GMPc. Os efeitos benéficos de proteção renal via indução de eNOS e iNOS são citados[18,39], mas nesse estudo a redução na liberação de NO e a inibição de iNOS parece ter conferido a proteção renal. O papel do NO via iNOS frente ao insulto isquêmico é controverso. Alguns estudos confirmam a proteção renal com a administração de inibidores seletivos de iNOS ou sequestradores de $ONOO^-$[17,71] e outros demonstram o efeito benéfico na indução de iNOS e liberação de NO em modelo de I/R renal[18,75]. Diversos fatores como as concentrações locais, a capacidade de difusão, o ambiente celular e o mecanismo de lesão interferem na indução de NOS e na formação de NO e justificam a diversidade de resposta dessa molécula gasosa[14,18,59]. Além disso, o mecanismo de I/R renal envolve alterações na expressão da eNOS e iNOS[14]. Em condições de hipóxia e acidose celular, a atividade de eNOS se reduz dramaticamente e prevalece a ação de mediadores vasoconstritores[19]. Adicionalmente, a administração de sildenafil também demonstrou efeito protetor por via independente da GMPc/NO em modelo de isquemia miocárdica de 30 min seguida de reperfusão. Esses dados confirmam a existência de outras vias do mecanismo protetor do sildenafil em modelo de I/R[36].

Nesse contexto, a enzima HO-1 pode ser considerada como um dos prováveis mediadores de proteção do sildenafil na LRA isquêmica. Nesse estudo, as situações de injúria intensa e a ausência de sildenafil, nos casos

de Isquemia 30, Isquemia 45 e Isquemia 45 + NAC podem ter induzido maior geração de heme, o que desencadeou maior expressão da HO-1 em uma tentativa de equilibrar essa via de lesão. Lembrando que o sistema HO é responsável pela degradação de heme com a função de manter o equilíbrio de todas as heme proteínas como a hemoglobina, NOS, GC e a glutationa peroxidase[21,23]. Além disso, a maior liberação de NO nos casos destacados pode também ter induzido HO-1, demonstrando a interface entre os sistemas NO e HO-1 como já descrito em outros estudos.

A liberação de CO *in vivo* é resultado da degradação de heme pela HO[21]. O CO e o NO apresentam grande similaridade na ação vasodilatadora via cGMP, porém, em condições patológicas de excessiva liberação de NO, a HO-1 modula a função da NOS que limita a formação $ONOO^-$ e mantém as propriedades de vasodilatação e de proteção vascular via cGMP/NO[23].

O complexo BV/BR, como sequestradores de EROs, também confere a proteção antioxidante da HO-1[15,23]. Pequenas concentrações de BR formadas pela indução de HO-1 atuam como sequestradores de EROs *in vitro* e reduzem a lesão celular mediada por oxidantes, além de restabelecer o equilíbrio redox *in vivo*[21]. Estudo em modelo animal de transplante renal tratado com pequenas quantidades de BV apresentaram redução da infiltração de macrófagos e de mediadores inflamatórios como a IL-1 e IL-6, ICAM-1 e iNOS[76].

O ferro livre, o CO e o complexo BV/BR são subprodutos da degradação de heme pela enzima HO-1[23,24]. A molécula de ferro livre é um potente pró-oxidante que na presença de moléculas intermediárias como H_2O_2 formam o OH^- através da reação de Fenton[23]. A ferritina é uma proteína intracelular com a capacidade de sequestrar eficientemente o ferro livre [23]. A modulação intracelular do acúmulo de ferro livre é descrito como mecanismo de citoproteção da HO-1[24].

A administração de CO, BV ou BR, individualmente, demonstra efeito citoprotetor, mas a evidência experimental enfatiza a necessidade de uma

resposta coordenada com todos os elementos para total defesa celular[23]. Assim, a menor expressão de HO-1 nos grupos tratados com sildenafil, que coincidiu com a menor liberação de NO, sugere geração mais restrita de heme, portanto, menor necessidade da atividade de HO-1.

Muitos fármacos são investigados pela capacidade de reduzir as disfunções celulares pós-mecanismo I/R renal ou atenuar a LRA isquêmica via ação antioxidante ou por meio da indução de enzimas antioxidantes. O objetivo da ação antioxidante é prevenir a geração e distribuição de EROs, a manutenção da atividade enzimática e liberação de sequestradores em condições fisiológicas ou na presença de insulto isquêmico ou tóxico, visando a reparação e recuperação celular mediada por EROs. A ação antioxidante pode ocorrer via sistema enzimático ou não enzimático. A atividade enzimática antioxidante envolve a remoção do $O_2^{\bullet -}$ e do H_2O_2 pela SOD, catalase e glutationa peroxidase que impedem a formação de radicais livres, principalmente por meio da inibição de reações em cadeia com a molécula ferro e cobre. A ação não enzimática antioxidante pode ser proveniente da vitamina C e E, β-caroteno, GSH e flavonóides que atuam como sequestradores de EROs e ERNs[77].

A NAC é conhecida pela sua ação não enzimática antioxidante e por facilitar a biossíntese de GSH, substrato para formação de glutationa-peroxidase, que catalisa a reação de degradação de EROs. Ela é um aminoácido com propriedades antioxidantes e capacidade de proteção renal frente ao mecanismo de I/R e agentes nefrotóxicos como a infusão de radiocontraste[19]. Estudos *in vitro* confirmam a proteção antioxidante de células tubulares com elevados níveis de GSH intracelular após mecanismo de I/R[78]. Nesse estudo, os animais submetidos à isquemia 30 min que receberam NAC apresentaram melhora da função renal avaliada por meio da elevação do RFG, redução da FENa, paralelamente à redução dos índices de oxidação com menores níveis de peróxidos urinários, TBARS, NO e envolvimento de menores áreas de lesão tubulointersticial na região do córtex renal. Estudos em ratos com isquemia renal de 30 min demonstraram efeito protetor com o pré-condicionamento com NAC por meio do aumento

do RFG e proteção tubular com redução das áreas de necrose e menor infiltração de macrófagos e linfócitos[43]. Outros estudos com modelo animal de isquemia renal também confirmaram a proteção da NAC com redução dos índices de oxidação analisados por meio do aumento nos níveis de GSH e redução de biomarcadores da peroxidação lipídica como o MDA e o isoprostano (8-iso-$PGF_{2\alpha}$)[44,46].

O restabelecimento do equilíbrio redox é descrito como fator de proteção e recuperação da lesão oxidativa, mas, no presente estudo observou-se redução dos níveis de tióis no tecido renal, seguidos pela diminuição de peróxidos urinários e do marcador de peroxidação lipídica TBARS. A NAC é um tiol, doador do grupo sulfidrila[40], o qual reage com NO e forma S-tiolnitroso. O aumento dos níveis de NO durante a isquemia está diretamente relacionado ao estoque tecidual de tióis como o S-tiolnitroso, que é a forma de maior estabilidade de NO e potente ativador da GC, com capacidade de liberação de NO em condições de ausência de O_2 [16,79]. A redução dos níveis de tióis nesse estudo ocorreu por provável associação entre o aumento na formação de EROs provenientes do mecanismo de I/R e depleção dos grupos sulfidrila para formação de GSH, substrato para enzima antioxidante glutationa peroxidase[46,79], ou ainda pela reação do NO e o grupo sulfidrila para síntese de S-tiolnitroso[16,79]. Pode-se considerar que ocorrem mecanismos de consumo de reserva da atividade enzimática quando se estabelecem modelos de isquemia plena.

Por outro lado, os animais submetidos à isquemia renal de 45 min que receberam a administração de NAC apresentaram redução da taxa de FG, maiores índices de oxidação, seguidas da elevação de NO e expressão de iNOS. A análise histológica do tecido renal também apresentou aumento da AIR e áreas de lesão tubulointersticial. É descrito que o mecanismo de I/R renal mantém baixa biodisponibilidade de NO devido a sua excessiva liberação e associação com $O_2^{\bullet -}$, prevalecendo a ação vasoconstritora e a ativação de moléculas de adesão que favorecem a agregação plaquetária no endotélio lesado. A disfunção endotelial e a lesão tubular induzem a

atividade de iNOS e geração de EROs pelas células do epiteliais e perpetuam a cascata de lesão renal[14,15].

Paralelamente, a resposta funcional após a administração de antioxidantes *in vivo* depende de vários fatores como o tipo de radicais livres formados, onde e como foram gerados, análise do grau de lesão e doses ideais para obter o efeito protetor. Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante apresente efeito protetor em algumas situações e em outras não ofereça proteção ou até mesmo aumente a lesão já estabelecida como o que foi observado nesse estudo[80].

As qualidades renoprotetoras da NAC ainda não foram completamente elucidadas e unificadas. Estudos clínicos para prevenção de nefropatia induzida pelo uso de radiocontraste em pacientes de risco, como diabéticos e portadores de doença renal crônica, concluíram que a profilaxia com NAC não demonstrou efeito renoprotetor[81] ou efeito antioxidante mensurados em amostras plasmáticas ou urinárias por meio dos índices de estresse oxidativo[82].

Esse estudo, apesar de apresentar algumas limitações como a necessidade de técnicas laboratoriais mais precisas para determinar o grau de lesão oxidativa, mostrou tendência à maior comprometimento funcional, estrutural e aumento em 40% da taxa de mortalidade de animais (dados não apresentados) durante a realização do experimento quando a NAC foi administrada no grupo Isquemia 45. Contudo, os resultados desfavoráveis relativos à NAC nesse estudo fazem eco a provável existência de mecanismo celular adicional quando a lesão funcional e histológica é mais relevante.

Sumariamente, os resultados demonstrados nesta investigação permitiram concluir que a gravidade da LRA isquêmica desencadeada pelo clampeamento bilateral dos pedículos renais é tempo dependente. A isquemia renal de 30 min confirmou redução do RFG e presença de lesão tubular, índices de oxidação, liberação de NO, expressão de HO-1, aumento AIR e lesão tubulointersticial. Nesse caso, uma das hipóteses a ser

considerada é que a atividade de transporte tubular residual seja preservada mesmo após a interrupção do fluxo sanguíneo renal por curtos períodos de 15 a 30 min por meio do mecanismo anaeróbico limitado de glicólise das células proximais. Ao contrário, as células dos túbulos distais apresentam grande capacidade de glicólise para geração de ATP que conferem resistência frente ao insulto isquêmico [7,66]. Os animais submetidos à isquemia renal de 45 min apresentaram piora da função renal, maiores índices de lesão oxidativa, liberação de NO, expressão de iNOS e HO-1, aumento da AIR e lesão tubulointersticial com presença de grandes área de necrose. Sabe-se que o clampeamento da artéria renal por longos períodos, de 45 a 60 min, resulta em extensa área de lesão com progressão da necrose focal do segmento S3, preservando apenas os túbulos da região perivascular[8].

A LRA induzida pelo mecanismo de I/R pode ser definida como um modelo de lesão oxidativa constatada por meio do aumento da liberação de peróxidos urinários como moléculas intermediárias, redução dos níveis de tióis no tecido renal, como precursores de enzimas antioxidantes e redução de TBARS urinários, como indicadores de peroxidação lipídica, acompanhadas da liberação de NO.

O pré-condicionamento com sildenafil e NAC confirmou proteção renal em animais submetidos à isquemia renal por 30 min com aumento do RFG, melhora da função tubular, redução dos índices de oxidação e de liberação de NO. Destaca-se a ação benéfica de sildenafil em tempos de isquemia renal 30 e 45 min. A NAC, curiosamente, demonstrou efeito adicional de lesão quando a isquemia mais longa foi instituída.

Considerando a possibilidade de transposição desses dados para prática clínica, a realização de cirurgias de grande porte como o transplante renal intervivos e procedimentos que envolvem clampeamento aórtico por um período variável de 20 a 40 min caracterizam a LRA isquêmica tempo dependente com áreas focais de necrose e dilatação tubular, lesão vascular, infiltrado inflamatório limitado que indicam capacidade de recuperação celular. A LRA decorrente de longos períodos de isquemia renal com

extensa lesão tubular, caracterizada por hipoperfusão persistente é frequentemente vivenciada na clínica em manobras de ressuscitação prolongada ou choque hemorrágico pós-parto severo [7].

Dessa forma, considerado os exemplos de gravidade mencionados acima, o estudo ora apresentado confirma a LRA como um processo dinâmico em que o tempo de isquemia é o ponto crítico e determina as perspectivas de recuperação celular pela plasticidade morfológica das células renais[7]. Além do mais, o efeito das intervenções farmacológicas de proteção caminha em direção inversa à gravidade da lesão, sendo que o tempo é possivelmente a variável determinante mais significativa neste contexto. O conhecimento dos mecanismos envolvidos nas diferentes situações clínicas deve guiar a escolha da intervenção farmacológica mais apropriada.

Estudos com modelos animais ainda são indispensáveis para elucidar o complexo mecanismo fisiopatológico de disfunção tubular e endotelial da LRA. Contudo, o desenvolvimento de biomarcadores que permitam diagnósticos precoces e melhor caracterização da LRA em humanos será de grande alento na epidemiologia da LRA. As estratégias de proteção ou prevenção renal devem manter como objetivos a minimização ou a promoção da recuperação celular e atenuação dos efeitos agudos e crônicos da LRA isquêmica.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A resposta funcional e histológica renal de ratos submetidos ao modelo de I/R renal de 30 e 45 min pré-condicionados com sildenafil ou NAC mostraram características próprias relacionadas ao grau de lesão determinado pelo tempo de clampeamento dos pedículos renais.

- ✓ Os ratos submetidos a I/R renal de 30 e 45 min demonstraram redução do RFG e da função tubular. O citrato de sildenafil e a NAC demonstraram efeito renoprotetor mais significativo nesses parâmetros no modelo de lesão 30 min.

- ✓ Os grupos de animais 30 e 45 min demonstraram desequilíbrio redox, com aumento de peróxidos urinários, TBARS, redução de tióis e aumento da liberação de NO. O tratamento com sildenafil atenuou os parâmetros oxidativos e reduziu o NO liberado. O efeito renoprotetor da NAC prevaleceu no modelo 30 min.

- ✓ A iNOS demonstrou maior expressão nos grupos isquemia renal de 45 min sem e com tratamento com NAC. A HO-1 está expressa em todos os cenários celulares de lesão com maior relevância naqueles em que a iNOS está presente, pressupondo a interface entre os dois sistemas.

- ✓ O pré-condicionamento com sildenafil induziu redução de AIR e lesão tubulointersticial nos modelos de isquemia renal por 30 e 45 min. A NAC demonstrou dados histológicos com redução de AIR e lesão tubulointersticial em modelo de isquemia renal por 30min. Os ratos submetidos á isquemia renal de 45 min mostraram tendência a piora dos parâmetros estudados quando esse tratamento foi instituído.

REFERÊNCIAS

1. Sesso R, Gordan P. Dados disponíveis sobre a doença renal crônica no Brasil. J Bras Nefrol 2007; 29(1 supl): 9-12.

2. Coca SG, Yusuf B, Shlipak MG, Garg AX, Parikh CR. Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. Am J Kidiney Dis 2009; 53(6): 961-73.

3. Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. Mol Med 2008; 14(7-8): 502-16.

4. Brandy HR, Brenner BM, Clarkson MR, Lieberthal W. Acute Renal Failure. In: Brenner BM, editors. Brenner & Rector's the Kidney. Philadelphia: Elsevier; 2004. v.1. p.1215-92.

5. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. J Am Soc Nephrol 2003; 14(8): 2199-210.

6. Hoste EAJ, Schurgers M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem? Crit Care Med 2008; 36(4 suppl): S146-51.

7. Heyman SN, Rosenberger C, Rosen S. Experimental ischemia-reperfusion: biases and myths – the proximal vs distal hypoxic tubular injury debate revisited. Kidney Int 2 010; 77(1): 9-16.

8. Shanley PF, Rosen MD, Brezis M, Silva P, Epstein FH, Rosen S. Topography of focal proximal tubular necrosis after ischemia with reflow in the rat kidney. Am J Pathol 1986; 122 (3): 462-8.

9. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. J Am Soc Nephrol 2006; 17(6): 1503-20.

10. Sutton TA. Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury. Microvasc Res 2009; 77(1): 4-7.

11. Molitoris BA, Sutton TA. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. Kidney Int 2004; 66(2):496-9.

12. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? Kidney Int 2004; 66(2):480-5.

13. Jassem W, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemic/reperfusion injury in organ transplantation. Kidney Int 2004; 66(2):514-17.

14. Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. Kidney Int 2002; 61(3): 855-61.

15. Pae HO, Son Y, Kim NH, Jeong HJ, Chang KC, Chung HT. Role of heme oxygenase in preserving vascular bioactive NO. Nitric Oxide 2010; 23(4): 251-7.

16. Salom MG, Arregui B, Carbonell LF, Ruiz F, Gonzáles-Moura JL, Fenoy FJ. Renal ischemia induces an increase in nitric oxide levels from tissue stores. Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol 2005; 289:R1459-66.

17. Chatterjee PK, Patel NSA, Kvale EO, Cuzzocrea S, Brown PAJ, Stewart KN, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. Kidney Int 2002; 61(3):862-71.

18. Choi DE, Jeong JY, Lim BJ, Chung S, Chang YK, Lee SJ, et al. Pretreatment of sildenafil attenuates ischemia-reperfusion (IR) renal injury in the rats. Am J Physiol Renal Physiol 2009; 297(2): F362-70.

19. Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2007; 376(1-2):1-43.

20. Gonzales-Michaca L, Farrugia G, Croatt AJ, Alam J, Nath KA. Heme: a determinant of life and death in renal tubular epithelial cell. Am J Physiol Renal Physiol 2004; 286(2): F370-7.

21. Abraham NG, Cao J, Sacerdoti D, Li X, Drummond G. Heme oxygenase: the key to renal function regulation. Am J Physiol Renal Physiol 2009; 297: (5) F1137-52.

22. Hill-Kapturczak N, Chang SH, Agarwal A. Heme oxygenase and the kidney. DNA Cell Biol 2002; 21(4): 307-21.

23. Kirkby KA, Adin C. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. Am J Physiol Renal Physiol 2006; 290(3): F563-71.

24. Agarwal A, Nick HS. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 gene ablation and expression. J Am Soc Nephrol 2000; 11(5):962-73.

25. Maines MD, Raju VS, Panahian N. Spin trap (N-t-butyl-phenylnitrone) mediated suprainduction of heme oxygenase-1 in kidney ischemia/reperfusion model: role of the oxygenase in protection against oxidative injury. J Pharmacol Exp Ther 1999; 291(2): 911-19.

26. Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, Peyton KJ, Schafer AI. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth cells. Circ Res 1997; 80(4): 557-64.

27. Wang R, Wang Z, Wu L. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. Br J Pharmacol 1997; 121(5): 927-34.

28. Nath K, Balla G, Vercelloti GM, Balla J, Jacob HS et al. Induction of heme oxygenase is a rapid response in rhabdomyolisis in the rat. J Clin Invest 1992; 90(1):267-70.

29. Nath KA. Heme oxygenase-1: a province for cytoprotective pathways in the kidney and others tissues. Kidney Int 2006; 70(30): 432-43.

30. Shimizu H, Takahashi T, Suzuki T, Yamazaki A, Fujiwara T, Odaka Y, et al. Protective effect of heme oxygenase induction in ischemic acute renal failure. Crit Care Med 2000, 28(3): 809-17.

31. Neiva LB. O papel da heme oxigenase-1 na lesão celular desencadeada pelo sulfato de polimixina B em células LLC-PK1 [dissertação]. São Paulo (SP): Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2004.

32. Watanabe M, Neiva LMB, Santos CCX, Laurindo FM, Vattimo MFF. Isoflavone and the heme oxygenase system in Ischemic acute kidney injury in rats. Food Chem Toxicol 2007; 45(12):2366-71.

33. Teshima CAS, Watanabe M, Nakamura SH, Vattimo MFF. Efeito renoprotetor da estatina: modelo animal de isquemia-reperfusão. Rev Bras Ter Intensiva 2010; 22(3): 245-9.

34. Dezoti C. A enzima heme oxigenase-1 na lesão renal aguda oxidativa pela polimixina B [dissertação]. São Paulo (SP): Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo; 2008.

35. Kurkreja RC, Salloum F, Das A, Ockaili R, Yin C, Bremer YA, et al. Pharmacological preconditioning with sildenafil: basic mechanisms and clinical implications. Vascul Pharmacol 2005; 42(5-6): 219-32.

36. Elford JW, Greer JJ, Lefer DJ. Sildenafil-mediated acute cardioprotection is independent of the NO/cGMP pathways. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007; 292(1): H342-7.

37. Oruc O, Inci K, Aki FT, Zeybek D, Muftuoglu SF, Kilinc K, et al. Sildenafil attenuates renal ischemia reperfusion injury by decreasing leukocyte infiltration. Acta Histochem 2010; 112(4):337-44.

38. Jeong KH, Lee TW, Ihm CG, Lee SH, Moon JY, et al. Effects of sildenafil on oxidative and inflammatory injuries of the kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. Am J Nephrol 2009; 29(3): 274-82.

39. Lee KW, Jeong JY, Lim BJ, Chang YK, Lee SJ, Na KR, et al. Sildenafil attenuates renal injury in an experimental model of rat cisplatin-induced nephrotoxicity. Toxicol 2009; 257(3): 137-43.

40. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cell Mol Life Sci 2003; 60(1): 6-20.

41. Pinto CF, Watanabe M, Vattimo MFF. Hydration and N-acetylcysteine in acute renal failure caused by iodinate medium: an experiment with rats. J Nephrol 2008; 21(5): 783-8.

42. Andrade SC, Dezoti C, Shibuya CA, Watanabe M, Vattimo MFF. Insuficiência renal aguda isquêmica: efeitos comparativos do alopurinol e n-acetilcisteína como antioxidantes. JBN 2004; 26(2): 69-75.

43. Araujo M, Andrade L, Coimbra TM, Rodrigues Jr AC, Seguro AC. Magnesium supplementation combined with acetylcysteine protects against potischemic acute renal failure. J Am Soc Nephrol 2005; 16(11): 3339-49.

44. Nitescu N, Ricksten SE, Marcussen N, Haraldsson B, Nilsson U, Basu S, et al. N-acetylcysteine attenuates kidney injury in rats subjected to renal ischemia-reperfusion. Nephrol Dial Transplant 2006; 21(5):1240-47.

45. Ikeda M, Prachasilchai W, Burne-Taney MJ, Rabb H, Yokota-Ikeda N. Ischemic acute tubular necrosis models and drug discovery: a focus on cellular inflammation. Drug Discov Today 2006; 11(7/8): 364-70.

46. Sehirli AÖ, Sener G, Satirglu H, Ayanoglu-Dülger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in rats. J Nephrol 2003; 16(1):75-80.

47. Dorea EL, Yu L, De Castro I, Campos SB, Ori M, Vaccari EM, et al. Nephrotoxicity of amphotericin B is attenuated by solubilizing with lipid emulsion. J Am Soc Nephrol 1997; 8(9):1415-22.

48. Clarkson MR, Brenner BM. O rim: referência rápida. Porto Alegre: Artmed; 2007. Abordagem clínica do paciente com doença renal; p.15-63.

49. Gay C, Collins J, Gebicki JM. Hydrogen peroxide assay with the ferric-xylenol orange complex. Anal Biochem 1999; 273(2):149-55.

50. Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric íon indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. Methods Enzymol 1994; 233:182-9.

51. Long LH, Evans PJ, Halliwell B. Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. Biochem Biophys Res Commun 1999; 262(3):605-9.

52. Banerjee D, Madhusoodanan UK, Nayak S, Jacob J. Urinary hydrogen peroxide: a probable marker of oxidative stress in malignancy. Clin Chim Acta 2003; 334(1/2):205-9.

53. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. FEBS Lett 2000; 486(1):10-3.

54. Akerboom TPM, Sies H. Assay glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. Methods Enzymol 1981; 77:373-82.

55. Read SM, Northcote DH. Minimization of the response to different protein of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. Anal Biochem 1981; 116(1):53-64.

56. Shimizu MHM, Danilovic A, Andrade L, Volpini RA, Libório AB, Sanches TRC, et al. N-acetylcysteine protects against renal injury following bilateral ureteral obstruction. Nephrol Dial Transplant 2008; 23(10): 3067-73.

57. Walker PD, Shah SV. Reactive oxygen metabolites in endotoxin-induced acute renal failure in rats. Kidney Int 1990; 38(6):1125-32.

58. Green LC, Wagner DA, Glogwski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem 1982; 126(1): 131-8

59. Mark LA, Robinson AV, Schulak JA. Inhibition of nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. J Sur Res 2005; 129(2): 236-41.

60. Pessoa EA, Convento MB, Silva RG, Oliveira AS, Borges FT, Schor N. Gentamicin-induced preconditioning of proximal tubular LLC-PK1 cells stimulates nitric oxide production but not the synthesis of heat shock protein. Braz J Med Biol Res 2009; 42(7): 614-20.

61. Barker K. Na bancada: manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas. Porto Alegre: Artmed; 2002. Eletroforese; p.389-418.

62. Shih W, Hines WH, Neilson EG. Effects of cyclosporine A development of immune-mediated interstitial nephitis. Kidney Int 1988; 33(6):1113-8.

63. Francescato HDC, Costa RC, Silva CGA, Coimbra TM. Treatment p38 MAPK inhibiion attenuates cisplatin nephrotoxicity starting after beginning of renal damage. Life Sci 2009; 84(17-18): 590-7.

64. Filomini G, Rotilio G, Cirilo MR. Cell Signaling and the glutathione redox system. Biochem Pharmacol 2002; 64(5-6): 1057-64.

65. Liberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 278(1): F1-12

66. Heyman SN, Liberthal W, Rogiers P, Bonventre JV. Animal models of acute tubular necrosis. Curr Opin Crit Care 2002; 8(6): 526-34.

67. Harper SJF, Hosgood SA, Waller HL, Yang B, Kay MD, Gonçalves I, et al. The effect of warm ischemic time on renal function and injury in the isolated hemoperfused kidney. Transplatation 2008; 86(3): 445-51.

68. Wiliams P, Lopez H, Britt D, Chan C,Ezrin A, Hottendorf R. Characterization of renal ischemia-reperfusion injury in rats. J Pharmacol Toxicol Methods 1997; 37(1):1-7.

69. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. Am J Physiol Renal Physiol 2001; 281(5): F887-99.

70. Himmelfarb J, Mcmogle E, Freedman S, Klenzak J, Mcmenamin E, Le P, et al. Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure. J Am Soc Nephrol 2004; 15(9): 2449-56.

71. Guven A, Uysal B, Akgul O, Cermik H, Gundogdu G, Surer I, et al. Scavenging of peroxynitrite reduces renal ischemia/reperfusion injury. Ren Fail 2008; 30(7):747-54.

72. Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. Kidney Int 2002; 62(5): 1539-49.

73. Glossmann H, Petrischor G, Bartsch G. Molecular mechanisms of the effect of sildenafil (Viagra®). Exp Gerontol 1999; 34(3): 305-18.

74. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. New York; Oxford University Press; 1999. Free radical, others relatives species and diseases; p.617-58.

75. Torras J, Herrero-Fresneada I, Lloberas N, Riera M, Ma Cruzado J, Ma Grinyo J. Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. Kidney Int 2002; 61(6):2218-27.

76. Nakao A, Seda Neto J, Kanno S, Stoiz DB, Kimizuka K, Liu F, et al. Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. Am J Transplant 2005; 5(2): 282-91.

77. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidants/antioxidant status. Br J Nutr 2001; 85(2 suppl): S67-74.

78. Paller MS, Patten M. Protective effects of glutathione, glycine or alanine in an in vitro model of renal anoxia. J Am Soc Nephrol 1992; 2(8): 1338-1344.

79. Salom MG, Cerón SN, Rodriguez F, Lopez B, Hernández I, Martínez JG, et al. Hem oxygenase-1 induction improves ischemic renal failure: role of nitric oxide and peroxynitrite. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007; 293(6): H3542-49.

80. Halliwell B. The antioxidant paradox [viewpoint]. Lancet 2000; 355(9210): 1179-80.

81. Amini M, Salarifar M, Amirbaigloo A, Masoudkabir F, Esfahani F. N-acetylcysteine does not prevent contrast-induced nephropathy after cardiac catheterization in patients with diabetes mellitus and chronic kidney disease: a randomized clinical trial. Trials [serial on the Internet]. 2009 [cited 2009. Jun 29]; 10(45): [about 6p.]. Available from: http://www.trialsjournal.co/content/10/1/45.

82. Buyukhatipoglu H, Sezen Y, Yildiz A, Bas M, Kirhan I, Ulas T, et al. N-acetylcysteine fails to prevent renal dysfunction and oxidative stress after noniodine contrast media administration during percutaneous coronary interventions. Pol Arch Med Wewn 2010; 120(10): 383-8.

ANEXOS

Anexo A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTO ANIMAL

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **156** nas fls. **79** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Maria de Fátima Fernandes Vattino, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **O efeito do inibidor da fosfodiesterase tipo-5 e da N-acetilcisteína na lesão renal agudo isquêmica em ratos** do qual participou(aram) o(s) alunos **Mirian Watanabe,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **15.12.09,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 16 de dezembro de 2009.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA – ICB/USP