



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Avaliação da expressão e localização da conexina 43
na injúria isquêmica renal aguda**

ADRIANA REGINA MIRANDA

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações**

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Bellini

São Paulo

2011

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Avaliação da expressão e localização da conexina 43
na injúria isquêmica renal aguda**

ADRIANA REGINA MIRANDA

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações**

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Bellini

São Paulo

2011

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Adílio e Rosa, por estarem comigo e me apoiarem em todos os momentos com seu amor incondicional.

Ao Felipe, pela companhia, amor, compreensão e conselhos, sempre fundamentais em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Muitos foram os que, de forma ou outra, estiveram ao meu lado e me ajudaram a chegar onde cheguei. A todos gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida e por todos os momentos que vivi durante o mestrado.

Aos meus pais, Adílio e Rosa, que me auxiliaram em muitos aspectos antes e durante a pós-graduação.

Ao meu namorado Felipe, por tudo que fez e faz por mim, e por ser uma companhia tão maravilhosa.

À Camila Ferreira, exemplo de força de vontade, amizade e dedicação, por ter acompanhado de perto esta etapa da minha vida.

Aos meus irmãos, Valéria, Aline e Guilherme, por todo o incentivo e carinho. E aos sobrinhos Leonardo, que tanto me alegra e encanta, e Amanda, que ainda não chegou, mas já é muito amada e esperada.

À Dra. Maria Helena Bellini, pela oportunidade de realizar o mestrado, pela orientação e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Gregory Menecier, por todo o apoio científico na realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Biologia Celular e Molecular do IPEN e da Nefrologia da UNIFESP. Os que já passaram (Fernanda, Milena, Priscila, Rodolfo, Cinthia, Flávia) e os que permanecem (Thiago, Karen, Marina, Adriano, Camila).

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia do IPEN, por seus serviços e auxílios. Sobretudo aos Drs. Maria Teresa, Patrick, João Ezequiel e Rosa Maria, por todos os ensinamentos que muito contribuíram para o meu projeto de mestrado e para o meu aprendizado científico.

À toda a equipe do laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, principalmente à Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli por conceder o uso do laboratório, à técnica Marguiti, pelas ajudas nos ensaios histológicos, e ao Msc. Lucas, pelo apoio nos ensaios de biologia molecular.

Ao técnico Marcos Cenedeze, da UNIFESP, pelo importante auxílio nos ensaios de biologia molecular.

Aos Dr. Júlio Marumo e doutorando Rafael Pádua, do Laboratório de Rejeitos Radioativos (IPEN), por toda a ajuda dispensada.

Ao Dr. Carlos Henrique (CTR - IPEN) pelo auxílio nas análises estatísticas, e ao Dr. João Carlos Shimada (ICB-USP), pelo auxílio nas análises histológicas.

A todos os meus amigos, que me apoiaram, aconselharam, torceram por mim e acreditaram no meu trabalho. Um agradecimento especial à Kelly, Gustavo, Wesley, Luis Fernando, Alexandre, Adriano, Ulises, Loraine, Beatriz, Fabiano, Juliane, Denise, Marlei, Nádia, Rafael e Robin, que se fizeram muito presentes, atenciosos e prestativos neste momento.

À CNEN pela bolsa concedida, e ao IPEN, pela oportunidade de realização do mestrado.

A todas as pessoas que de maneira direta ou indireta fizeram parte deste processo e desta fase tão importante em minha vida profissional e pessoal.

MUITO OBRIGADA.

EPÍGRAFE

“O verdadeiro homem mede a sua força quando se defronta com o obstáculo.”

Antoine De Saint-Exupéry

Avaliação da expressão e localização da conexina 43 na injúria isquêmica renal aguda

Adriana Regina Miranda

RESUMO

As células necessitam do contato com outras células e com a matriz extracelular, para a formação de tecidos. As junções gap são estreitos canais que conectam o citoplasma de células adjacentes, promovendo a passagem de íons orgânicos, aminoácidos, nucleotídeos e outros metabólitos. Estas junções são compostas por dois conexons ou hemicanais, que atravessam a membrana plasmática da célula a que pertencem, e são compostos por seis proteínas integrais de membrana denominadas conexinas (Cxs). A Cx43 é a mais expressa, e é fosforilada ao longo do ciclo de vida, sofrendo mudanças conformacionais, resultando em diferentes isoformas (P0, P1 e P2), apresentando propriedades distintas. A Cx43 apresenta-se distribuída em todo o rim adulto. A injúria renal aguda (IRA) é uma síndrome metabólica em que ocorre redução aguda da função renal e rápida diminuição da taxa de filtração glomerular, sendo hipóxia decorrente da isquemia sua causa principal. A restrição de oxigênio e nutrientes, e o acúmulo de metabólitos, resultam na injúria das células epiteliais tubulares. A depleção dos níveis de ATP, aumento nos níveis de cálcio intracelular, alterações na membrana e deformações no citoesqueleto caracterizam esta injúria. A reoxigenação tecidual atua como agressão adicional devido à liberação de radicais livres. Estudos sugerem que a ativação de hemicanais de Cx43, resultante da desfosforilação da proteína, durante depleção de ATP, esteja envolvida na IRA. Este trabalho verificou o envolvimento da Cx43 em modelo murino desta injúria, ocasionada por isquemia/reperfusão. Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J. A isquemia foi induzida por clampeamento das artérias renais por 45 minutos. A reperfusão ocorreu durante 24 horas após cirurgia. Foram utilizados 6 animais por grupo (isquêmicos, reperfundidos e controle). Após sacrifício, fragmentos dos rins foram submetidos a ensaios de western blot, PCR em tempo real, imuno-histoquímica e imunofluorescência. O modelo experimental foi validado através da dosagem de uréia e creatinina plasmática. As análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Bonferroni. Observou-se aumento significativo dos níveis de uréia e creatinina nos animais isquêmicos e reperfundidos, em relação ao controle. A expressão gênica apresentou aumento significativo apenas nos rins de camundongos reperfundidos (1,9 vezes; $P < 0,01$ vs controle). No western blot verificou-se aumento na quantidade da isoforma hiperfosforilada da Cx43 (P2) em rins isquêmicos (2,73 vezes; $P < 0,05$ vs controle), com diminuição significativa nos reperfundidos (2,37 vezes; $P < 0,05$ vs isquêmico). Nas isoformas menos fosforiladas (P1/P0), observou-se aumento nos rins isquêmicos (2,33 vezes; $P < 0,05$ vs controle), com diminuição nos reperfundidos (10 vezes; $P < 0,01$ vs isquêmico). Nos ensaios imuno-histológicos verificou-se diferentes localizações da Cx43 nas células epiteliais de túbulos corticais nos grupos comparados. Nos controles verificou-se distribuição difusa, e nos isquêmicos observou-se intensa marcação em superfície celular apical. Nos rins reperfundidos, a distribuição da Cx43 foi basolateral. As alterações observadas na expressão gênica, fosforilação protéica e distribuição da Cx43 nos rins foram semelhantes às mudanças observadas na isquemia cardíaca. Este estudo mostrou pela primeira vez a regulação da Cx43 em níveis transcricionais e pós-traducionais, e sua localização celular na IRA ocasionada por isquemia/reperfusão, indicando sua participação neste processo.

Palavras-chave: Injúria renal aguda, Isquemia/reperfusão, Conexina 43.

Evaluation of Connexin 43 expression and localization in renal acute ischemic injury

Adriana Regina Miranda

ABSTRACT

The cells require contact with other cells and the extracellular matrix for tissue formation. Gap junctions are narrow channels connecting the cytoplasm of two adjacent cells, promoting the passage of inorganic ions, amino acids, nucleotides and other metabolites. These junctions are composed of two connexons or hemichannels, crossing the cell plasma membrane where they belong, and consist of six integral membrane proteins called connexins (Cxs). The Cx43 is the most expressed, and is phosphorylated throughout the life cycle, undergoing conformational changes, resulting in different isoforms (P0, P1 and P2) that have different properties. The Cx43 is distributed throughout the adult kidney. The acute kidney injury (AKI) is a metabolic syndrome that occurs in acute reduction of renal function and rapid decline in glomerular filtration rate. Hypoxia resulting from ischemia is its principal cause. The restriction of oxygen and nutrients, and accumulation of metabolites, result in the injury of tubular epithelial cells. The depletion of ATP levels, increased levels of intracellular calcium, changes in the membrane and cytoskeleton deformation characterize this injury. Reoxygenation tissue acts as additional injury due to release of free radicals. Studies suggest that activation of Cx43 hemichannels, resulting from dephosphorylation of the protein during ATP depletion, is involved in the AKI. This study investigated the involvement of Cx43 in a murine model of this injury, caused by ischemia/reperfusion. We used male mice of strain C57BL/6J. Ischemia was induced by clamping the renal arteries for 45 minutes. Reperfusion occurred 24 hours after surgery. We used six animals per group (ischemic, reperfused, and sham). After sacrifice, kidney fragments were tested for western blot, real-time PCR, immunohistochemistry and immunofluorescence. The levels of plasma urea and creatinine were measured to validate the experimental model. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test. We observed significant increase in serum urea and creatinine in ischemic and reperfused animals compared to sham. Gene expression increased significantly only in the reperfused kidneys (1.9 fold, $P < 0.01$ vs sham). The western blot showed an increase in the amount of hyperphosphorylated isoform of Cx43 (P2) in ischemic kidneys (2.73 times, $P < 0.05$ vs sham), with significant reduction in reperfused (2.37 times, $P < 0.05$ vs ischemic). In the less phosphorylated isoforms (P1/P0), we observed an increase in ischemic kidneys (2.33 times, $P < 0.05$ vs sham), with a decrease in reperfused (10 times, $P < 0.01$ vs ischemic). In immuno-histological tests we verified different locations of Cx43 in the epithelial cells of cortical tubules. In normal kidneys there was patchy distribution, while in ischemic there was intense staining in the apical cell surface. In the reperfused kidney, the distribution of Cx43 was basolateral. The changes in gene expression, protein phosphorylation and distribution of Cx43 in the kidney observed in this study were similar to changes observed in cardiac ischemia. This study showed for the first time the regulation of Cx43 in transcriptional and post-translational levels, and its cellular localization in acute renal failure caused by ischemia/reperfusion, indicating its involvement in this injury.

Keywords: Acute kidney injury, Ischemia/reperfusion, Connexin 43.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Junções comunicantes e conexinas	13
1.2 Cx43	16
1.2.1 Ciclo de vida da Cx43	17
1.2.2 Fosforilação da Cx43	19
1.2.3 Cx43 nos rins	20
1.2.3.1 Cx43 nos rins de ratos	22
1.2.3.2 Cx43 nos rins de camundonos	22
1.2.3.3 Cx43 nos rins humanos	23
1.3 Injúria renal aguda	23
1.3.1 Cx43 e isquemia	26
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Animais	29
3.1.2 Procedimento cirúrgico: isquemia-reperusão	29
3.2 Coleta e processamento de sangue e rins	29
3.3 Testes bioquímicos: função renal	30
3.4 Extração de RNA	30
3.5 Análise qualitativa e quantificação de RNA total	31
3.6 Síntese de DNA complementar (cDNA)	31
3.7 Reação da polimeriase em cadeia (PCR) em tempo real	31
3.8 Extração de proteínas renais	32
3.9 Quantificação protéica	32
3.10 SDS Page	33
3.11 Western blotting	33
3.12 Fotodocumentação	34
3.13 Densitometria	34
3.14 Preparação de Material para exames histológicos	34
3.14.1 Desidratação do tecido	34
3.14.2 Diafanização e inclusão do material biológico em parafina	34
3.14.3 Cortes do tecido	34
3.14.4 Coloração com H/E para morfometria	35

3.14.5	Imunofluorescência	35
3.14.6	Imuno-histoquímica	36
3.15	Captura e processamento de imagens de microscopia	37
3.16	Quantificação de células positivas para PCNA	37
3.17	Análises estatísticas	37
4.	RESULTADOS	38
4.1	Função renal	38
4.2	Análise qualitativa de RNA	39
4.3	Análise da expressão do gene GTA1 por PCR em tempo real	39
4.4	Avaliação qualitativa do extrato protéico	40
4.5	Análise qualitativa e semi-quantitativa da Cx43 no extrato protéico renal	40
4.6	Análise histológica – HE	42
4.7	Imunohistoquímica	43
4.8	Imunofluorescência	44
4.8.1	Córtex	45
4.8.2	Medula	46
4.9	Análise de proliferação celular	47
5.	DISCUSSÃO	49
6.	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo da localização da Cx43 em rins de humanos, camundongos e ratos, descrita na literatura _____	21
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos três tipos especializados de junções celulares encontrados em células de tecidos de organismos multicelulares: junções ancoradoras, junções bloqueadoras e junções do tipo gap. _____	13
Figura 2: Representação esquemática da junção gap. _____	15
Figura 3: Modelo esquemático dos diferentes arranjos dos conexons (homomérico e heteromérico) e junções gap (homotípica e heterotípica). _____	15
Figura 4: Estrutura básica comum das Cxs. _____	16
Figura 5: Ciclo de vida da Cx43 e associação com elementos do citoesqueleto e outras proteínas. _____	18
Figura 6: Sítios de fosforilação da Cx43. _____	19
Figura 7: Processamento da Cx43, desde a síntese até a formação de junções gap. _____	20
Figura 8: Gráfico representativo da função renal (uréia e creatinina) dos camundongos controle, isquêmicos e reperfundidos. _____	38
Figura 9: Avaliação da integridade do RNA em gel de agarose 1,5%. 100pb – marcador 100pb. _____	39
Figura 10: Gráfico apresentando a expressão do gene GJA1 nos rins de camundongos controle, isquêmico e reperfundidos. _____	40
Figura 11: Gel de poliacrilamida 12% corado com Comassie Blue G-250 para análise de qualidade protéica dos homogenatos renais. _____	40
Figura 12: Western blot e avaliação semi-quantitativa da Cx43 em rim de camundongos, controle, isquêmico e reperfundido. _____	42
Figura 13: Fotomicrografia do corte de tecido renal corado com hematoxilina e eosina para análise histopatológica. _____	43
Figura 14: Fotomicrografia da marcação da Cx43 por imuno-histoquímica em tecido renal. _____	44
Figura 15: Fotomicrografia da marcação da Cx43, por imunofluorescência, em tecido renal (região cortical). _____	45
Figura 16: Fotomicrografia da marcação da Cx43, por imunofluorescência, em tecido renal (região cortical), para observação da marcação positiva em capilares glomerulares. _____	46

Figura 17: Fotomicrografia da marcação da Cx43, por imunofluorescência, em tecido renal (região medular). _____ **47**

Figura 18: Imuno-histoquímica de tecido renal para marcação do PCNA. — **48**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Junções comunicantes e conexinas

Os organismos multicelulares estão organizados em tecidos e órgãos. Dentre outros fatores, esta organização requer o contato célula-célula e célula-matriz extracelular, para a formação de estruturas cooperativas dando origem aos órgãos [1].

Em todos os tecidos encontram-se junções especializadas no contato célula-célula e célula-matriz [1, 2]. Estas junções podem ser divididas em três grupos funcionais: junções ancoradoras, que servem para promover a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular; junções bloqueadoras, que vedam o espaço extracelular, impedindo o trânsito de substâncias por entre as células em união; e junções comunicantes, ou junções gap, que estabelecem comunicação entre as células, conectando o citoplasma de uma célula diretamente com o citoplasma da célula vizinha [2, 3]. Na FIG.1 podem ser observados os três tipos funcionais de junções celulares.

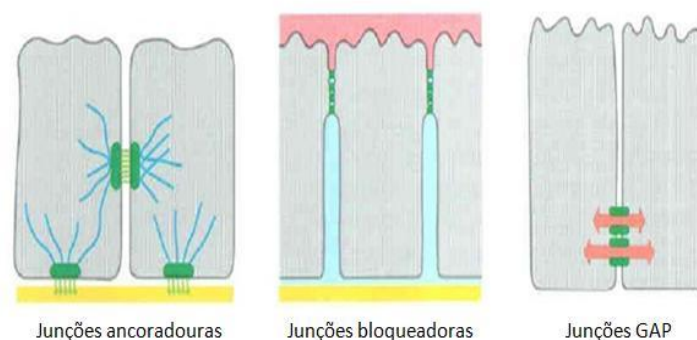


FIGURA 1 – Representação esquemática dos três tipos especializados de junções celulares encontrados em células de tecidos de organismos multicelulares: junções ancoradoras, junções bloqueadoras e junções do tipo gap. Adaptado de Alberts e colaboradores [3].

As junções gap são canais estreitos, que permitem a passagem de íons orgânicos, aminoácidos, nucleotídeos e outras pequenas moléculas solúveis de peso molecular inferior a um kilodalton (kDa), entre as células adjacentes. Além disso, permitem a transmissão de segundos mensageiros (como cálcio, monofosfato de adenosina cíclica, monofosfato de guanosina cíclica e trifosfato de

inositol) e outros metabólitos [3]. Estes canais foram descritos pela primeira vez por Kanno e Lowenstein [4], em estudo de células epiteliais, como regiões especializadas em que as membranas plasmáticas de duas células adjacentes aproximam-se sem que ocorra fusão, delimitando um espaço entre elas de dois a três nanômetros (nm).

As junções gap são observadas em quase todos os tecidos dos organismos multicelulares [5], com exceção das células sanguíneas vermelhas, fibras musculares esqueléticas e espermatozóides [6].

Estas estruturas atuam de maneira direta no desenvolvimento, crescimento e diferenciação celular [7]. Além disso, elas permitem a harmonização e sincronização das atividades celulares e são importantes para a regulação homeostática tecidual [8].

Diferentes estudos têm demonstrado que alterações nestas junções podem ocasionar diferentes anomalias, como má formação cardíaca, surdez sensorineural não sindrômica, catarata, câncer, dentre outras [9, 10]. O câncer foi a primeira patologia humana associada com alterações nas junções gap, sendo esta relação estudada há cerca de quarenta anos [11]. A maior parte das células tumorigênicas é caracterizada pela perda ou diminuição da comunicação juncional intercelular [12].

Uma única junção gap, num canal intercelular, consiste em dois conexons (ou hemicanais), cada um atravessando a membrana da célula a que pertence, que se unem e formam um poro através da bicamada lipídica [5]. Para que haja conexão entre duas células adjacentes é necessário que os conexons das membranas plasmáticas estejam corretamente alinhados [13].

Os conexons são formados por proteínas integrais de membrana da família multigênica das conexinas (Cxs). Atualmente são conhecidas aproximadamente vinte diferentes proteínas pertencentes a esta família em mamíferos [14-16].

As Cxs são nomeadas de acordo com seu peso em kDa. Um exemplo é a Cx26, que é a nomenclatura utilizada para a proteína desta família, com peso molecular de 26 kDa [17, 18].

As Cxs oligomerizam-se em grupos de seis unidades para formação dos conexons [19].

Na FIG.2 está representado um modelo esquemático da formação de uma junção gap a partir da oligomerização das Cxs.

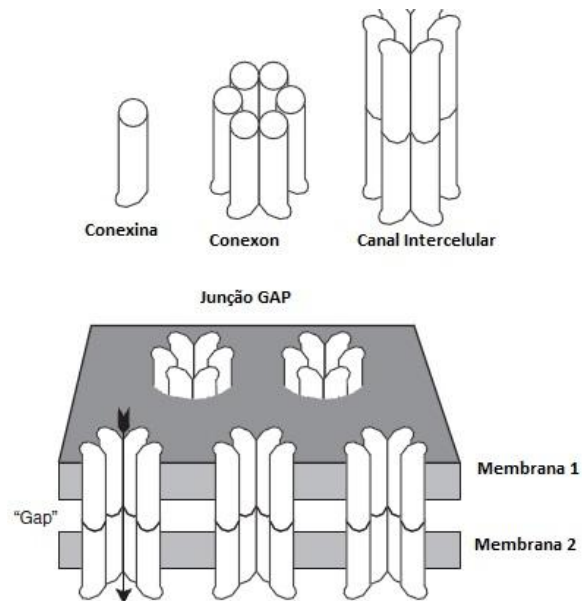


FIGURA 2 - Representação esquemática da junção gap. A Cx (subunidade protéica) é a unidade da junção gap. O arranjo de seis Cxs forma um conexon. Cada conexon une-se a outro conexon da célula adjacente, completando a junção gap. Adaptado de Goodenough e Paul [13].

Os conexons podem ser homoméricos, se forem constituídos com um único tipo de Cx, ou heteroméricos se apresentarem mais de um tipo de Cx na sua composição. A junção formada pode ser dividida em: homotípica, quando constituída por dois conexons idênticos, ou heterotípica quando apresenta mais de um tipo de conexon no seu alinhamento [20] (FIG.3).

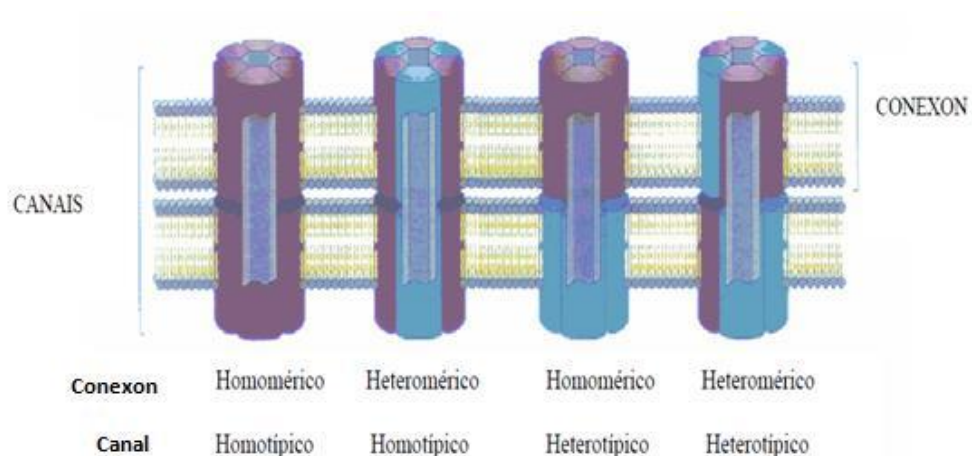


FIGURA 3 – Modelo esquemático dos diferentes arranjos dos conexons (homomérico e heteromérico) e junções gap (homotípica e heterotípica). As cores roxa e azul representam diferentes tipos de conexinas. Modificado de Teixeira [21].

Estas diferentes combinações resultam em diferentes funções das junções gap formadas, pois cada Cx possui diferentes propriedades em relação à condutividade, permeabilidade, condutância e abertura do canal [15, 22].

As Cxs não são idênticas em todos os tecidos, mas apresentam uma estrutura básica comum (FIG.4), sendo compostas por quatro domínios transmembrana (hidrofóbicos), denominados M1, M2, M3 e M4; duas alças extracelulares (E1 e E2) que contêm seis resíduos conservados de cisteína; uma alça citoplasmática (AC); um domínio citoplasmático carboxi-terminal (COOH); e um domínio citoplasmático amino-terminal (NH₂) [21, 23, 24].

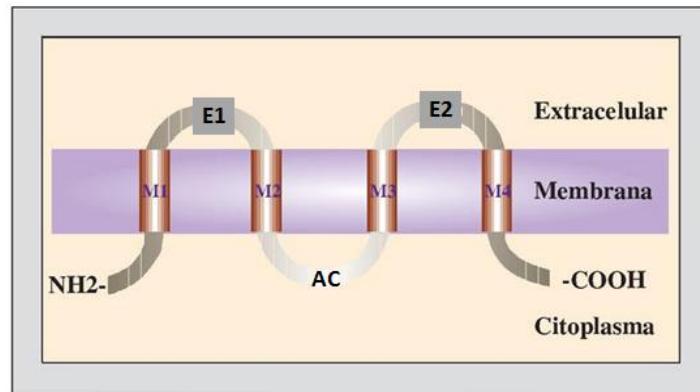


FIGURA 4 - Estrutura básica comum das Cxs. E1 e E2: alças extracelulares; M1, M2, M3 e M4: domínios transmembrana; AC: alça citoplasmática. Adaptado de: <http://www.doyma.es/revistas>.

A alça citoplasmática e o domínio carboxi-terminal são únicos para cada uma das Cxs, enquanto a porção amino-terminal é bem conservada [25]. As alças presentes na estrutura das proteínas são responsáveis pelo acoplamento e fechamento dos canais intercelulares [21]. O domínio carboxi-terminal pode apresentar variações em seu comprimento, e sugere-se que este domínio possua papel regulatório e atue como sítio de interação da Cx com outras proteínas [23].

1.2 Cx43

A Cx43 é a mais expressa dentro da família das Cxs [1, 26], e também a mais estudada [27]. Ela é encontrada em aproximadamente 34 tecidos e 46 tipos celulares, exercendo importantes funções na manutenção da homeostasia de órgãos e tecidos [23].

O gene que codifica a Cx43 é o gene GJA1 (sigla do inglês: *Gap junction alpha 1*), que está localizado no cromossomo 6 em humanos [21, 28], e no cromossomo 10 em camundongos [1]. O gene é composto por dois éxons, que possuem alta homologia entre as espécies de mamíferos, sendo um gene com regiões bastante conservadas [1, 21].

Esta Cx é expressa de maneira abundante no coração [14, 18, 29, 30], sendo quase que exclusivamente localizada nos discos intercalados em cardiomiócitos, e está envolvida na condução elétrica [30].

No pâncreas, estudos *in vitro* sugerem que a Cx43 exerça papel em células exócrinas e endócrinas, sendo necessária para a produção de insulina [18]. No útero, ela está presente entre as células miométricas, o que sugere participação na regulação da atividade deste órgão. Além disso, a Cx43 é expressa nas camadas elásticas das grandes e pequenas artérias musculares, porém o seu papel não está esclarecido na angiogênese [21].

A presença da Cx43 é, ainda, descrita nos rins [15, 31] (assunto que será abordado mais detalhadamente neste trabalho). Esta proteína também foi observada em estudos de células epiteliais da córnea, cristalino, osteócitos [1], queratinócitos humanos e diversos outros tipos celulares [23].

O gene GJA1 apresenta efeito supressor tumoral em várias linhagens celulares como, por exemplo, células malignas de glândulas mamárias de cadelas [24], células de glioblastoma humano [32] e em células de carcinoma endometrial humano [33].

A deleção total deste gene acarreta na má formação cardíaca, e por isso é incompatível com a vida [1, 26].

1.2.1 Ciclo de vida da Cx43

As Cxs são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e, após o seu dobramento, são inseridas em vesículas e transferidas ao aparelho de Golgi, onde são oligomerizadas, formando os conexons, na face côncava (ou face *trans*) [19]. Os conexons são, então, transportados em vesículas para a membrana celular, ao longo de estruturas microtubulares, onde interagem com estruturas do citoesqueleto, como proteínas da zona de oclusão [5, 16]. Na membrana plasmática, os conexons são atraídos para regiões onde estão localizados os conexons da célula adjacente, formando o emparelhamento intercelular. Um canal completo na superfície celular é formado pela união de vários conexons emparelhados (FIG.5) [25, 34].

Os conexons, individualmente, foram descritos durante muitas décadas como estruturas não juncionais de membrana que permaneciam impermeáveis. Dados mais recentes documentaram a existência de mecanismos regulatórios

para a abertura destes canais em cultura de células, ativados por mecanismos fisiopatológicos [18, 35].

O número de canais na superfície celular pode ser alterado por mudanças na taxa de síntese ou de degradação das Cxs [36]. A remoção dos mesmos da superfície das células ocorre quando uma das duas células que estão em contato internaliza todo o complexo juncional mediada pela actina e outras proteínas associadas, formando uma dupla junção de membranas, conhecida como junção anular. Após a internalização, a degradação é realizada por lisossomos e proteossomos (FIG.5) [5, 34, 37].

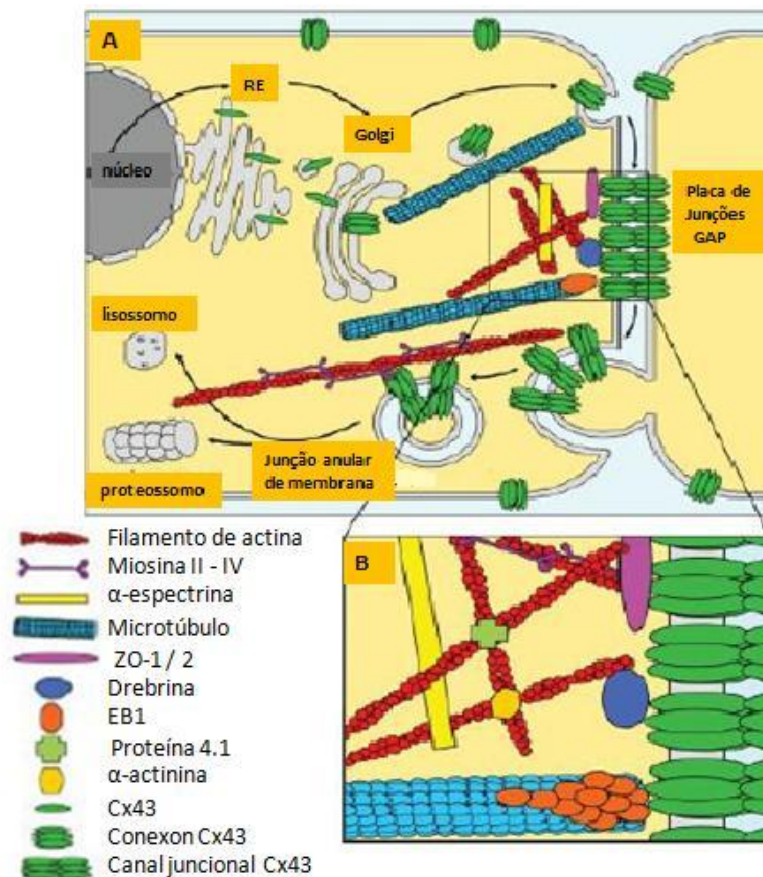


FIGURA 5 - Ciclo de vida da Cx43 e associação com elementos do citoesqueleto e outras proteínas. **(A)** Após tradução no retículo endoplasmático e oligomerização no aparelho de Golgi, a Cx43 é transportada para a membrana plasmática através de microtúbulos. A mobilidade do conexon na membrana plasmática depende do seu ancoramento a proteínas do citoplasma. A actina e proteínas associadas medeiam a internalização das junções em junções anulares de membrana. **(B)** Modelo do complexo multiproteico, formado na região citoplasmática, de uma placa de junções gap. Adaptado de Olk e colaboradores [5].

Estudos demonstraram que a meia vida da Cx43 em cultura de células e em tecidos é de uma a três horas [8]. A rápida taxa de síntese e degradação da proteína implica em um alto nível de regulações pós-traducionais e, de fato, a

Cx43 é fosforilada de maneira diferenciada ao longo do seu ciclo de vida em células homeostáticas [38].

A fosforilação pode ocasionar mudanças conformacionais, e está envolvida na regulação de eventos como transporte de Cxs, acoplamento e abertura de canais, e degradação protéica [16, 39, 40].

1.2.2 Fosforilação da Cx43

As moléculas de Cx43 são denominadas como: isoforma não fosforilada (NP ou P0) e isoformas fosforiladas P1 e P2, com base nos diferentes níveis de fosforilação da sua estrutura [23, 41]. A Cx43 pode ser fosforilada por, aproximadamente, treze tipos de quinases, e desfosforiladas por fosfatases tais como as PP1 e PP2A [41].

A Cx43 é fosforilada logo após a sua síntese, e alterações na fosforilação ocorrem durante o seu trajeto pelo retículo endoplasmático, aparato de Golgi e membrana celular. A Cx43 possui diferentes sítios de fosforilação [25, 42], sendo, pelo menos, doze serinas e duas tirosinas, localizados no domínio carboxi-terminal (FIG.6).

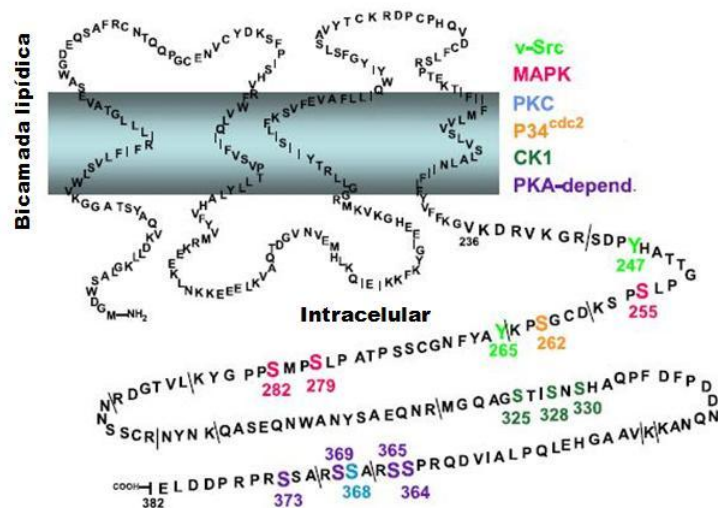


FIGURA 6 - Sítios de fosforilação da Cx43. As diferentes cores representam as conhecidas quinases envolvidas na fosforilação de cada sítio. Verde claro: proteína oncogênica pp60 (v-Src); vermelho: proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*); azul: proteína quinase C (PKC); laranja: proteína p34cdc2; verde escuro: caseína quinase 1 (CK1); lilás: proteína quinase A (PKA). As linhas que aparecem dividindo regiões do domínio representam sítios de clivagem. Adaptado de Solan e Lampe [8].

A fosforilação na serina 364 (S364) ou na serina 365 (S365) envolve a formação da isoforma P1. Este evento, aparentemente, regula o seu trânsito até a membrana celular. A fosforilação na serina 325 (S325), ou serina 330 (S330) é necessária para se obter a isoforma P2, que está presente somente nas junções gap [23]. Dependendo do nível de fosforilação, a Cx43 apresenta um padrão de migração eletroforético. A isoforma P0 migra mais rapidamente, as isoformas P1 e P2 migram posteriormente [38].

A desfosforilação da Cx43 parece estar ligada à diminuição das junções comunicantes [42]. Na FIG.7 pode ser observado um modelo esquemático da síntese e processamento da Cx43.

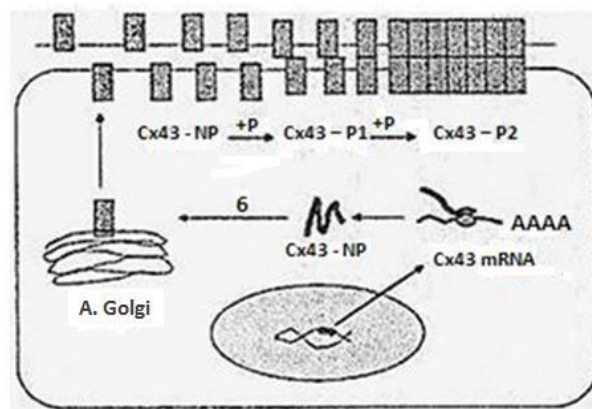


FIGURA 7 - Processamento da Cx43, desde a síntese até a formação de junções gap. O gene da proteína é expresso e o RNA mensageiro é traduzido em proteína. Seis subunidades da Cx43 são oligomerizadas no aparelho de Golgi, para formação de um conexon. O hexâmero é transportado para a superfície celular. Os conexons alinham-se com conexons de células adjacentes e formam um canal completo. Os canais formados agregam-se em grandes placas de junções gap que contêm entre 100 e 1000 canais. Como pode ser observado, durante o pareamento de conexons e agregação em placas, a Cx43 é fosforilada pelo menos duas vezes. Adaptado de Silva [25].

Conforme já foi descrito, a fosforilação da Cx afeta a sua localização na célula e desempenha papel crítico na comunicação intercelular [30]. Estudos indicam que a fosforilação da Cx43 pela proteína CK1 e PKA está relacionada com o acoplamento de conexons para a formação de junções gap [27], enquanto a fosforilação da Cx43 pelas proteínas PKC e MAPK, pode causar alterações na expressão e função, como no transporte, abertura/fechamento de canais, internalização e degradação pelos lisossomos e proteossomos [14].

1.2.3 Cx43 nos rins

Estudos recentes apontaram a expressão gênica de nove diferentes Cxs no

tecido renal: Cx26, Cx30.3, Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 e Cx46 [14, 22, 31, 43]. A expressão das Cxs varia entre as diferentes regiões renais, porém a localização exata destas proteínas ainda não é totalmente esclarecida [15, 31]. A Cx43 já foi descrita como distribuída em todo o rim adulto [31, 44].

A função principal da Cx nos rins é a comunicação intercelular, mas também pode formar canais que permitem a secreção celular [15].

Nos rins, as Cxs facilitam processos como a condução vascular, sinalização de cálcio no aparelho justaglomerular e sinalização purinérgica tubular. Evidências apontam para os papéis destas Cxs em muitos mecanismos regulatórios importantes nos rins: sistema renina-angiotensina, sistema de regulação túbulo-glomerular e reabsorção de sais e água [15].

Em nível sistêmico, as Cxs auxiliam na regulação da pressão sanguínea e podem estar envolvidas em patologias como hipertensão e diabetes [15, 35].

A expressão de Cx43 nos rins é diferente entre ratos, camundongos e humanos [14]. Na TAB. 1 está representado um resumo da localização desta Cx nas três espécies, já descritas na literatura.

TABELA 1: Resumo da localização da Cx43 em rins de humanos, camundongos e ratos, descrita na literatura. Adaptada de Hanner [15].

Localização no rim	Tipo de célula	Espécie	Referências
Arteríola aferente	Endotelial	Camundongo, rato	[22, 45]
Arteríola eferente	Endotelial	Camundongo	[45]
Capilares peritubulares	Endotelial	Camundongo	[45]
Feixes vasculares	Endotelial	Rato	[46]
Vasa recta	Endotelial	Rato	[47]
Veias renais	Endotelial	Camundongo	[48]
Capilares Glomerulares	Endotelial	Camundongo	[25]
Glomérulos	Podócitos	Homem, rato	[14, 49, 50]
Túbulos contorcidos proximais	Epitelial	Homem, rato, camundongo	[25, 31, 49, 51, 52]
Túbulos contorcidos distais	Epitelial	Rato	[25, 49]
Ductos coletores	Epitelial	Rato, homem	[46, 53, 54]

1.2.3.1 Cx43 nos rins de ratos

Conforme pode ser observado na TAB. 1, diversos estudos realizados com rins de ratos identificaram a presença da Cx43 em diferentes localizações.

Beyer e colaboradores [49] observaram a presença de Cx43 em células epiteliais dos túbulos contorcidos (proximais e distais) e no interior de glomérulos, enquanto Barajas e colaboradores [46] localizaram a Cx43 na artéria renal, nos feixes vasculares da região justamedular, no mesângio extraglomerular e na região inicial das arteríolas eferentes, na região do cortex intermediário e de néfrons superficiais. Nos ductos coletores da região medular interna foi observada uma abundante imunomarcagem da Cx43.

Em outro estudo, Guo e colaboradores [53] mostraram a expressão gênica e a localização da Cx43, na papila interna e externa renal. No córtex e medula, a expressão de Cx43 foi baixa. Nos ductos coletores internos corticais e medulares observados em microdissecção foi observado aumento significativo na quantidade de RNA mensageiro (RNAm). Não foi detectado nenhum nível de expressão nos túbulos proximais e distais e no ramo espesso da alça de Henle da medula externa. A análise de imunofluorescência apontou a presença de Cx43 no córtex renal especificamente em paredes da artéria renal, arteríolas glomerulares e aparelho justaglomerular. Observou-se marcações de menor intensidade em túbulos contorcidos proximais.

Arensbak e colaboradores [22] confirmaram a expressão da Cx43 em células musculares lisas isoladas de arteríolas pré-glomerulares de ratos.

1.2.3.2 Cx43 nos rins de camundongos

Em camundongos, a presença da Cx43 nos rins foi descrita nas seguintes estruturas: na vasculatura pré-glomerular, sendo observada na artéria renal e arteríola aferente; nas células endoteliais de arteríolas eferentes; em veias renais; e em capilares peritubulares [15].

Silva e colaboradores [31] estudaram o envolvimento da Cx43 em modelos animais de compensação renal após nefrectomia unilateral. Neste estudo, observou-se presença desta proteína no citoplasma e membrana de células epiteliais tubulares e vasculatura, e ocasionalmente em tufo glomerulares e células cubóides da camada parietal da cápsula de Bowman.

Nos glomérulos de camundongos, a expressão da Cx43 ocorre em células

mesangiais e nas paredes de capilares glomerulares de maneira esparsa [55].

1.2.3.3 Cx43 nos rins humanos

Diferentes estudos apontam o envolvimento da Cx43 em patologias como diabetes, hipertensão e isquemia renal.

Sawai e colaboradores [14], em estudo com pacientes diabéticos e controles, confirmaram a presença de Cx43 nos podócitos, sendo observadas diferenças de expressão e localização entre os dois grupos estudados.

Em outro estudo correlacionando a expressão da Cx43 e a diabete, Hills e colaboradores [54] cultivaram células de ductos coletores humanos e observaram aumento na expressão desta proteína e na comunicação célula-célula como resposta ao aumento nos níveis de glicose no meio de cultura, sugerindo proteção destas células dos danos relacionados com a nefropatia diabética.

Hillis e colaboradores [50], ao estudarem rins humanos observaram a presença de Cx43 no endotélio, nas grandes arteríolas e em células epiteliais no interior dos glomérulos. Nos túbulos contorcidos proximais a marcação foi citoplasmática, de maneira moderada, localizada principalmente na região basal. Não foi observada marcação em túbulos distais, enquanto detectou-se intensa marcação nos raios medulares. O endotélio extraglomerular apresentou expressão de Cx em níveis variáveis. Neste estudo, a expressão gênica da Cx43 foi observada em células mesangiais e túbulo contorcido proximal.

Vergara e colaboradores [51] observaram a expressão de Cx43 em células epiteliais de túbulos renais humanos. Neste estudo verificaram a ativação de conexons compostos por subunidades de Cx43 ocasionada por depleção de ATP após indução de hipóxia. Os autores sugeriram que mecanismos responsáveis pela abertura destes hemicanais podem contribuir na evolução da necrose tubular induzida pela isquemia aguda.

1.3 Injúria Renal Aguda

A injúria renal aguda (IRA) é uma síndrome complexa em que ocorre redução aguda da função renal e queda abrupta da filtração glomerular [56]. Esta patologia pode desencadear diversos sintomas, desde um discreto aumento de níveis de creatinina sérica, até anúria e falência renal [57].

Apesar dos importantes avanços obtidos no esclarecimento da

fisiopatologia da IRA, sua ocorrência ainda tem sido associada ao aumento nas taxas de mortalidade, tanto precoce quanto tardia. Esta patologia acomete cerca de 5% de pacientes hospitalizados e implica em elevados custos para a Saúde [58-60]. Esta síndrome é frequentemente resultante de uma queda abrupta no fluxo sanguíneo renal. A hipóxia induzida por isquemia renal é conhecida como a causa principal da IRA [51, 61].

A sensibilidade renal ao fenômeno de isquemia pode ser justificada, dentre outros fatores, pela complexidade de sua microvasculatura. A isquemia promove a restrição de oxigênio e nutrientes e o acúmulo de metabólitos nos tecidos, fato que promove primeiramente a injúria das células epiteliais tubulares [60].

Esta injúria é caracterizada, dentre outros efeitos, pelo acúmulo de cálcio intracelular, disfunção das mitocôndrias com conseqüente parada na fosforilação oxidativa, acidificação citossólica, depleção dos níveis de ATP, falência da bomba de sódio-potássio, prejuízo no transporte de solutos e íons, perda da polaridade celular, ativação de fosfolipases, alterações na membrana celular e deformação do citoesqueleto. [62-64].

Alterações na membrana celular, em estrutura e função são, em grande parte, responsáveis por disfunções celulares decorrentes da isquemia [65].

Uma importante característica observada no processo de isquemia é o edema celular. As mitocôndrias das células epiteliais tubulares podem encontrar-se edemaciadas. Este fato deve-se à perda do controle do volume nestas organelas celulares. O retículo endoplasmático também permanece dilatado [64].

Com o tempo, as células lesadas desprendem-se da membrana basal e causam obstrução tubular que, associada ao aumento da pressão intratubular e ao vazamento do filtrado tubular para o interstício renal, é o principal mecanismo tubular envolvido na fisiopatologia da IRA [62].

A injúria tubular sub-letal ou letal, e a vasoconstrição intra-renal, potencializada pela ativação do sistema de regulação túbulo-glomerular e pelo aumento da liberação de solutos na mácula densa, têm sido a justificativa principal para o rápido declínio da taxa de filtração glomerular (TFG), que é o marcador da IRA [66].

O aumento na liberação de solutos para a região distal do néfron é resultado da perda da integridade da junção intercelular, ocasionando menor reabsorção de sódio, e também da perda da polaridade celular no túbulo proximal, ocasionando

falência na bomba de sódio-potássio [64].

Atualmente, a fisiopatologia da IRA corresponde à interação entre a injúria tubular, processos inflamatórios e alterações na hemodinâmica do órgão [66, 67].

A IRA pode ser dividida em quatro fases clínicas [67-69]:

- iniciação: redução do fluxo sanguíneo renal que causa hipóxia e depleção de ATP, promovendo a injúria celular, cuja gravidade depende da severidade e duração do tempo de isquemia;
- extensão: que ocorre de maneira mais pronunciada na região corticomedular, onde são observadas alterações celulares e os danos nas células endoteliais vasculares têm papel acentuado no processo de manutenção da isquemia no epitélio tubular. Nesta fase, observa-se a hipóxia persistente e a resposta inflamatória.
- manutenção: onde se observam eventos de diferenciação celular, migração, apoptose e proliferação, na tentativa de restabelecer e manter a integridade do tecido. Ocorre ainda estabilização da TFG.
- recuperação: nesta fase uma série de eventos ocorre, dentre eles: espalhamento de células epiteliais, podendo haver migração para cobertura de áreas expostas da membrana basal, de-diferenciação e proliferação celulares para restauração do número de células, repolarização celular e diferenciação para recuperação da integridade funcional dos néfrons [70]. A regeneração tubular pode ser evidenciada pela presença de células epiteliais achatadas e elementos de mitose [64].

O processo de reperfusão é fundamental para recuperação do rim isquêmico, mas atua como agressão adicional a este quadro patológico, principalmente por ocasionar o aumento da produção de radicais livres durante a reoxigenação, que podem causar danos teciduais mais expressivos do que a própria isquemia [71, 72].

Existem dois mecanismos principais que podem agravar o dano tecidual no momento de reperfusão: o não-refluxo, que é a falha da perfusão e pode ocasionar hipóxia focal; e o paradoxo do refluxo, que pode ocasionar injúria tecidual em demasia, devido à ativação de leucócitos e neutrófilos [73]. Quando os neutrófilos migram para a área isquêmica, liberam espécies reativas de oxigênio, proteases, elastases, mieloperoxidases, citocinas e outros mediadores,

que podem aderir-se ao endotélio e infiltrar no tecido [71].

Alguns estudos sugerem que a ativação de hemicanais de Cx43 tem um papel na patogênese das lesões renais da isquemia. Esses canais podem ampliar efeitos deletérios da depleção de ATP, causando a dissipação de fluxos de solutos pela membrana plasmática. Estes fluxos não são suficientemente compensados, e por isso concentrações intracelulares são alteradas, causando danos celulares e, ainda, prejudicando a fase de recuperação [51, 52].

1.3.1 Cx43 e Isquemia

A hipóxia e isquemia causam inibições metabólicas que originam rápidos distúrbios na homeostasia iônica celular, como aumento de sódio e cálcio intracelular e diminuição nas concentrações de potássio, que contribuem para a injúria e morte celular [74].

Estudos *in vivo* e *in vitro* apontam o envolvimento da Cx43 nos canais de contato célula-célula e nos hemicanais na propagação da morte celular induzida por isquemia-reperfusão [19].

Existem evidências experimentais que sugerem que canais formados pela Cx43 continuem abertos durante a depleção de energia na isquemia em diferentes tipos celulares [35, 74].

De acordo com Vergara e colaboradores [51, 52] os conexons de diferentes tipos celulares apresentam papéis significantes na fisiologia (como na sinalização celular), ou na fisiopatologia referente à injúria celular durante a depleção de ATP.

Em estudo de revisão sobre o papel dos conexons na isquemia cerebral, Bargiotas e colaboradores [35] apontam a alteração na permeabilidade da membrana, que contribui para a morte celular, através de desregulação iônica, perda de metabólitos e de ATP intracelular.

Diversos estudos apontam que durante a isquemia cardíaca ocorrem modificações na distribuição e concentração da Cx43, sendo a perda da proteína heterogênea. A desfosforilação é aparente após uma hora do início da isquemia. Durante a reperfusão, as junções gap permitem o espalhamento da hipercontractibilidade e da morte celular de uma célula a outra [30].

A desfosforilação das Cxs que formam as junções gap durante a isquemia pode alterar suas propriedades de abertura e fechamento, tornando-as menos responsivas às alterações que normalmente reduziriam sua condutância, como a

acidose ou aumento na concentração de cálcio intracelular [41].

Peracchia [75], em estudo da isquemia cardíaca sugeriu que o rápido aumento na concentração de cálcio intracelular pode promover o fechamento do canal, porém a concentração necessária para este evento ainda é incerta. A desfosforilação da Cx43 durante a isquemia cardíaca promove a translocação desta proteína dos discos intercalados para o citoplasma em cardiomiócitos [76].

Estudos das últimas duas décadas sugerem que a diminuição do pH do citoplasma das células (evento que pode ser observado em células no processo de isquemia) promove diminuição das junções gap [29].

Vergara e colaboradores [52] sugeriram a hipótese de um papel fisiopatológico dos conexons formados pelas subunidades de Cx43 na injúria de células de túbulo proximal humanas, observado após uma inibição metabólica moderada (depleção de ATP).

Estes achados apontam a necessidade de um maior entendimento do envolvimento da Cx43 na isquemia renal, buscando novos conhecimentos da patologia da IRA em níveis moleculares.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Verificar o envolvimento da Cx43 em modelo murino de injúria renal aguda, comparando grupos de camundongos controle, isquêmicos (45 minutos) e reperfundidos (24 horas).

2.2 Objetivos específicos:

- Verificar os níveis de expressão de RNAm da Cx43 nos homogenatos renais dos animais estudados.
- Realizar semi-quantificação das diferentes isoformas fosforiladas desta proteína.
- Verificar a localização da Cx43 nos rins.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J (com idade entre 2 e 4 meses e peso entre 20 e 25 g). Os animais foram mantidos sob condições livres de patógenos, alimentados e hidratados *ad libitum* no Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

3.1.2 Procedimento cirúrgico: isquemia-reperfusão

Os animais foram anestesiados, pela via intraperitoneal (IP), com quetamina (125 mg/g peso; Parke-Davis, Morris Plains, EUA) e xilazina (12,5 mg/g peso; Phoenix Scientific, Saint Joseph, EUA) diluídas em solução fisiológica.

Realizou-se a tricotomia e antissepsia da região bilateral paramediana do espaço retroperitoneal. A pele e a musculatura foram seccionadas e as artérias renais (direita e esquerda) foram acessadas e ligadas por 45 minutos, usando-se microclips hemostáticos (D.L. Micof, São Paulo, Brasil).

Os grupos experimentais foram: isquêmico (eutanasiados logo após o período de isquemia) e reperfundidos (que receberam fluxo sanguíneo durante 24 horas após a isquemia, sendo eutanasiados após este período). Os animais utilizados como controle foram camundongos com a pele e musculatura seccionadas, não submetidos ao processo de isquemia/reperfusão. Foram utilizados seis animais por grupo.

O procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), **CEP 0290/07**.

3.2 Coleta e processamento do sangue e rins

No momento de eutanásia foram coletados, aproximadamente, 0,5 mL de sangue total com seringa heparinizada por punção da veia cava inferior. O sangue foi centrifugado a 600 g, por 10 minutos, a temperatura ambiente, e o plasma obtido foi estocado à -20°C.

Os rins foram extraídos e cortados sagitalmente, de forma que metade foi conservada a -80°C, para análises bioquímicas e biomoleculares, e a outra metade foi fixada em formol tamponado (10% formaldeído em tampão fosfato

salino) para análises histológicas.

3.3 Testes bioquímicos: função renal

Os níveis de uréia e creatinina plasmática foram determinados através da utilização de kits comerciais (Urea UV Liquiform - Cat. 104 e Creatinina K - Cat. 96, respectivamente; Labtest Diagnostics, Santa Lagoa, Brasil), seguindo-se instruções do fabricante.

3.4 Extração de RNA

Os fragmentos renais estocados em freezer -80°C foram utilizados para extração de RNA total.

Para extração utilizou-se 1 mL do reagente Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, EUA), para trituração de cerca de 100 mg de tecido renal com o auxílio de triturador de tecido Politron[®] (PT 1200CL ; Kinematica AG, Littau, Suíça) em um microtubo.

Em seguida, incubou-se o homogenato, por cinco minutos, a temperatura ambiente e adicionou-se 200 μL de clorofórmio. A mistura foi agitada manualmente com vigor e incubada por três minutos a temperatura ambiente. Este homogenato foi centrifugado a 12.000 g, por 15 minutos, em centrífuga (Centrifuge – 5810R; Eppendorf do Brasil, São Paulo, Brasil) refrigerada a 4°C .

Após a centrifugação, coletou-se a fase aquosa, contendo o RNA total solubilizado, e adicionou-se 500 μL de isopropanol para promover a precipitação do RNA.

Posteriormente a amostra foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 12.000 g por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C . O sobrenadante foi separado do RNA precipitado.

Adicionou-se ao tubo, contendo o centrifugado, 1 mL de solução de etanol a 75% para dissolução de sais provenientes do Trizol[®]. A mistura foi homogeneizada em agitador tipo Vórtex[®] (Vortex Mixer, The Lab Depot, Dawsonville, EUA) e centrifugada a 10.500 g por cinco minutos, a 4°C .

Finalmente, removeu-se o sobrenadante, e o centrifugado foi seco por 10 minutos e depois re-diluído em 50 μL de água livre de RNAses e DNAses. O RNA foi quantificado e estocado em freezer a -80°C .

3.5 Análise qualitativa e quantificação do RNA total

Uma alíquota de 10 μL foi retirada para a quantificação e verificação da integridade do RNA de cada amostra.

A quantificação foi realizada por densidade óptica em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000; Nanodrop Technologies, Wilmington, EUA). Foram submetidos 2 μL de RNA de cada amostra a uma leitura contínua do espectro, variando de 220 a 350 nm.

A integridade foi analisada através de eletroforese das amostras em gel de agarose 1,5%, diluída em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) pH 8, livre de RNases.

A migração foi realizada a 60 V, durante 1,5 hora. Após, o gel foi corado em solução de brometo de etídio para a visualização das bandas 28S e 18S em luz ultravioleta.

Após esta avaliação, as amostras foram estocadas a -80°C .

3.6 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado a partir de 2 μg de RNA total, que foi previamente tratado com DNase (RQ1 DNase free RNase; Promega, Madison, EUA) para a eliminação de DNA contaminante. Ao RNA tratado foi adicionado 0,2 μg de OligodT¹²⁻¹⁸ (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), 20 ng de albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), 0,1 μmol de desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP) (Promega, Madison, EUA) e 400 U de enzima de transcrição reversa M-MLV (Promega, Madison, EUA). A mistura, de volume final de 50 μL , foi incubada a 37°C por uma hora para que a ocorresse transcrição reversa (síntese de cDNA).

3.7 Reação da polimerase em cadeia (PCR), em tempo real

Na PCR em tempo real utilizou-se o sistema TaqMan[®] (TaqMan[®] Universal PCR Master Mix) de amplificação e *mix* de primers e sondas específicos “customizados” (Assay-on-demand[®] 20x; Applied Biosystems, Branchburg, EUA). Este sistema gera o sinal referente à amplificação de apenas uma molécula alvo (já que o fluoróforo (FAM) que reporta a amplificação, encontra-se ligado à sonda e não aos primers).

Todas as análises foram feitas em triplicata, contendo um volume final de reação de 10 μL , dos quais 5 μL correspondem ao TaqMan[®], 1 μL ao cDNA de

cada amostra, 0,5 µL ao *mix* de primers e sondas e, por fim, água ultrapura para completar o volume. A reação foi realizada em termocicladora (7500 Real Time PCR System; Applied Biosystem, Cingapura, EUA). As condições de amplificação para o sistema TaqMan® são padronizadas e universais para qualquer amplificado.

Uma relação comparativa entre os ciclos da reação (CT, do inglês *cycle threshold*) foi usada para determinar a expressão do gene GJA1 (Mn00439105_m1), em relação ao gene controle hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT) (Mn00443358_m1 – Applied Biosystem, Branchburg, EUA).

Para cada amostra, os valores de CT dos genes alvo foram normalizados pelo seu respectivo gene controle, e o valor usado para demonstrar a expressão relativa dos genes alvo foi obtido através da expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$ (previamente descrita por K. Livak – PE – Applied Biosystems; Sequence Detector User Bulletin 2). Dessa maneira, níveis relativos de RNAm foram expressos como uma diferença de “n” vezes em relação a amostra controle, utilizando-se, neste caso, sempre a mesma amostra na condição basal.

3.8 Extração de proteínas renais

Fragmentos de rins controle, isquêmicos e reperfundidos, com aproximadamente 100 mg, foram macerados e homogeneizados com tampão composto por tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, detergente tergitol 1% e dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%. Os extratos protéicos foram aquecidos em banho seco, durante dois minutos a 95°C e imediatamente centrifugados, por 15 minutos, a 18.000 g em centrífuga a temperatura ambiente. O sobrenadante de cada amostra foi coletado e, a este, adicionou-se 2 mM de coquetel de inibidores de proteases (Cat. P2714; Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). Os extratos foram aliquotados e armazenados a -20°C.

3.9 Quantificação protéica

A quantificação de proteína total dos extratos renais foi realizada com o Kit DC Protein (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA), seguindo-se instruções do fabricante.

3.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada com gel de poliacrilamida 12% e gel de empilhamento 3%. Às amostras protéicas foi adicionado tampão redutor de amostra (tris 50 mM pH 6,8, ditioneitol (DTT) 25 mM, glicerol 10%, SDS 10%, azul de bromofenol 0,008 mg/mL e β -mercaptoetanol 1%). Foram aplicados 50 μ g de proteínas totais por amostra. A corrida de separação foi realizada em 150 V, em aparato vertical (Mini-Protean III electrophoresis cell; Bio-Rad Laboratories, San Diego, EUA) até que o corante de bromofenol atingisse o final do gel.

O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

3.11 Western blotting

Para o ensaio de western blot também foi preparado gel de poliacrilamida 12%. Utilizou-se 150 μ g de proteínas totais de cada amostra.

Foi utilizado marcador de peso molecular padrão (High-Range Rainbow RPN756E; Healthcare, Uppsala, Suécia) em cada gel.

Após a migração protéica, realizou-se transferência úmida a 50 V durante 50 minutos, para membrana de nitrocelulose de poro 0,45 μ m (Hybond – ECL; Amersham, Pittsburgh, EUA). Após a transferência, as membranas foram lavadas com tampão tris salino (TBS, do inglês *tris buffer saline*: 0,5 M tris, 9% NaCl pH 7,5) durante cinco minutos, e incubadas por uma hora em solução de bloqueio, contendo 5% de leite desnatado em pó, diluído em TBS.

Após o bloqueio de reações inespecíficas, as membranas foram incubadas com anticorpos primários monoclonais: anti-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Chemicon/Millipore, Temecula, EUA) e anti-conexina 43 (BD Biosciences, Franklin Lakes, EUA), diluídos 1:500, sob leve agitação, a 4°C por 16 horas.

Para os ensaios de imunodeteção da Cx43, foi utilizado como controle positivo, um extrato protéico de coração de camundongo C57BL/6J, obtido com o mesmo protocolo descrito no item 3.8.

Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina (IgG) de camundongo, (H+L) conjugado com HRP (Millipore, Temecula, EUA), diluído 1:5000, sob agitação suave por 2 horas a 4°C.

A revelação foi realizada com o kit Immobilon (Western Chemiluminescent

HRP Substrate; Millipore, Temecula, EUA), conforme instruções do fabricante.

3.12 Fotodocumentação

Os géis e filmes (western blotting) foram digitalizados utilizando-se câmera digital Canon (Canon do Brasil, São Paulo, Brasil) acoplada ao sistema de fotodocumentação Multi Doc-it Digital Imaging System (UVP, Cambridge, Reino Unido).

3.13 Densitometria

As bandas do western blot foram analisadas por densitometria, utilizando-se o programa Image J (National Institutes of Health, Maryland, EUA).

Para comparação dos resultados obtidos foram construídos gráficos de barras no programa GraphPad Prism® versão 5.0 para Windows® (GraphPad® Software, San Diego, EUA).

3.14 Preparação de material para exames histológicos

3.14.1 Desidratação do tecido

Os fragmentos renais, previamente fixados em formol tamponado por 24 horas, foram submersos em álcool 70% até o procedimento de desidratação.

A desidratação foi realizada com três banhos de uma hora em álcool 96°, dois banhos de duas horas em álcool absoluto e finalmente incubação durante 16 horas em álcool absoluto.

3.14.2 Diafanização e inclusão do material biológico em parafina

A diafanização em xilol puro ocorreu em três etapas de 30 minutos. Os fragmentos diafanizados foram transferidos para recipientes contendo parafina líquida e mantidos em estufa a 60°C por duas horas. Após o banho de parafina, o material foi emblocado com parafina derretida.

Os blocos foram resfriados e mantidos em temperatura ambiente.

3.14.3 Cortes do tecido

Os cortes de tecido foram realizados em micrótomo (Leica RM2255; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) numa espessura de 4 a 5 µm, e pescados em

banho histológico a 40°C (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) com lâminas silanizadas (EasyPath; Erviegas, São Paulo, Brasil) para ensaios de imunohistoquímica e imunofluorescência, e com lâminas convencionais (EasyPath; Erviegas, São Paulo, Brasil) para coloração com hematoxilina e eosina (H/E).

3.14.4 Coloração com H/E para exame histopatológico

As lâminas foram desparafinadas em estufa a 60°C, seguido de três banhos de cinco minutos em xilol, e quatro banhos em álcool absoluto. Posteriormente, as lâminas foram imersas em hematoxilina de Mayer (Merck, São Paulo, Brasil) por quatro minutos, mergulhadas rapidamente em tampão diferenciador (álcool 70° 1%, HCl 0,5%), lavadas em água corrente e coradas em eosina (Merck, São Paulo, Brasil) por quatro minutos. Após a coloração, as lâminas foram lavadas novamente e desidratadas com quatro banhos de álcool absoluto e três banhos de xilol.

Após secas, as lâminas foram montadas em resina de Permount (Fisher Scientific, São Paulo, Brasil) e lamínula, analisadas e fotografadas em microscópio de luz Nikon Eclipse E800 e câmera fotográfica acoplada Nikon FDX-35 (Nikon, Melville, EUA).

3.14.5 Imunofluorescência

Após a retirada da parafina e hidratação do tecido, a recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato de sódio pH 6, em forno microondas, potência 100, por 12 minutos (dois ciclos de seis minutos), com posterior resfriamento em temperatura ambiente.

Em seguida, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com leite em pó desnatado a 5% em tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*), utilizando-se detergente triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) na concentração de 0,1%, para permeabilização do tecido, em temperatura ambiente, durante uma hora. A incubação foi realizada com o anticorpo primário policlonal anti-Cx43 (Zymed, Camarillo, EUA), diluídos 1:50 em leite desnatado a 5% em PBS com 0,1% de triton X-100, a 4°C em câmara úmida por 16 horas.

Os controles negativos da reação foram cortes de tecido incubados apenas em leite desnatado.

Após lavagem em PBS sob leve agitação, as lâminas foram incubadas

com anticorpo secundário anti-IgG de coelho, conjugado com alexa-fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, EUA), diluído 1:100 em leite desnatado a 5% em PBS com triton X-100, a temperatura ambiente em câmara úmida, protegido da luz.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS, sob leve agitação, e conservadas com meio de montagem (Prolong Gold Antifade Reagent; Invitrogen, Carlsbad, EUA) com 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), em câmara escura a 4°C até realização da captura das imagens em microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse E800 (Nikon, Melville, EUA).

3.14.6 Imuno-histoquímica

Da mesma forma que no ensaio de imunofluorescência, as lâminas silanizadas, com os cortes de tecido renal, foram submetidas à retirada de parafina e hidratação do tecido e reativação de antígenos em tampão citrato de sódio.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com incubação em peróxido de hidrogênio 30 volumes com metanol 30 (1:4) durante 30 minutos.

O bloqueio de ligações inespecíficas utilizado no protocolo de imuno-histoquímica foi o mesmo dos ensaios de imunofluorescência (item 3.14.5).

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário policlonal anti-Cx43 (Zymed, Camarillo, EUA), diluídos 1:50 em leite desnatado a 5% em PBS com triton X-100 0,1%, a 4°C em câmara úmida por 16 horas.

Para determinação do índice proliferativo, foi realizada a imuno-histoquímica com o anticorpo primário monoclonal para marcação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (Dako, Glostrup, Dinamarca), diluído 1:1000 em leite desnatado a 5% em PBS. A incubação com este anticorpo também foi realizada a 4°C durante 16 horas em câmara úmida.

Em todos os ensaios, os controles negativos da reação foram cortes de tecido incubados apenas em leite desnatado.

Após lavagem em PBS, foi realizada a incubação com kit de amplificação e revelação LSAB (Dako, Carpinteria, EUA) por 30 minutos (anticorpo secundário e substrato), a revelação foi realizada com sistema de diaminobenzidina básico DAB (Dako, Carpinteria, EUA).

Em seguida foi realizada contra-coloração dos tecidos com hematoxilina. Finalmente, os tecidos foram submetidos à desidratação em banhos de álcool

crescente (70% a absoluto) e xilol.

As lâminas foram montadas com resina de Permout (Permout™ Mounting Media, Fisher Scientific, São Paulo, Brasil) e lamínulas, e as imagens foram capturadas para análise em microscópio Nikon Eclipse E800 (Nikon, Melville, EUA).

3.15 Captura e processamento de imagens de microscopia

Para análise das lâminas de H/E, imunofluorescência e imunohistoquímica, o software utilizado para captação das imagens, diretamente do microscópio, com câmera acoplada foi Image-pro plus (Media Cybernetics, Bethesda, EUA). O software utilizado para processamento das imagens foi PaintShop Pro 8® (Corel, Mountain View, EUA).

3.16 Quantificação das células positivas para PCNA

A análise do índice de proliferação celular consistiu na contagem de 1.500 células epiteliais tubulares, aleatoriamente, observando a quantidade de células com marcação positiva em cada lâmina observada. Os valores médios de cada grupo foram comparados.

3.17 Análises estatísticas

Foi utilizado o programa de análise estatística GraphPad Prism® 5.0 para análises estatísticas. O método selecionado foi o One-Way ANOVA (para comparação entre todos os grupos) seguido de teste de Bonferroni (análise paramétrica, comparando todos os pares de colunas). O valor de probabilidade menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados apresentam média \pm erro padrão (EP).

4. RESULTADOS

4.1 Função renal

A avaliação da função renal, dos camundongos controle, isquêmicos e reperfundidos foi realizada para validação do modelo experimental.

A concentração média de uréia nos animais isquêmicos apresentou aumento significativo, quando comparada com os animais utilizados como controle ($49,9 \pm 2,7$ vs $24,5 \pm 2,2$ mg/dL; $P < 0,001$) (FIG.8A).

Nos animais submetidos à reperfusão também foi observado aumento significativo da concentração média de uréia plasmática em relação aos controles ($74,8 \pm 4,3$ mg/dL; $P < 0,0001$), indicando um maior comprometimento da função renal. A diferença dos níveis de uréia entre os camundongos reperfundidos e isquêmicos também foi significativa ($P < 0,001$) (FIG.8A).

Os níveis de creatinina sérica dos camundongos isquêmicos e reperfundidos também apresentaram aumento estatisticamente significativo quando comparados com os camundongos utilizados como controle.

Quando comparados com os camundongos controle, o valor do nível médio de creatinina dos camundongos isquêmicos correspondeu a 2,18 vezes ($1,2 \pm 0,10$ vs $0,55 \pm 0,09$ mg/dL; $P < 0,001$), e dos reperfundidos a 2,54 vezes ($1,4 \pm 0,1$; $P < 0,001$) (Fig.8B).

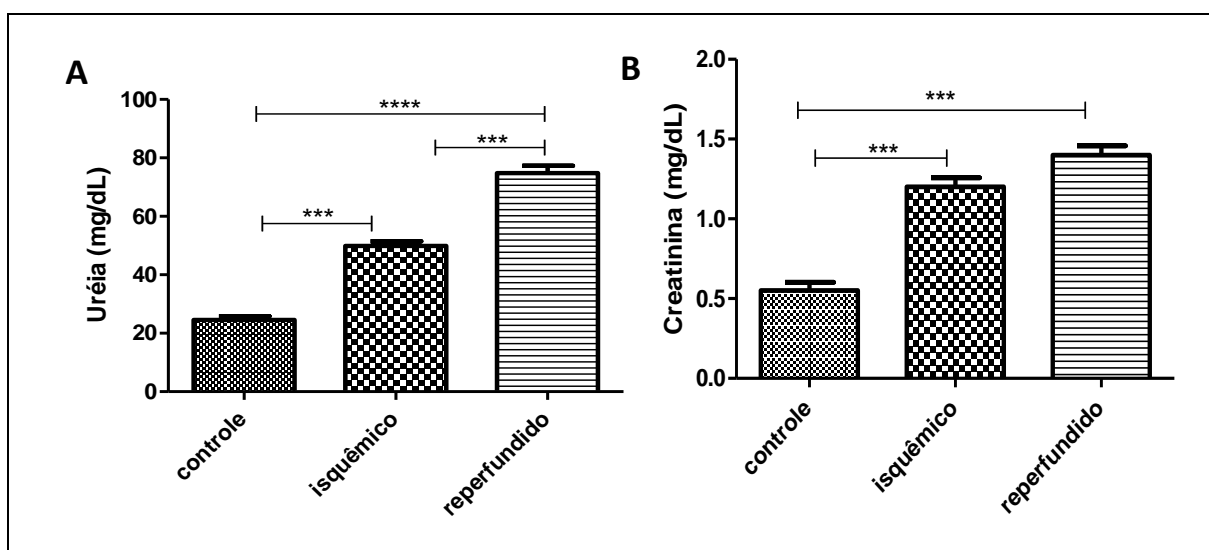


FIGURA 8 - Gráfico representativo da função renal (uréia e creatinina) dos camundongos controle, isquêmicos e reperfundidos. **(A)** Dosagem dos níveis de uréia plasmática após cirurgia. **(B)** Dosagem dos níveis de creatinina plasmática após cirurgia. Valores determinados com o uso de kits comerciais. *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

4.2 Análise qualitativa de RNA

Após extração do RNA total dos fragmentos renais, a análise qualitativa das amostras foi realizada em gel de agarose 1,5%. A integridade do RNA total pode ser observada na FIG.9.

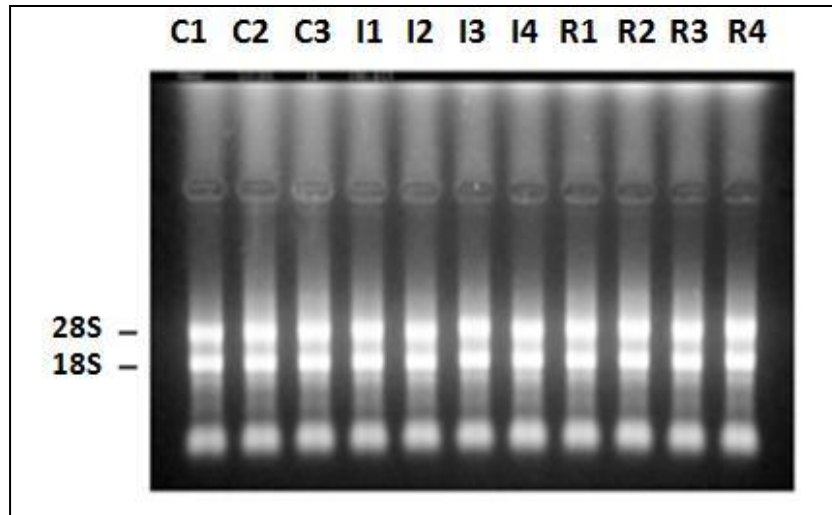


FIGURA 9 - Avaliação da integridade do RNA em gel de agarose 1,5%. 100pb – marcador 100pb. C1, C2 e C3= rins controle. I1, I2, I3 e I4= rins isquêmicos (45min). R1, R2, R3 e R4= rins reperfundidos (24h). Cada amostra utilizada no experimento era correspondente a um animal diferente.

A análise por espectrofotometria permitiu observar que não havia contaminação nas amostras.

4.3 Análise da expressão do gene GJA1 por PCR em tempo real

Os resultados obtidos na análise de expressão do gene GJA1 estão representados na FIG.10.

De acordo com os valores médios obtidos na PCR em tempo real, a expressão gênica observada nos rins de camundongos isquêmicos foi superior aos controles ($1,38 \pm 0,1$ vs $1 \pm 0,06$). Porém, em análise estatística, este aumento não foi significativo ($P > 0,05$).

Os rins de camundongos reperfundidos apresentaram o valor de expressão de $1,79 \pm 0,12$, sendo este aumento estatisticamente significativo em relação ao controle ($P < 0,01$).

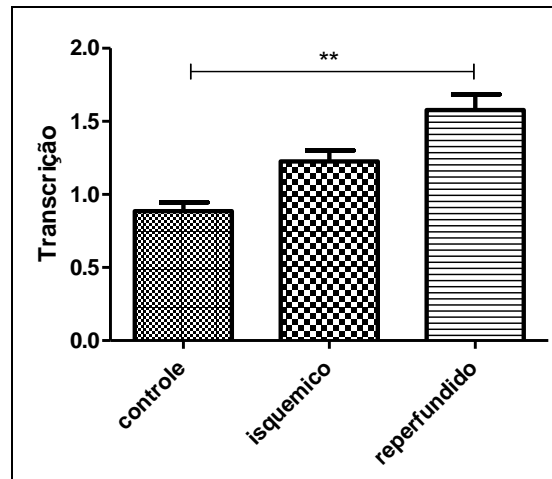


FIGURA 10 - Gráfico apresentando a expressão do gene GJA1 nos rins de camundongos controle, isquêmico e reperfundidos. Valores obtidos por ensaio PCR em tempo real. As análises foram feitas em triplicata. ** $P < 0,01$.

4.4 Avaliação qualitativa do extrato protéico

A integridade protéica das amostras foi confirmada com gel de poliacrilamida 12%, corado com Coomassie Brilliant Blue G-250, conforme pode ser observado na FIG.11.

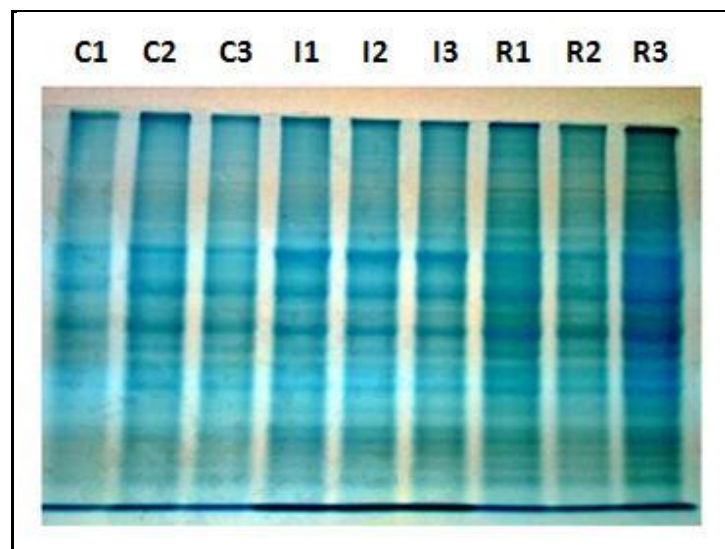


FIGURA 11 - Gel de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 para análise de qualidade protéica dos homogenatos renais. C1, C2 e C3: rins controle. I1, I2 e I3: rins isquêmicos (45min). R1, R2 e R3: rins reperfundidos (24h). Cada amostra observada no gel era correspondente a um animal diferente.

4.5 Análise qualitativa e semi-quantitativa da Cx43 no extrato protéico renal

O western blot foi realizado para verificação da presença e quantidade das isoformas (P2, P1 e P0) da Cx43. O extrato protéico de coração, abundante na isoforma P2, foi utilizado como controle positivo.

A análise qualitativa da Cx43 nos extratos protéicos renais mostrou a presença de duas bandas diferentes principais (FIG.12A). A banda superior corresponde à isoforma da Cx43 hiperfosforilada (P2) e a banda inferior corresponde às isoformas P1 (fosforilada) e P0 (não fosforilada).

Como podemos verificar na FIG.12A, não foi possível identificar a separação das isoformas P1 e P0 na migração protéica dos animais isquêmicos, possivelmente devido à alta concentração de Cx43 nestas bandas. Portanto, na análise semi-quantitativa de todas as amostras, considerou-se a banda superior (P2) e a banda inferior (P1/P0).

O GAPDH foi utilizado como controle endógeno (FIG.12B).

Na análise densitométrica, a isoforma P2 da Cx43 apresentou valor médio de $0,33 \pm 0,03$ nos rins de animais controle, enquanto nos rins de animais isquêmicos e reperfundidos os valores apresentados foram de, respectivamente, $0,9 \pm 0,05$ e $0,38 \pm 0,003$ (FIG.12C).

A isoforma P1/P0 apresentou os seguintes valores médios: $0,45 \pm 0,04$ para os rins controle, $1,05 \pm 0,05$ para os rins isquêmicos e $0,1 \pm 0,002$ para os rins reperfundidos (FIG.12D).

Com base nestes valores obtidos, a isoforma hiperfosforilada P2 apresentou aumento de 2,73 vezes ($P < 0,0001$) quando foram comparados os rins de camundongos isquêmicos em relação aos controles. A diferença dos valores desta isoforma entre os rins de camundongos reperfundidos e controle não foi significativa. Quando comparados os valores de densitometria desta isoforma entre os rins de camundongos isquêmicos e os reperfundidos, observou-se que nos isquêmicos o valor era 2,37 vezes maior ($P < 0,001$).

Os resultados obtidos na quantificação da isoforma P1/P0 mostram diferenças significativas na comparação entre os três grupos de camundongos. Os valores médios obtidos para os rins isquêmicos aumentaram 2,33 vezes ($P < 0,0001$) em relação aos controles. Já os rins reperfundidos apresentaram diminuição estatisticamente significativa quando comparados com os valores médios obtidos para esta isoforma nos controles ($P < 0,001$), mas apresentaram uma diminuição mais intensa (10 vezes; $P < 0,0001$) quando comparados com os isquêmicos.

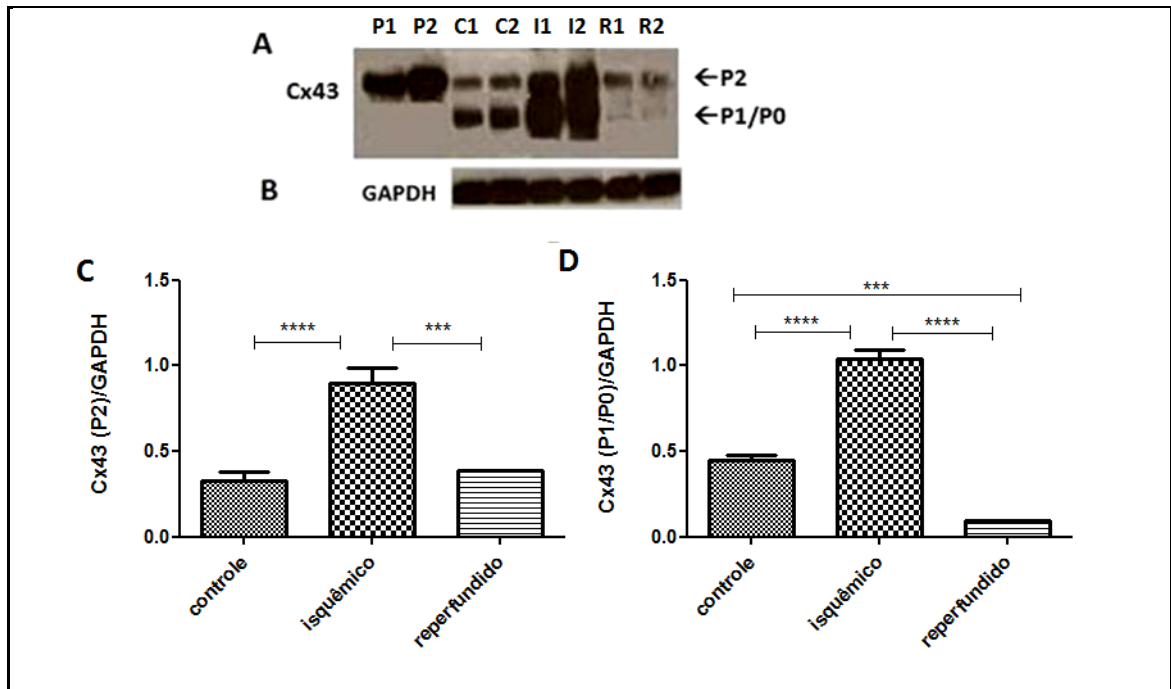


FIGURA 12 – Western blot e avaliação semi-quantitativa da Cx43 em rim de camundongos, controle, isquêmico e reperfundido. **(A)** Isoformas de Cx43. **(B)** GAPDH **(C)** Gráfico de comparação entre os grupos dos valores da Cx43 P2. **(D)** Gráfico de comparação entre os grupos dos valores da Cx43 P1/P0. P1 e P2: Controle positivo (coração de camundongo C57Black/6). C1 e C2: Rins controle (sham). I1 e I2: Rins isquêmicos (45min). R1 e R2: Rins reperfundidos (24h). O experimento de western blot foi realizado três vezes, apresentando resultados semelhantes.*** P<0,001; ****P<0,0001.

4.6 Análise histológica – HE

Após coloração das lâminas histológicas dos fragmentos renais com hematoxilina e eosina (obrigatória em estudos histológicos), a morfologia dos tecidos foi analisada, sobretudo na região cortical, mais susceptível às injúrias de isquemia/reperfusão [77].

A análise dos rins de camundongos controle permitiu visualizar a integridade dos túbulos proximais e distais e dos glomérulos (FIG.13A).

Observou-se que após os 45 minutos de isquemia, os rins apresentaram congestão no espaço peritubular e dilatação tubular (FIG.13B). Além disso, foi verificada, nas células dos túbulos contorcidos proximais e distais, sobretudo na região cortical próxima à cápsula conjuntiva, a presença de vacúolos decorrentes de edema celular (FIG.13C).

Nos rins dos animais reperfundidos não foi observada congestão no interstício, e a dilatação dos túbulos corticais não foi verificada com frequência.

Não foram observadas lesões no parênquima renal após o processo de reperfusão, indicando possível início de recuperação tecidual (FIG.13D).

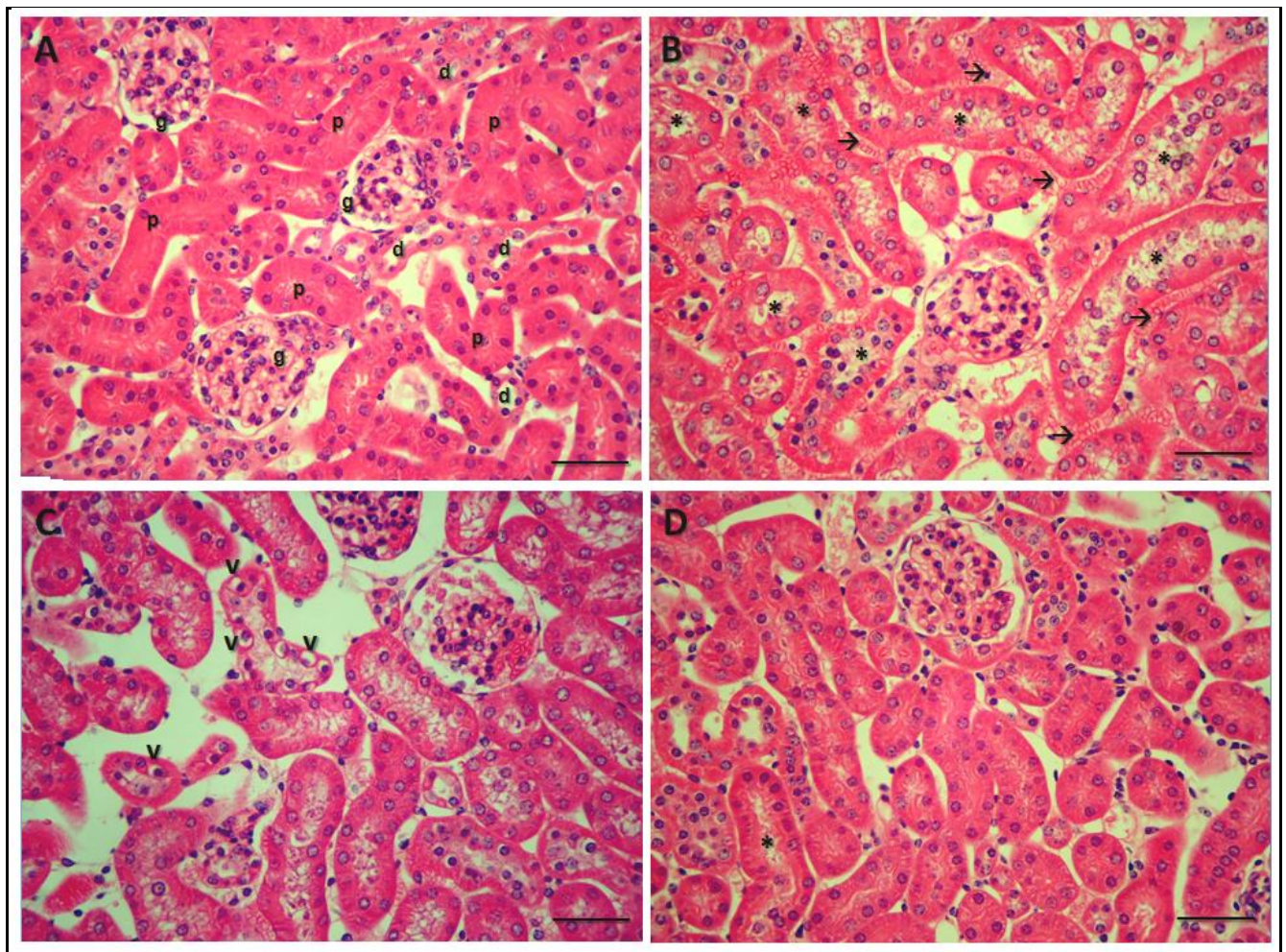


FIGURA 13 – Fotomicrografia do corte de tecido renal corado com hematoxilina e eosina para análise histopatológica. **(A)** Rim controle, onde pode ser observada a integridade dos túbulos proximais (p), túbulos distais (d) e glomérulos (g). **(B)** Rim isquêmico (45 min.), onde pode ser verificada a dilatação tubular (*) e congestão em espaço peritubular (setas). **(C)** Rim isquêmico (45 min.) onde podem ser observadas células epiteliais tubulares com presença de vacúolos (v). **(D)** Rim reperfundido (24h), em que pode ser verificada frequência muito menor de túbulos dilatados (*). Aumento: 400x. Barra de escala: 50µm.

4.7 Imuno-histoquímica

As análises de imagens obtidas em ensaios de imuno-histoquímica, observadas em microscopia de luz, permitiram verificar a localização da Cx43 nos rins dos três grupos de animais.

Em todos os grupos, observou-se marcação principalmente na região cortical, nos túbulos proximais e distais.

Nos rins dos camundongos controle observou-se marcação difusa da Cx43 nas células epiteliais tubulares (FIG.14A e D).

Nos rins de camundongos isquêmicos observou-se evidente marcação no citoplasma e membrana das células epiteliais tubulares, com intensa marcação em região de superfície apical (FIG.14B e E).

Nos rins de camundongos reperfundidos foi observada marcação da Cx43 com maior distribuição na região baso-lateral das células epiteliais tubulares (FIG. 14C e F).

O controle positivo (coração de camundongo) apresentou marcação para Cx43 nos discos intercalados (FIG.14G). O controle negativo da reação não apresentou nenhum tipo de marcação (FIG.14H).

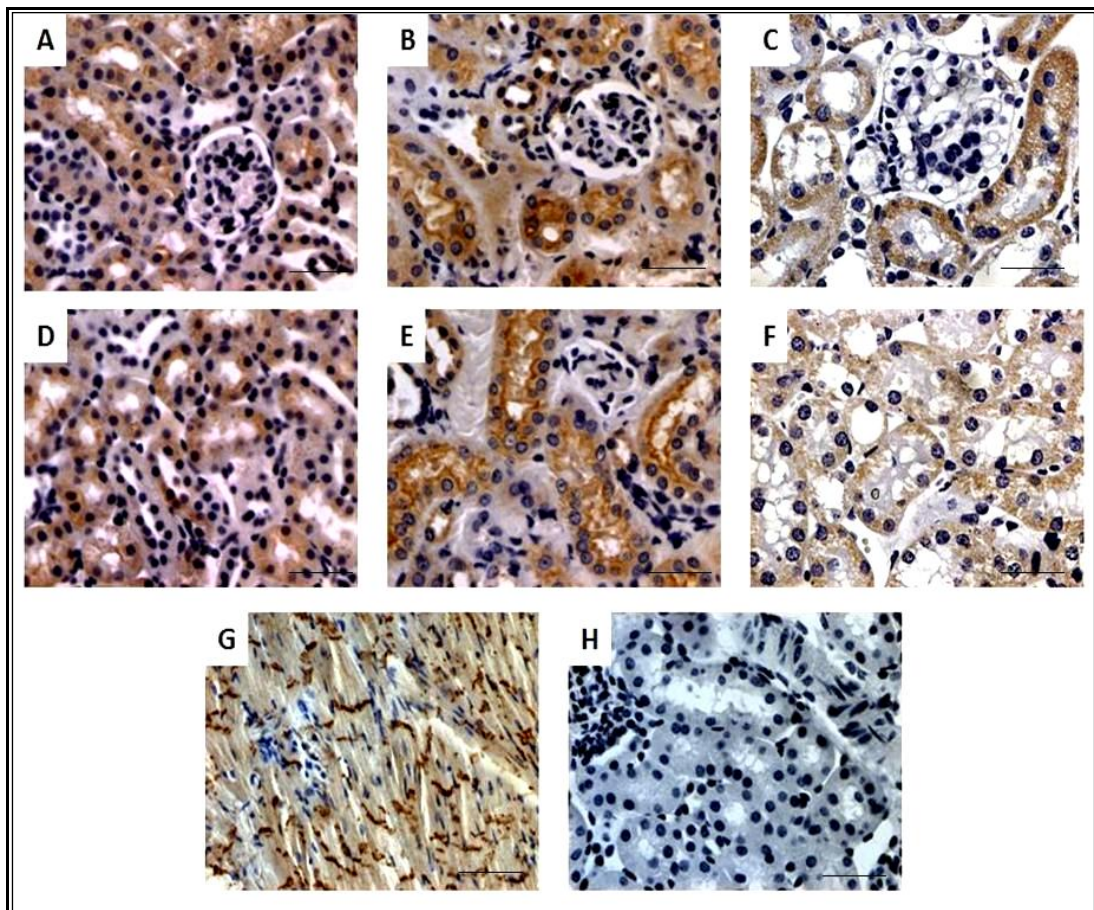


FIGURA 14 – Fotomicrografia da marcação da Cx43 por imuno-histoquímica em tecido renal. (A e D) Rins controle. (B e E) rins isquêmicos (45 minutos). (C e F) Rins reperfundidos. (G) Controle positivo (imuno-histoquímica para Cx43 em coração de BalbC). (H) Controle negativo da reação. Aumento: 400x. Barra de escala: 30µm.

4.8 Imunofluorescência

Além dos ensaios de imuno-histoquímica, foram realizados ensaios de imunofluorescência para determinação da marcação da Cx43 nos tecidos renais.

4.8.1 Córtex

Os resultados observados corroboraram com as localizações já observadas no ensaio de imuno-histoquímica (FIG.15).

Nos rins dos camundongos controle observou-se marcação positiva da Cx43 no citoplasma e membrana plasmática das células epiteliais tubulares (FIG.15A).

Houve intensa marcação de membrana em superfície apical das células epiteliais dos túbulos corticais nos rins de animais isquêmicos (FIG.15B).

Nos rins dos camundongos reperfundidos verificou-se marcação positiva da Cx43, sobretudo na região baso-lateral das células do epitélio tubular. Observou-se a presença desta proteína no citoplasma e membrana plasmática das células (FIG.15C).

O controle negativo da reação não apresentou marcação positiva da Cx43, podendo ser observada somente a fluorescência endógena do tecido (FIG.15D).

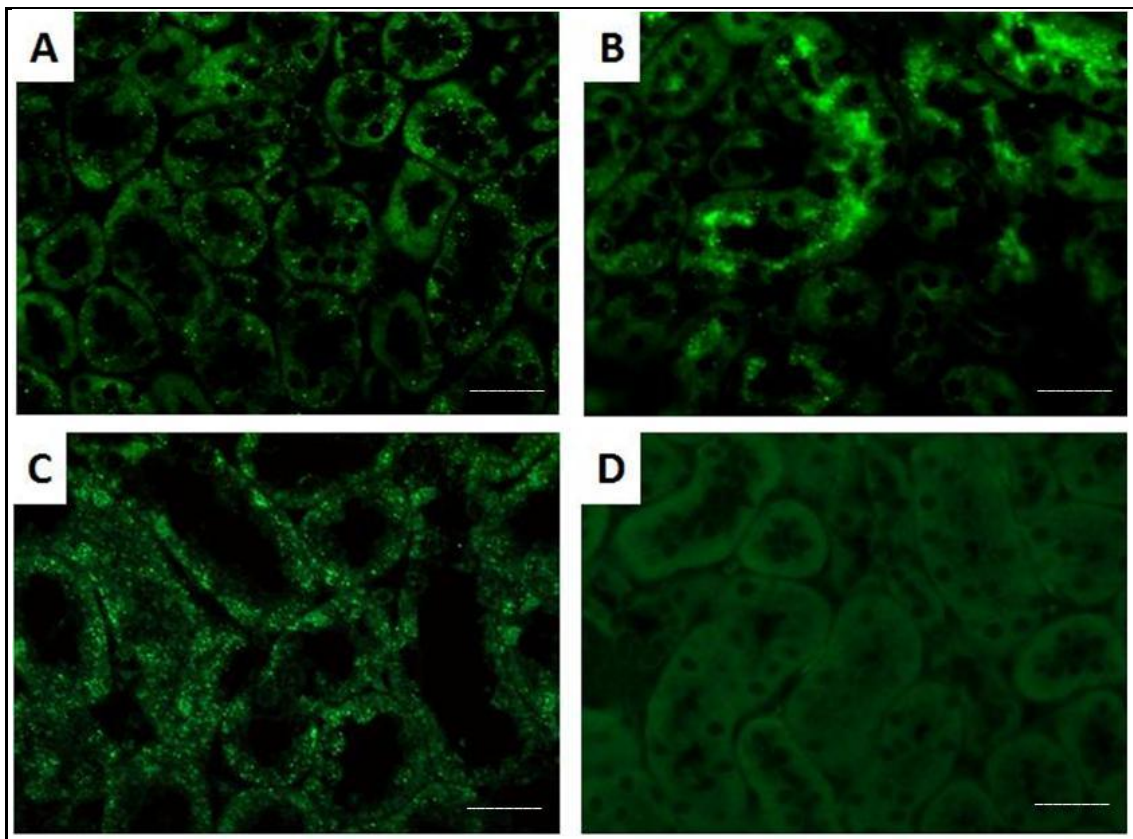


FIGURA 15 – Fotomicrografia da marcação da Cx43, por imunofluorescência, em tecido renal (região cortical). **(A)** Rim controle. **(B)** Rim isquêmico (45 minutos). **(C)** Rim reperfundido (24 horas). **(D)** Controle negativo da reação, onde pode ser observada fluorescência endógena do tecido. Aumento: 400x. Barra de escala: 20µm.

A análise desta técnica também permitiu a visualização da marcação positiva de Cx43 nas células endoteliais, nos capilares glomerulares, de maneira esparsa (FIG.16), nos três grupos estudados.

Não foi observada alteração do padrão de distribuição da Cx43 entre os rins controle (FIG.16A), isquêmicos (FIG.16B) e reperfundidos (FIG.16C).

No controle da reação apenas foi verificada fluorescência endógena do tecido renal e hemácias (FIG.16D).

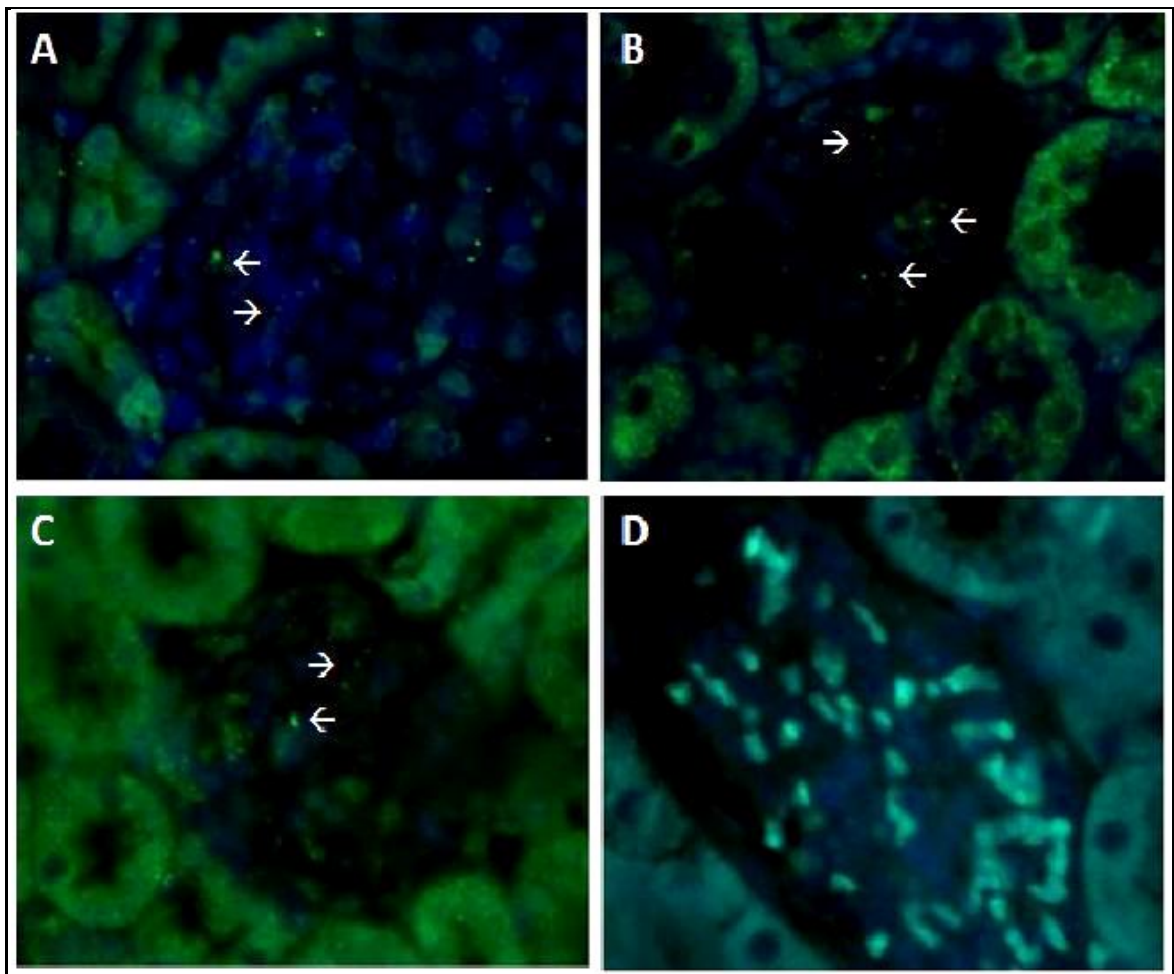


FIGURA 16 - Fotomicrografia da marcação da Cx43, por imunofluorescência, em tecido renal (região cortical), para observação da marcação positiva em capilares glomerulares. **(A)** Rim controle. **(B)** Rim isquêmico (45 minutos). **(C)** Rim reperfundido (24 horas). **(D)** Controle da reação. O núcleo foi marcado com DAPI (azul). Aumento: 400x.

4.8.2 Medula

A imunofluorescência também permitiu a observação da presença de Cx43 na região medular dos rins dos camundongos estudados.

A técnica permitiu verificar que não houve alteração nos padrões de

marcação entre os rins de camundongos controle (FIG.17A), isquêmicos (FIG.17B) e reperfundidos (FIG.17C).

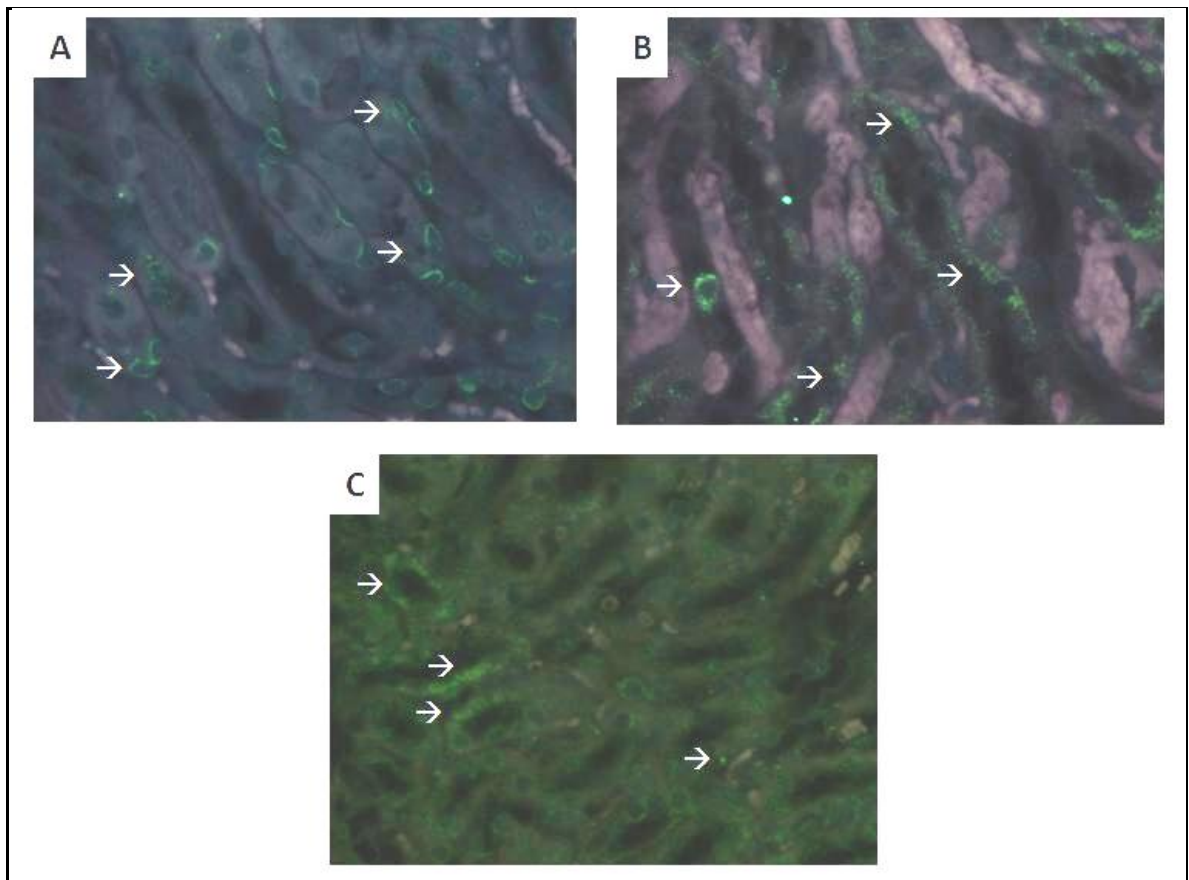


FIGURA 17 - Fotomicrografia da marcação da Cx43, por imunofluorescência, em tecido renal (região medular). **(A)** Rim controle. **(B)** Rim isquêmico (45 minutos). **(C)** Rim reperfundido (24 horas). As setas indicam a imunomarcação da Cx43. O núcleo foi marcado com DAPI (azul). A coloração arroxeada corresponde à fluorescência endógena de hemácias. Aumento: 400x.

4.9 Análise de proliferação celular

Foram realizados ensaios de imuno-histoquímica para verificar o índice de proliferação celular nos três grupos estudados. As células positivas neste tipo de marcação foram, majoritariamente, as células epiteliais tubulares.

Observou-se a marcação nuclear de, em média, 2% da contagem de células epiteliais das áreas selecionadas nos rins de camundongos controle (FIG.18A), isquêmicos (FIG.18B) e reperfundidos (FIG.18C). O controle da reação não apresentou marcações nucleares positivas (FIG.18D).

A análise estatística dos valores obtidos na contagem de células com marcação positiva não apresentou diferença significativa entre nenhum dos grupos estudados (FIG.18E).

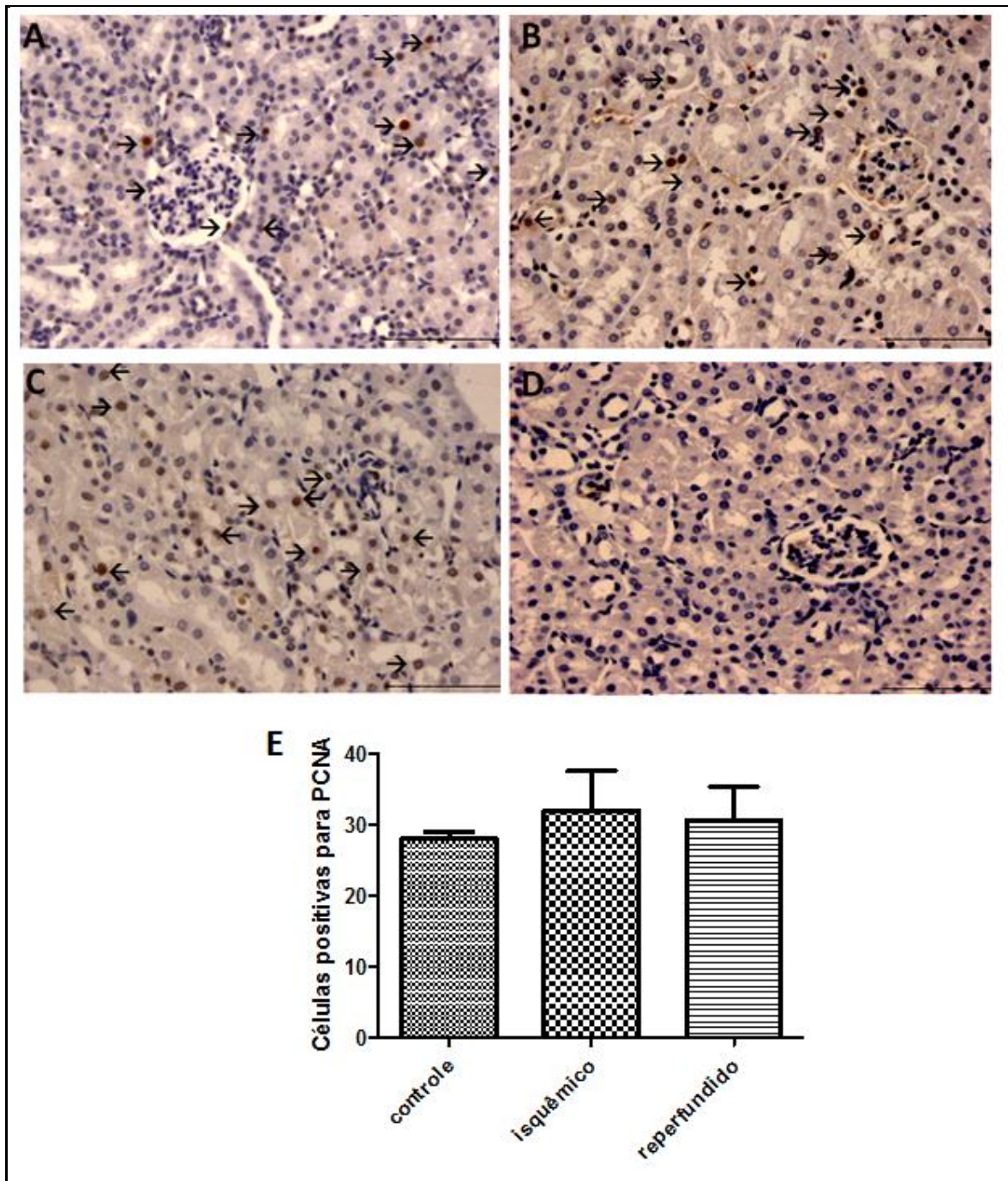


FIGURA 18 – Imuno-histoquímica de tecido renal para marcação do PCNA. **(A)** Rim controle. **(B)** Rim isquêmico. **(C)** Rim reperfundido. **(D)** Controle da reação. Foram observados túbulos e glomérulos. A marcação nuclear positiva pode ser observada em alguns túbulos (setas em **A**, **B** e **C**). Aumento: 400x. Barra de escala 50 μ m. **(E)**: Gráfico dos valores médios obtidos em quantificação de marcação de PCNA. Não houve diferença significativa entre os grupos em teste não paramétrico de Bonferroni ($P > 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A isquemia, principal causa da injúria renal aguda, é responsável por alteração na perfusão renal, ocasionando o aumento da vasoconstrição, disfunção e necrose tubular, obstrução intratubular, alterações metabólicas e do mecanismo de regulação túbulo-glomerular, e produção de mediadores inflamatórios que resultam na inflamação intersticial e congestão vascular [78]. A deficiência de oxigênio leva à depleção nos níveis de ATP celular, ocasionando os danos supracitados, e evidências sugerem que as junções gap e/ou conexons presentes no tecido renal estejam envolvidas nestes processos [51]. Nos períodos de reperfusion temos a recuperação celular com a regularização dos níveis de ATP [77].

Diversos mecanismos estão envolvidos no desacoplamento das junções gap durante a isquemia, como, por exemplo, aumento nas concentrações de cálcio e hidrogênio intracelular. Além disso, a isquemia aguda pode ativar ou inibir diferentes proteínas quinases e fosfatases, e estudos sugerem que a diminuição do acoplamento entre células durante a isquemia possa ser influenciada por modificações na fosforilação da Cx43 [79, 80]. A desfosforilação da Cx43 aumenta a permeabilidade de conexons, podendo contribuir com a propagação de injúrias ocasionadas pela isquemia/reperfusion [80, 81].

Nosso estudo demonstrou, pela primeira vez, a expressão do gene GJA1 e a localização da Cx43 em modelo murino de injúria renal por isquemia/reperfusion. Este modelo animal foi validado por duas técnicas: avaliação da função renal através da dosagem de uréia e creatinina, e análise de alterações histológicas pertinentes ao modelo.

A expressão do gene GJA1, observada nos rins de camundongos isquêmicos, não apresentou aumento significativo quando comparada aos controles. Este resultado nos indica que a hipóxia aguda, promovida por isquemia de 45 minutos, não promoveu um estímulo significativo da transcrição deste gene. Este dado corrobora os achados de Hatanaka e colaboradores [82], em que não houve alteração significativa nos níveis de RNAm em coração de ratos submetidos à uma hora de isquemia por oclusão da artéria coronariana.

Nos rins de animais reperfundidos foi observado um aumento significativo

na expressão do gene GJA1, quando comparada com os níveis apresentados nos camundongos controle. Estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos por Li e colaboradores [83], que observaram, em estudo de isquemia cerebral a diminuição nos níveis de RNAm desta proteína após 24 horas de reperfusão no tecido, e aos achados de Zeinieh e colaboradores [84], que não identificaram alterações significantes nos níveis de expressão do gene GJA1 em estudo de isquemia e reperfusão em tecido cerebral de neo-natais. Não foram encontrados registros na literatura de avaliação da expressão do gene GJA1 em rins submetidos à reperfusão.

A análise protéica semi-quantitativa, por western blot, revelou aumento dos níveis da Cx43 total nos rins de camundongos isquêmicos e diminuição dos mesmos nos rins reperfundidos, não havendo concordância com os achados de expressão gênica.

Sabe-se que tanto em condições normais, quanto em condições patológicas, os níveis de Cx43 intracelulares, podem ser modulados por diferentes mecanismos incluindo, a transcrição gênica, a síntese protéica, balanço entre síntese e degradação e fosforilação [85]. Nossos dados revelam que, a injúria celular promovida na isquemia e reperfusão, tem como resposta principal as alterações pós traducionais da Cx43 tal como a fosforilação protéica.

A fosforilação e desfosforilação são mecanismos de regulação funcional da Cx43. Em condições normais, no miocárdio, as isoformas fosforiladas são mais abundantes, e indicam a integridade das junções gap. Por outro lado, o aumento da forma não fosforilada está correlacionado com a perda das junções [79, 86]. Os mecanismos de regulação da fosforilação da Cx43 estão intimamente ligados ao declínio e recuperação dos níveis de ATP intracelular nas lesões teciduais reversíveis. A desfosforilação da Cx43 parece ser consequência da queda nos níveis de ATP intracelular, e a recuperação de isoformas fosforiladas durante o processo de reperfusão não é dependente da síntese protéica [86].

Dados da literatura comprovam a presença das isoformas de Cx43 P2, P1, e P0 em rins controle, bem como o aumento das isoformas P2 e P0 e diminuição da P1 na hiperplasia/hipertrofia compensatória à nefrectomia [31].

No modelo animal utilizado neste trabalho, observou-se que a isquemia proporciona um aumento das isoformas fosforiladas P2 (2,73 vezes) e isoformas menos fosforiladas P1/P0 (2,33 vezes). Na fase de reperfusão, observou-se

redução marcante da concentração da isoforma P1/P0, fato que está de acordo com a fisiopatologia da injúria renal aguda da IRA, onde existirá recuperação das funções renais. No modelo animal utilizado, o tempo de isquemia permite a regeneração de células com conseqüente recuperação da função renal. Portanto, pode-se afirmar que esses achados não conflitam com os níveis, ainda altos, de uréia e creatinina, apresentados pelos camundongos reperfundidos. A resposta celular que foi observada pode ser interpretada como um sinal de recuperação tecidual que a seu tempo terá reflexos na recuperação da TFG e conseqüente queda dos níveis séricos de uréia e creatinina. Este dado confirma com o estudo de Beardslee e colaboradores [79], que observaram, em estudo de isquemia cardíaca, que a recuperação após reperfusão estava associada com a re-fosforilação da Cx43, diminuindo-se os níveis de P0 no tecido recuperado.

O aumento observado nas isoformas menos fosforiladas no rim isquêmico corrobora com dados descritos em artigo de revisão de Schulz e colaboradores (76) e com o estudo de Tansey e colaboradores [87], que relatam que a desfosforilação da Cx43 ocorre ao longo do período de isquemia.

Na imunomarcação da Cx43, foi evidenciada a sua presena em citoplasma e membrana plasmática de células tubulares, de maneira mais expressiva na região do córtex renal. Estes dados corroboram com os achados de Silva [25], Silva e colaboradores [31], e Li e colaboradores [88], que evidenciaram a imunomarcação nesta mesma região em rins de camundongos.

A presena da Cx43 na membrana e citoplasma das células tubulares de rins controle valida a verificao das isoformas P2 e P1/P0 observadas na migrao eletroforética. Estes dados são semelhantes ao que foi observado por Vergara e colaboradores [52], que identificaram a presena da Cx43 na membrana e citoplasma de células de túbulos proximais em cultura.

A localizao ectópica da Cx43 na superfície apical das células epiteliais tubulares é uma resposta celular   hipóxia. Esta alterao na localizao subcelular demonstra que, durante o processo de isquemia renal, a Cx43 se comporta como outras moléculas de adesão (integrinas e proteínas da zona de oclusão) que também sofrem alteraoes na sua localizao neste período [65]. A depleo de ATP afeta a funo de barreira de células epiteliais, alterando a formao de junoes intercelulares e de adesão, aumentando a sua permeabilidade [52].

Os domínios de membrana basal e apical nas células epiteliais tubulares apresentam diferenças bioquímicas e funcionais em relação a diversos aspectos, como presença de enzimas, canais iônicos, receptores de hormônios, resistência elétrica, transporte e fluidez de membrana e associações com estruturas do citoesqueleto. A polaridade destas células é essencial para o seu adequado funcionamento, assim como já está descrito que processos patológicos como a isquemia podem promover a sua despolarização [65]. Desta forma, nota-se a importância da verificação da mudança na localização da Cx43 e outras proteínas no período de isquemia renal, identificando aspectos moleculares relacionados a este evento.

Em dois diferentes estudos sobre a ativação de conexons em células epiteliais de túbulo proximal durante hipóxia, Vergara e colaboradores [51, 52] comprovaram que a depleção de ATP influencia na permeabilidade destes hemicanais. Apesar de este estudo tratar de células humanas, cultivadas em monocamada, seus resultados sugerem que a Cx43 possa estar envolvida na injúria isquêmica aguda, e sugerem que a ativação de conexons formados por esta proteína sejam importantes na propagação de necrose tubular.

Não há registro, até o momento, de estudos que apontem a localização apical da Cx43 nas células epiteliais tubulares. Porém, em um estudo da localização da Cx30 em néfrons distais de ratos, McCulloch e colaboradores [89] observaram a localização apical desta proteína em células de túbulos contorcidos distais, sugerindo a formação de conexons que estariam envolvidos com a regulação de reabsorção de sais dos néfrons.

Estudos sobre a isquemia em miocárdio identificaram alterações na localização subcelular da Cx43 nos discos intercalados e sugerem que a desfosforilação possa atuar como um passo inicial para a mudança na localização desta Cx de uma junção gap para o citoplasma, ou para outra região na membrana plasmática [41, 79, 90]. A intensa marcação citoplasmática da Cx43 nos rins isquêmicos, observada através das técnicas de imuno-histoquímica e imunofluorescência, corrobora com o aumento das isoformas menos fosforiladas nestes rins.

Nos rins de camundongos reperfundidos, não foi observada com grande frequência a localização da Cx43 em membrana celular apical, dado este que pode ser corroborado pela diferença no padrão de migração da Cx43 observada

no western blot, quando comparado com os rins de indivíduos isquêmicos. Este achado reforça a interpretação de um sinal de recuperação tecidual após a reoxigenação

Com relação à imunomarcação da Cx43 em células endoteliais, observada nos ensaios de imunofluorescência, a localização esparsa em capilares glomerulares está de acordo com os resultados de Silva [25], que verificou fraca marcação da Cx43 em tufo glomerulares. O padrão de distribuição da Cx43 em células endoteliais não apresentou alterações entre os três diferentes grupos. Esses dados indicam que, nos grupos estudados, a lesão endotelial não promoveu alterações quantitativas na Cx43.

Na região medular também não observamos alterações no padrão de positividade de Cx43 nas imunomarcações. Estas observações permitem afirmar que as alterações observadas nas alterações protéicas e de expressão gênica da Cx43 estão diretamente relacionadas com os achados observados nos túbulos corticais nos ensaios histológicos.

A proliferação de células nos túbulos e glomérulos é um indicativo da recuperação tecidual após os insultos ocasionados pela isquemia/reperfusão. Como esperado, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos experimentais, pois, neste modelo, a proliferação celular é observada mais tardiamente [69, 91, 92]. Desta forma, aparentemente, as alterações observadas na expressão e localização da Cx43 nos túbulos corticais dos animais isquêmicos e reperfundidos não apresentaram correlação com a proliferação celular.

Frente aos resultados obtidos com a realização deste trabalho, pôde-se inferir a importância deste estudo, que permitiu avaliar o envolvimento da Cx43 na injúria isquêmica renal aguda, tal como foi proposto.

6. CONCLUSÕES

- A Cx43 apresentou alterações no padrão quantidade e fosforilação protéica, e de localização no tecido renal, quando comparados os três grupos de animais.
- O padrão de expressão do gene GJA1 foi alterado de maneira significativa apenas nos rins de camundongos reperfundidos observados neste estudo.
- As alterações histológicas observadas foram na região cortical do tecido renal.
- As alterações na Cx43 durante a isquemia/reperfusão foram principalmente pós-traducionais (fosforilação).
- As alterações na fosforilação e localização observadas nos rins isquêmicos foram semelhantes ao que foi previamente observado em isquemia cardíaca.
- De acordo com as observações deste trabalho, a Cx43 apresentou participação nos processos de isquemia/reperfusão renal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chaible, L.M., *Efeitos da deleção do gene Cx43 sobre o desenvolvimento fetal de camundongos de diferentes backgrounds genéticos: ênfase na osteogênese*, in *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2008, USP: São Paulo. p. 106.
2. Junqueira, L.C. and J. Carneiro, *Biologia Celular e Molecular*. 7ª edição, ed. K. Guanabara. Vol. único. 2000, Rio de Janeiro. 339.
3. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. 2008, New York: Garland Science. 1725.
4. Kanno, L., W.R. Loewenstein Intercellular diffusion. *Science* 143, and 959–960., *Intercellular diffusion*. *Science*, 1964. **143**: p. 959-960.
5. Olk, S., G. Zoidl, and R. Dermietzel, *Connexins, cell motility, and the cytoskeleton*. *Cell Motility and the cytoskeleton*, 2009. **66**: p. 1000-1016.
6. Cogliati, B., *Participação das conexinas 43 e 32 no desenvolvimento da fibrose hepática: estudo em camundongos geneticamente modificados*, in *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2010, USP: São Paulo. p. 139.
7. Solan, J.L., et al., *Phosphorylation at S365 is a gatekeeper event that changes the structure of Cx43 and prevents down-regulation by PKC*. *The Journal of Cell Biology*, 2007. **179**(6): p. 1301-1309.
8. Solan, J.L. and P.D. Lamp, *Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005. **1711**: p. 154-163.
9. Oyamada, M., Y. Oyamada, and T. Takamatsu, *Regulation of connexin expression*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005. **1719**: p. 6-23.
10. Oyamada, M., Y. Oyamada, and T. Takamatsu, *Gap junctions in health and disease*. *Medical Electron Microscopy*, 1998. **31**(3): p. 115-120.
11. Cronier, H., et al., *Gap junctions and cancer: new functions for an old story*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009. **11**(2): p. 323-338.
12. Menecier, G., et al., *Aberrant expression and localization of Connexin43 and Connexin30 in a rat glioma cell line*. *Molecular Carcinogenesis*, 2008. **47**: p. 391-401.
13. Goodenough, D.A. and D.L. Paul, *Gap Junctions*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2009. **1**(a002576).
14. Sawai, K., et al., *Redistribution of connexin43 expression in glomerular podocytes predicts poor renal prognosis in patients with type 2 diabetes and overt nephropathy*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2006. **21**: p. 2472-2477.
15. Hanner, F., et al., *Connexins and the kidney*. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2010. **298**: p. R1143 - R1155.
16. Dhein, S., et al., *Improving cardiac gap junction communication as a new antiarrhythmic mechanism: the action of antiarrhythmic peptides*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2010. **381**: p. 221-234.
17. Brisset, A.C., B.E. Isakson, and B.R. Kwak, *Connexins in vascular physiology and pathology*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009. **11**(2): p. 267-282.
18. Sáez, J.C., et al., *Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions*. *Physiological Reviews*, 2003. **83**: p. 1359-1400.
19. Retamal, M.A., et al., *Possible involvement of different connexin43 domains in plasma membrane permeabilization induced by ischemia-reperfusion*. *Journal of Membrane Biology*, 2007. **218**: p. 49-63.
20. Evans, W.H. and P.E. Martin, *Gap junctions: structure and function*. *Molecular and Membrane Biology*, 2002. **19**: p. 121-136.
21. Teixeira, T.F., *Influência da expressão da conexina 43 em modelo de hiperplasia de ductos biliares, após a ligação do ducto biliar comum (colédoco) em camundongos com deleção em dos alelos para o gene da conexina 43*, in *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2006, Universidade de São Paulo: São Paulo. p. 114.
22. Arensbak, B., et al., *Expression of connexin 37, 40, and 43 mRNA and protein in renal preglomerular arterioles*. *Histochemistry and Cell Biology*, 2001. **115**: p. 479-487.
23. Solan, J.L. and P.D. Lampe, *Connexin 43 phosphorylation - structural changes and biological effects*. *Biochemical Journal*, 2009. **419**(2): p. 261-272.

24. Torres, L.N., et al., *Expression of connexins 26 and 43 in canine hyperplastic and neoplastic mammary glands*. *Veterinary Pathology*, 2005. **42**.
25. Silva, P.T.D., *Avaliação morfológica e cinética da hipertrofia/hiperplasia renal compensatória pós-nefrectomia unilateral em camundongos: alterações da conexina 43 durante o processo*, in *Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia*. 2003, USP: São Paulo. p. 74.
26. Dagli, M.L.Z., V. Krutovskikh, and Y. Omori, *Delayed liver regeneration and increased susceptibility to chemical hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of connexin 32 only in the liver*. *Carcinogenesis*, 2004. **25**(4): p. 483-492.
27. Catarino, S.M., *Mind the gap: a new molecular model for the intracellular trafficking of connexin 43*, in *Faculdade de Medicina*. 2010, Universidade de Coimbra: Coimbra. p. 200.
28. Schalper, K.A., et al., *Connexin 43 hemichannels mediate the Ca²⁺ influx induced by extracellular alkalization*. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2010. **299**(6): p. 1504-1515.
29. Santos, A.L.S., *Avaliação da expressão da conexina 43 no miocárdio de cães indenes submetidos ou não à técnica de circulação extracorpórea*, in *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2008, USP: São Paulo. p. 93.
30. Garcia-Dorado, D., et al., *Gap junction-mediated intercellular communication in ischemic preconditioning*. *Cardiovascular Research*, 2002. **55**: p. 456-465.
31. Silva, P.T.D., et al., *Compensatory kidney hypertrophy/hyperplasia after nephrectomy in mice: alterations of connexin 43 (Cx43) phosphorylated isoforms*. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 2008. **1**(1): p. 3-9.
32. Huang, R., et al., *Connexin 43 suppresses human glioblastoma cell growth by down-regulation of monocyte chemotactic protein 1, as discovered using protein array technology*. *Cancer Research*, 2002. **62**: p. 2806-2812.
33. Schlemmer, S.R., D.B. Novotny, and D.G. Kaufman, *Changes in connexin 43 protein expression in human endometrial carcinoma*. *Experimental and Molecular Pathology*, 1999. **67**: p. 150-163.
34. Girão, H. and P. Pereira, *Phosphorylation of connexin 43 acts as a stimulus for proteasome dependent degradation of the protein in lens epithelial cells*. *Molecular Vision*, 2003. **9**: p. 24-30.
35. Bargiotas, P., H. Monyer, and M. Schwaninger, *Hemichannels in Cerebral Ischemia*. *Current Molecular Medicine*, 2009. **9**(2): p. 186-194.
36. Moorby, C.D., M. Stoker, and E. Gherardi, *HGF/SF inhibits junctional communication*. *Experimental Cell Research*, 1995. **219**: p. 657-663.
37. Jordan, K., et al., *The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization*. *Journal of Cell Science*, 2000. **114**: p. 763-773.
38. Lampe, P.D. and A.F. Lau, *The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication*. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2004. **36**(7): p. 1171-1186.
39. Dhein, S., et al., *Pharmacological modulation and differential regulation of the cardiac gap junction proteins connexin 43 and connexin 40*. *Biology of the Cell*, 2002. **94**: p. 409-422.
40. Toyofuku, T., et al., *c-Src Regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001. **276**(19): p. 1780-1788.
41. Solan, J.L., et al., *Phosphorylation at S365 is a gatekeeper event that changes the structure of Cx43 and prevents down-regulation by PKC*. *The Journal of Cell Biology*, 2007. **179**(6): p. 1301-1309.
42. Cooper, C.D., et al., *Analysis of connexin phosphorylation sites*. *Methods*, 2000. **20**(2): p. 196-204.
43. Silverstein, D.M., et al., *Expression of connexins in the normal and obstructed developing kidney*. *Pediatric Nephrology*, 2003. **18**: p. 216-224.
44. Han, J.H., et al., *Regulation of renin release by connexin 43 in As 4.1 cell line*. *Peptides*, 2010. **31**: p. 899-902.
45. Zhang, J. and C.E. Hill, *Differential connexin expression in preglomerular and postglomerular vasculature: accentuation during diabetes*. *Kidney International*, 2005. **68**: p. 1171-1185.
46. Barajas, L., L. Liu, and M. Tucker, *Localization of connexin43 in rat kidney*. *Kidney International*, 1994. **46**: p. 621-626.
47. Zhang, Q., et al., *Descending vasa-recta endothelium is an electrical syncytium*. *American Journal Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2006. **291**: p. R1688-R1699.
48. Kurtz, L., et al., *Connexin expression in renin-producing cells*. *Journal of American Society of Nephrology*, 2009. **20**: p. 506-512.

49. Beyer, E.C., et al., *Antisera directed against connexin43 peptides react with a 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium and other tissues*. The Journal of Cell Biology, 1989. **108**: p. 595-605.
50. Hillis, G.S., et al., *The expression of connexin 43 in human kidney and cultured renal cells*. Nephron, 1997. **75**: p. 458-463.
51. Vergara, L., et al., *Do connexin 43 gap-junctional hemichannels activate and cause cell damage during ATP depletion of renal-tubule cells?* Acta Physiologica Scandinavica, 2003. **179**: p. 33-38.
52. Vergara, L., et al., *Gap-junctional hemichannels are activated by ATP depletion in human renal proximal tubule cells*. Journal of Membrane Biology, 2003. **196**: p. 173-184.
53. Guo, R., L. Liu, and L. Barajas, *RT-PCR study of the distribution of connexin 43 mRNA in the glomerulus and renal tubular segments*. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 1998. **275**: p. R439-R447.
54. Hills, C.E., et al., *Glucose-evoked alterations in connexin43-mediated cell-to-cell communication in human collecting duct: a possible role in diabetic nephropathy*. The American Journal of Physiology: Renal Physiology, 2006. **291**: p. F1045-F1051.
55. Yaoita, E., S. Myiasaki, and Y. Yoshida, *Up-regulation of connexin43 in glomerular podocytes in response to injury*. The American Journal of Pathology, 2002. **161**: p. 1597-1606.
56. Costa, J.A.C. and M.M. Neto, *Insuficiência renal aguda na terapia intensiva*, in *Simpósio medicina intensiva*, M.R. Preto, Editor. 1998, Cap. II - tópicos selecionados: Ribeirao Preto. p. 532-551.
57. Mehta, R.L., et al., *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury*. Critical Care, 2007. **11**(2): p. 1-8.
58. Nangaku, M. and K.-U. Eckardt, *Hypoxia and the HIF system in kidney disease*. Journal of Molecular Medicine, 2007. **85**: p. 1325-1330.
59. Tirapelli, L.F., et al., *Comparison of two models for evaluation histopathology of experimental renal ischemia*. Transplantation Proceedings, 2009. **41**: p. 4083-4087.
60. Legrand, M., et al., *Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney*. Molecular Medicine, 2008. **14**(7-8): p. 502-516.
61. Brezis, M., *Cellular mechanisms of acute ischemic injury in the kidney*. Annual Review of Medicine, 1993. **44**: p. 27-37.
62. Shibuya, C.A., *Papel da heme-oxigenase na proteção pelas estatinas na insuficiência renal aguda isquêmica em ratos*, in *Escola de enfermagem*. 2006, USP: São Paulo. p. 58.
63. Bonventre, J. and J.M. Weinberg, *Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure*. Journal of American Society of Nephrology, 2003. **14**: p. 2199-2210.
64. Medeiros, P.J., *Efeito do sildenafil na lesão renal por isquemia-reperusão em ratos*, in *Centro de Ciências da Saúde*. 2010, Universidade Federal do Rio Grande do Norte: Natal. p. 63.
65. Molitoris, B.A. and R. Bacallao, *Pathophysiology of ischemic acute renal failure: cytoskeletal aspects*, in *Acute renal failure: a companion to Brenner & Rector's the kidney*, B.A. Molitoris and W.F. Finn, Editors. 2001, WB Saunders: Philadelphia. p. 211-234.
66. Sutton, T.A., et al., *Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia*. American Journal of Physiology - Renal Physiology, 2003. **285**: p. F191-F198.
67. Sutton, T.A., et al., *Minocycline reduces renal microvascular leakage in a rat model of ischemic renal injury*. American Journal of Physiology - Renal Physiology, 2005. **288**: p. F91-F97.
68. Sutton, T.A., *Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury*. Microvascular Research, 2009. **77**: p. 4-7.
69. Cichy, M.C., *Análise imunohistológica da Endostatina, MMP-2 e MMP-9 em rins de camundongos submetidos à isquemia e reperusão*, in *Escola Paulista de Medicina*. 2010, UNIFESP: São Paulo. p. 79.
70. Bonventre, J.V., *Mechanisms of ischaemic acute renal failure*. Kidney International, 1993. **43**: p. 1160-1178.
71. Noiri, E., et al., *An in vivo approach showing the chemotactic activity of leukotriene B4 in acute renal ischemic-reperfusion injury*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **97**(2): p. 823-828.
72. Percy, C., M.J. Waters, and G. Gobe, *Caveolins in the repair phase of acute renal failure after oxidative stress*. Nephrology, 2004. **9**(6): p. 374-380.
73. Evora, P.R.B., et al., *Lesão de isquemia/reperusão: aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial*. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 1996. **66**(4): p. 239-245.

74. John, S.A., et al., *Connexin-43 hemichannels opened by metabolic inhibition*. The Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(1): p. 236-240.
75. Peracchia, C., *Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin*. Biochimica et Biophysica Acta, 2004. **1662**(1-2): p. 61-80.
76. Matsushita, S., et al., *Alterations os phosphorylation state of connexin 43 during hypoxia and reoxygenation are associated with cardiac function*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2006. **54**(3): p. 343-353.
77. Bellini, M.H., et al., *Endostatin expression in the murine model of ischaemia/reperfusion-induced acute renal failure*. Nephrology, 2007. **12**: p. 459-465.
78. Vaidya, V.S., M.A. Ferguson, and J.V. Bonventre, *Biomarkers of acute kidney injury*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2008. **48**: p. 463-493.
79. Beardslee, M.A., et al., *Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia*. Circulation Research, 2000. **87**: p. 656-662.
80. Schulz, R. and G. Heusch, *Connexin 43 and ischemic preconditioning*. Cardiovascular Research, 2004. **62**: p. 335-344.
81. Schulz, R., et al., *Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig hearts in vivo*. The FASEB Journal, 2003. **17**: p. 1355-1358.
82. Hatanaka, K., et al., *Down-regulation of connexin43 in early myocardial ischemia and protective effect by ischemic preconditioning in rat hearts in vivo*. Japanese Heart Journal, 2004. **45**(6): p. 1007-1019.
83. Li, Z., et al., *Effects of Gingko biloba extract on gap junction changes induced by reperfusion/reoxygenation after ischemia/hypoxia in rat brain*. The American Journal of Chinese Medicine, 2005. **33**(6): p. 923-934.
84. Zeinieh, M.P., et al., *Differential expression of hippocampal connexins after acute hypoxia in the developing brain*. Brain and development, 2010. **32**(10): p. 810-817.
85. Zeevi-Levin, N., et al., *Gap junctional remodeling by hypoxia in cultured neonatal rat ventricular myocytes*. Cardiovascular Research, 2005. **66**: p. 64-73.
86. Turner, M.S., et al., *Reversible connexin 43 dephosphorylation during hypoxia and reoxygenation is linked to cellular ATP levels*. Circulation Research, 2004. **95**(7): p. 726-733.
87. Tansey, E.E., et al., *Reduction and redistribution of gap and adherens junction proteins after ischemia and reperfusion*. The Annals of Thoracic Surgery, 2006. **82**(4): p. 1472-1479.
88. Li, S., et al., *Transient decrease in gap junction expression during compensatory renal growth in mice*. Urology, 2002. **60**(4): p. 726-730.
89. McCulloch, F., et al., *Localization of connexin 30 in the luminal membrane of cells in the distal nephron*. American Journal of Physiology - Renal Physiology, 2005. **289**: p. F1304-F1312.
90. Schulz, R., et al., *Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning*. Heart Failure Reviews, 2007. **12**: p. 261-266.
91. Monteiro, R.M., et al., *A role for regulatory T cells in renal acute kidney injury*. Transplant Immunology, 2009. **21**(1): p. 50-55.
92. Liao, X.H., et al., *Augmenter of liver regeneration protects kidneys from ischaemia/reperfusion injury in rats*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2010. **25**(9): p. 2921-2929.