

**Fernanda Florencia Fregnan Zambom**

**Efeito da hipóxia na patogênese da lesão renal em dois  
modelos experimentais de doença renal crônica:  
agravamento ou proteção?**

Tese de Doutorado

Departamento de Clínica Médica – Disciplina de Nefrologia

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Roberto Zatz

**São Paulo**

**2022**

**Fernanda Florencia Fregnan Zambom**

**Efeito da hipóxia na patogênese da lesão renal em dois  
modelos experimentais de doença renal crônica:  
agravamento ou proteção?**

Tese de Doutorado

Departamento de Clínica Médica – Disciplina de Nefrologia

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Roberto Zatz

**São Paulo**

**2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Zambom, Fernanda Florencia Fregnan

Efeito da hipóxia na patogênese da lesão renal em dois modelos experimentais  
de doença renal crônica: agravamento ou proteção? / Fernanda Florencia  
Fregnan Zambom -- São Paulo, 2022.

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

Programa de Nefrologia.

Orientador: Roberto Zatz.

Descritores: 1.Hipóxia 2.Nefrite intersticial 3.Hipertensão 4.Insuficiência renal  
crônica 5. NF- $\kappa$ B 6.Inflamassoma NLRP3.

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esta tese ao meu pai, Felicio Tadeo, pelo apoio incondicional e todos os esforços que fez por mim, especialmente em relação à minha formação profissional e pessoal.

Também a dedico ao meu instrutor Henrique Márcio, que sempre me chamou de Doutora.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me proporcionar aprender, me desenvolver intelectualmente e me oferecer saúde para enfrentar os desafios dessa vida, concluindo mais essa etapa.

Quero agradecer imensamente aos meus pais. Minha mãe, Maria de Lourdes Zambom, por me dar força para concluir esta etapa, mesmo nos momentos mais difíceis de nossas vidas, me acompanhando em todas elas e sendo meu exemplo de força e dedicação. Meu pai, Felício Tadeo Zambom (*in memoriam*), você foi para mim um exemplo de força, tenacidade e dedicação. Onde você estiver, tenho certeza que está muito orgulhoso de mim.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Zatz por compartilhar comigo todo seu conhecimento e me acompanhar nesse trabalho, com suas ideias, sugestões e ensinamentos. Obrigada por confiar em mim e no meu trabalho.

Agradeço também ao Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara por contribuir imensamente com suas ideias e sugestões, cada uma delas tornou esta tese melhor.

À Dra. Clarice Kazue Fujihara, que após meu mestrado, me incentivou a seguir para o doutorado e me ajudou nas etapas iniciais desse trabalho.

Às minhas colegas e parceiras Amanda Helen Albino e Helena M. Tessaro, que compartilharam comigo a atenção aos animais e experimentos, sem contar os momentos de descontração e contribuição a este trabalho.

Ao Dr. Orestes Foresto-Neto, que sempre me ajudou com novas ideias e muitos conhecimentos, contribuindo com o resultado final deste trabalho.

À Ivone B. Oliveira, que além de estar sempre disposta a me ajudar com experimentos, dividiu comigo inúmeras horas na sala de microscopia, imuno e desenvolvimento de protocolos.

À Dra Vanda Jorgetti, Dra Luciene Machado e ao Wagner Domingues por todo apoio, contribuições e ensinamentos.

À Claudia Sena pelo apoio técnico, ajuda e cuidado na realização de muitas dosagens bioquímicas desse estudo.

À Janice Pião pela cuidadosa manutenção do biotério e pela divertida companhia de tantas horas.

À Solange, Pedro pela assistência em todas as questões burocráticas.

À todos os colaboradores do Lim-16 que de alguma forma fizeram meus dias mais felizes e acompanharam minha trajetória.

Ao meu namorado Felipe F. Araujo que sempre me apoiou e me deu forças para terminar esta tese, mesmo nos momentos mais difíceis, sem desistir. Sempre acreditando no meu potencial científico. Você faz tudo ser mais leve. Obrigada.

Ao Dr Jose Manuel C. Capcha que sempre acreditou no meu potencial na ciência, ouviu minhas reclamações sobre experimentos que não deram certo e se alegrou com os que deram. Sua amizade levo para toda a vida. ¡Gracias!

Agradeço aos auxílios financeiros da FAPESP (nº 2012/10926-5), do CNPq (303684/2013-5) e da CAPES (88882.327923/2019-01).

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.*

- George Bernard Shaw

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                              | 12 |
| 1.1 Doença Renal Crônica.....                           | 12 |
| 1.2 Imunidade Inata e a DRC .....                       | 13 |
| 1.3 Hipóxia renal.....                                  | 18 |
| 1.4 Hipóxia ambiental .....                             | 21 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....                               | 25 |
| <b>3. MÉTODOS</b> .....                                 | 25 |
| 3.1 Obtenção do modelo experimental .....               | 25 |
| 3.2 Indução de hipóxia.....                             | 26 |
| 3.3 Procedimentos Gerais .....                          | 28 |
| 3.4 Análises bioquímicas .....                          | 29 |
| 3.5 Análises histológicas e imuno-histoquímicas.....    | 30 |
| 3.6 Imuno-histoquímico do tecido renal .....            | 32 |
| 3.7 Análises do conteúdo proteico do tecido renal ..... | 39 |
| 3.8 Western Blot .....                                  | 39 |
| 3.9 Análise Estatística .....                           | 43 |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....                              | 44 |
| Protocolo 1 – Sobrecarga de Adenina na dieta .....      | 44 |
| Protocolo 2 – Inibição do Óxido Nítrico.....            | 61 |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....                               | 74 |
| <b>6. CONCLUSÕES</b> .....                              | 83 |
| <b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....              | 84 |



## RESUMO

Zambom FFF. *Efeito da hipóxia na patogênese da lesão renal em dois modelos experimentais de doença renal crônica: agravamento ou proteção?* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A hipóxia tecidual tem sido apontada como importante fator patogênico da Doença Renal Crônica (DRC). Relatamos anteriormente que a exposição crônica à baixa  $pO_2$  ambiente levou à hipóxia do tecido renal, mas não promoveu lesão renal em ratos saudáveis e, em ratos submetidos a ablação renal 5/6, atenuou inesperadamente a lesão renal. No presente estudo, investigamos se a hipóxia crônica também foi renoprotetora em dois modelos adicionais de DRC: o de nefrite tubulointersticial induzido por sobrecarga de adenina na dieta; e o de inibição crônica da síntese de óxido nítrico. Examinaremos também os mecanismos celulares envolvidos nesse possível efeito renoprotetor da hipóxia, em particular a ativação da imunidade inata. Em ambos os modelos, a hipóxia renal causada pela baixa  $pO_2$  ambiente atenuou o desenvolvimento de lesão renal e inflamação. Além disso, a hipóxia renal limitou a ativação das cascatas do inflamassoma NF- $\kappa$ B e NLRP3. Os mecanismos subjacentes a esses efeitos protetores não são claros e podem envolver a atenuação do estresse oxidativo local, diminuição dos níveis intrarrenais de angiotensina II. Esses achados podem contribuir para desvendar a patogênese da DRC e para o desenvolvimento de estratégias inovadoras para deter sua progressão.

**Descritores:** hipóxia; nefrite tubulointersticial; hipertensão; insuficiência renal crônica; NF- $\kappa$ B; inflamassoma NLRP3.

## ABSTRACT

Zambom FFF. Hypoxia effect on the pathogenesis of kidney injury in two experimental models of chronic kidney disease: aggravation or protection? [tesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Tissue hypoxia has been pointed out as a major pathogenic factor in chronic kidney disease (CKD). However, epidemiological and experimental evidence inconsistent with this notion has been described. We reported previously that chronic exposure to low ambient  $pO_2$  led to renal tissue hypoxia, but promoted no renal injury in normal rats and, in rats with 5/6 renal ablation, unexpectedly attenuated renal injury. In the present study, we investigated whether chronic hypoxia was also renoprotective in two additional models of CKD: tubulointerstitial nephritis induced by models of dietary adenine overload; and the chronic of nitric oxide synthesis. We will also examine the cellular mechanisms involved in this possible renoprotective effect of hypoxia, in particular the activation of innate immunity. In both models, renal hypoxia caused by low ambient  $pO_2$  attenuated the development of renal injury and inflammation. In addition, renal hypoxia limited the activation of the NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome cascades. The mechanisms underlying these protective effects are unclear and may involve attenuation of local oxidative stress, lowering of intrarenal levels of angiotensin II. These findings may contribute to unravel the pathogenesis of CKD and to the development of innovative strategies to arrest its progression.

**Descriptors:** hypoxia; tubulointerstitial nephritis; hypertension; renal insufficiency, chronic; NF- $\kappa$ B; NLRP3 inflammasome.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença Renal Crônica

Dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) demonstram que aproximadamente 13% da população mundial é atingida pela doença renal crônica (DRC), aumentando progressivamente a quantidade de pacientes que necessitam de terapia renal substitutiva (TRS), como transplante renal ou diálise crônica (1, 2). Segundo a SBN, em 2020-2021, o Censo Brasileiro de Diálise demonstrou que a quantidade de pacientes inscritos em programas de TRS em 2020 era superior a 148.000. Já foram descritos na literatura inúmeros fatores de risco para progressão da DRC, tais como doenças pré-existentes e históricos familiares, além de variáveis demográficas e de comportamento. A hipertensão arterial, diabetes mellitus e glomerulonefrites são as patologias de base que mais frequentemente levam à DRC (1). Uma vez instalada a doença, a diminuição sucessiva da filtração glomerular, principal marcador da DRC, podem desencadear graves complicações, como hipercalemia, retenção de fluidos e de escórias nitrogenadas, principalmente quando relacionadas à outras alterações (3).

Mesmo com avanços tecnológicos na detecção da DRC e desenvolvimento a indústria farmacêutica para seu tratamento, os mecanismos de progressão da DRC ainda não foram completamente elucidados, além de a perspectiva de poder detê-los também estar distante. Estudos demonstram que fatores hemodinâmicos (hipertensão sistêmica/glomerular e hipertrofia glomerular) e inflamatórios, tais como a infiltração do tecido renal por células imunes, produção de mediadores e fatores de crescimento não associados à antígenos microbianos (4-9), contribuem para a fibrose tecidual

generalizada e perda progressiva da função renal. Mesmo na ausência de lesões no compartimento glomerular, a fibrose intersticial crônica pode ser causada por infecções, medicamentos, disfunções imunológicas, toxinas, distúrbios metabólicos, doenças hereditárias(10), bem como hipóxia tecidual (11).

Essas anomalias colocam em ação uma série de fatores patogênicos, cuja interação termina por provocar alterações teciduais como a infiltração de células inflamatórias, o acúmulo de fibroblastos e a deposição, nos espaços intersticiais, de elementos da matriz extracelular, como colágeno (tipos I e III) e fibronectina (12-14). Ocorre, além disso, a rarefação de capilares peritubulares e perda de células tubulares, os quais, assim como fibroblastos, podem sofrer alterações fenotípicas, diferenciando-se em miofibroblastos, que aumentam a síntese de  $\alpha$ -actina ( $\alpha$ -SMA) e outras moléculas do citoesqueleto (15, 16). Outras células inflamatórias, como macrófagos também são capazes de produzir proteínas da matriz extracelular, além da liberação de citocinas e de fatores de crescimento, atuando no recrutamento de outras células inflamatórias.

## **1.2 Imunidade Inata e a DRC**

A fibrogênese decorrente da DRC envolve a participação de uma série de vias intracelulares. Bastante conservada filogeneticamente em organismos multicelulares, a resposta imunológica inata é mediada pelo reconhecimento de antígenos através de Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*), presentes em macrófagos, linfócitos, células dendríticas e neutrófilos; responsáveis pela detecção de toxinas e fragmentos de DNA (PAMP, *Pathogen Associated*

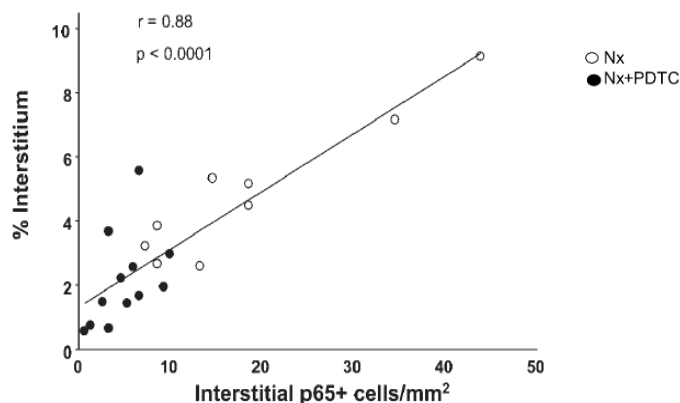
*Molecular Pattern*) ou produtos da destruição/estresse de células do próprio organismo (DAMP, *Damage Associated Molecular Pattern*), como HMGB1, cristais de ácido úrico e ATP. Essas moléculas ativam diversas vias de sinalização, induzindo um intenso processo inflamação no tecido renal (17-19). Estudos recentes de nosso e outros grupos de pesquisa demonstraram a participação da via do receptor do tipo Toll-Like 4 (TLR 4) e do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), de um lado, e do inflamassoma NLRP3, de outro, no desenvolvimento das lesões intersticiais e glomerulares da DRC (18, 20-26).

#### *Via de sinalização TLRs-NF- $\kappa$ B (Sinal 1)*

Os Toll-Like Receptors (TLRs) trouxeram diversos conhecimentos sobre a participação do sistema imune inato em muitas patologias. Presentes em células inflamatórias e de revestimento, esses receptores compõem uma diversificada família de PRRs superficiais (19, 27, 28), associados a proteínas localizadas na membrana ou no citoplasma, como o MyD88, e quando ligados à PAMPs ou DAMPs ativam a via do sistema NF- $\kappa$ B. Esse sistema é formado por heterodímeros estáveis, o qual se destaca o formado pelas subunidades p50/p65 ligadas a subunidade inibidora I $\kappa$ B $\alpha$  (29, 30). Através de estímulos, fisiológicos ou patológicos, a fosforilação/degradação da subunidade I $\kappa$ B $\alpha$  e a migração do heterodímero p50/p65 para o núcleo promove a ativação do sistema NF- $\kappa$ B, cuja subunidade p65 é responsável pela transcrição de interleucinas, como o IL-6, pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18 (17, 29-32). A AngII, sintetizada por células inflamatórias e que promove seus efeitos através da ligação com o receptor

AT1, é capaz de atuar como "citocina-like", estimulando a via do NF- $\kappa$ B, perpetuando o processo inflamatório (33-38).

Por ser um dos mais estudados mecanismos intracelular sinalização de doenças inflamatórias crônicas, a ativação do sistema NF- $\kappa$ B representa um indicador da evolução de doenças reais (30, 32, 39, 40), mostrando-se ativado em pacientes com glomerulopatia de lesões mínimas (41), nefropatia membranosa (42, 43), nefropatia da IgA (44), síndrome nefrótica (45) e nefropatia diabética (46, 47). No modelo de ablação renal de 5/6 (NX), um dos modelos experimentais de DRC mais amplamente utilizado, uma maior na ativação do sistema NF- $\kappa$ B foi observado nos compartimentos intersticial, glomerular e vascular e a inibição desse sistema através do composto Ditiocarbamato de Pirrolidina (PDTC), que previne que a subunidade I $\kappa$ B $\alpha$  seja degradada (20, 39), mostrou-se associado melhora da pressão arterial sistêmica, diminuição da excreção urinária de albumina, da inflamação renal e das lesões nos compartimentos glomerular e intersticial (Figura 1).



**Figura 1.** Correlação entre a % de interstício e o número de células intersticiais positivas para p65 avaliado através de imuno-histoquímica. Resultados observados no estudo publicado por Fujihara et al (20). Através da administração de PDTC aos animais Nx, foi possível observar uma redução no número de células intersticiais positivas para o dímero p65, que corresponde a uma das subunidades do NF- $\kappa$ B.

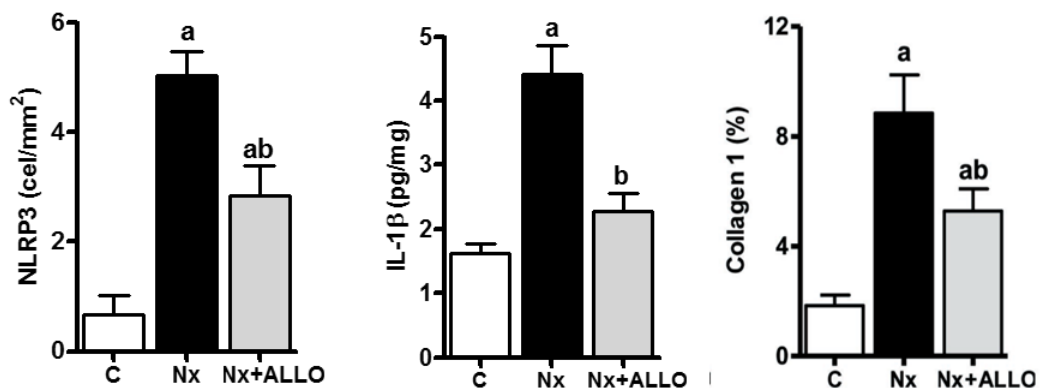
Mais recentemente, observamos que, no modelo de nefrite tubulointersticial por sobrecarga de adenina, o bloqueio do sistema NF- $\kappa$ B, além de reduzir a formação de granulomas no interstício renal, reduziu o processo inflamatório e a fibrose renal (21). Esses achados apontam o possível envolvimento da via TLRs/NF- $\kappa$ B no processo inflamatório e na evolução das lesões do tecido renal e o provável impacto benéfico da inibição do NF- $\kappa$ B em diferentes modelos de DRC experimental.

#### *Via de sinalização da via inflamassoma NLRP3 (Sinal 2)*

Não apenas os TLRs, mas outros receptores presentes matriz citoplasmática também atuam no reconhecimento dos DAMPs e sinalizam a expressão de moléculas inflamatórias, perpetuando a inflamação crônica (48, 49). Após ativados, ocorre um processo de oligomerização em seus componentes, gerando complexos moleculares conhecidos como inflamassomas. Os mais conhecidos são os NLRs [*Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-like receptors*], que ao se oligomerizarem, formam uma plataforma molecular (inflamassoma) que controlam a expressão e/ou clivagem de citocinas pro-inflamatórias. Tais receptores reconhecem moléculas endógenas de lesão celular como espécies reativas de oxigênio (EROs), ácido úrico em forma de cristais ou solúvel e baixas concentrações de potássio intracelular (50-56). O NLR mais frequentemente associado a doenças metabólicas e inflamatórias crônicas, como diabetes tipo II, obesidade, arteriosclerose e doenças intestinais é o NLRP3, que também tem sido estudado na DRC (57, 58). Os receptores NLRPs regulam processos pós-transcricionais da cascata de oligomerização do inflamassoma, formado pela Caspase-1 ativa e a proteína adaptadora ASC (*Apoptosis-associated Speck-like containing a CARD domain*), responsáveis pela

clivagem das interleucinas pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL18, inicialmente inativas, em suas formas ativas (17, 31, 52).

Na nefropatia diabética, Wang e cols (24) observaram a maior expressão renal de proteínas da via do inflamassoma NLRP3, tais como ASC e Caspase-1. A ausência do NLRP3 (NLRP3 $^{-/-}$ ) em animais com obstrução ureteral unilateral (UUO) foi capaz de atenuar a lesão tubular e a inflamação/fibrose renal (23). Recentemente, Foresto-Neto e colaboradores (22) demonstraram que em ratos NX, a terapêutica com Alopurinol reduziu o conteúdo proteico do inflamassoma NLRP3 e atenuou o processo inflamatório e a fibrose do tecido renal (Figura 2).



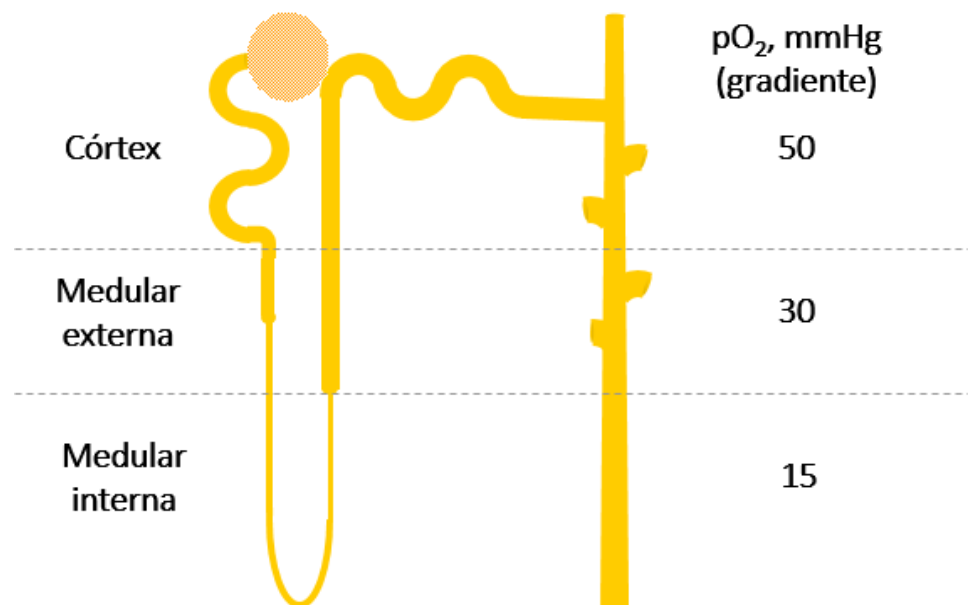
**Figura 2.** Gráficos representativos do estudo de Foresto-Neto et al (22) cuja terapêutica com Alopurinol (ALLO) de ratos Nx apresentaram menor infiltração intersticial de células positivas para o inflamassoma NLRP3, menor conteúdo renal de IL-1 $\beta$  e deposição de Colágeno 1 reduzida no interstício renal.

Esses resultados sugerem o envolvimento das vias do sistema imune inato na patogênese da DRC e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que atuem inibindo essas vias correspondem à importantes alvos de investigação da pesquisa experimental.



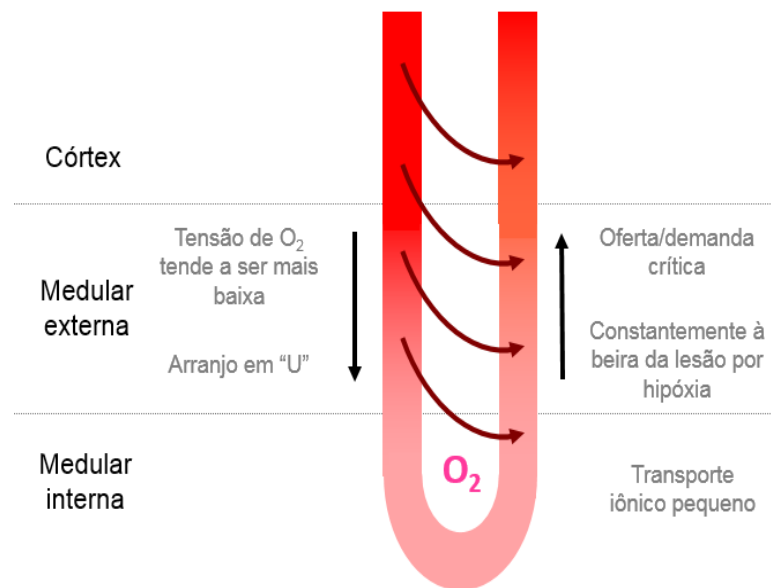
### 1.3 Hipóxia renal

Em meados dos anos 90, a hipótese de que a hipóxia renal tem efeito patogênico na DRC começou a ser estudada. Sabia-se, já naquela época, que, devido a um descompasso entre oferta e demanda de oxigênio, a região medular externa está frequentemente à beira da hipóxia, até em condições fisiológicas (59) (Figura 3).



**Figura 3.** Diagrama das regiões do néfron, respectivas pressões parciais de oxigênio. Baseado nos dados de Shoji e col. (59).

O desequilíbrio entre a oferta e demanda de O<sub>2</sub> na região medular externa ocorre devido a suas características peculiares. Essa região apresenta dois fragmentos do néfron, a *pars recta* do túbulo proximal e a porção espessa da alça de Henle, cujo transporte ativo de sódio é bastante intenso. Entretanto, devido ao efeito da contracorrente passiva, inerente à arquitetura dos vasos retos que circundam as alças de Henle, dispostos em “U”, torna limitada a oferta local de oxigênio (Figura 4).



**Figura 4.** Diagrama do efeito da contracorrente passiva nos vasos retos presentes no parênquima renal. Com base em dados de Shoji e col. (59).

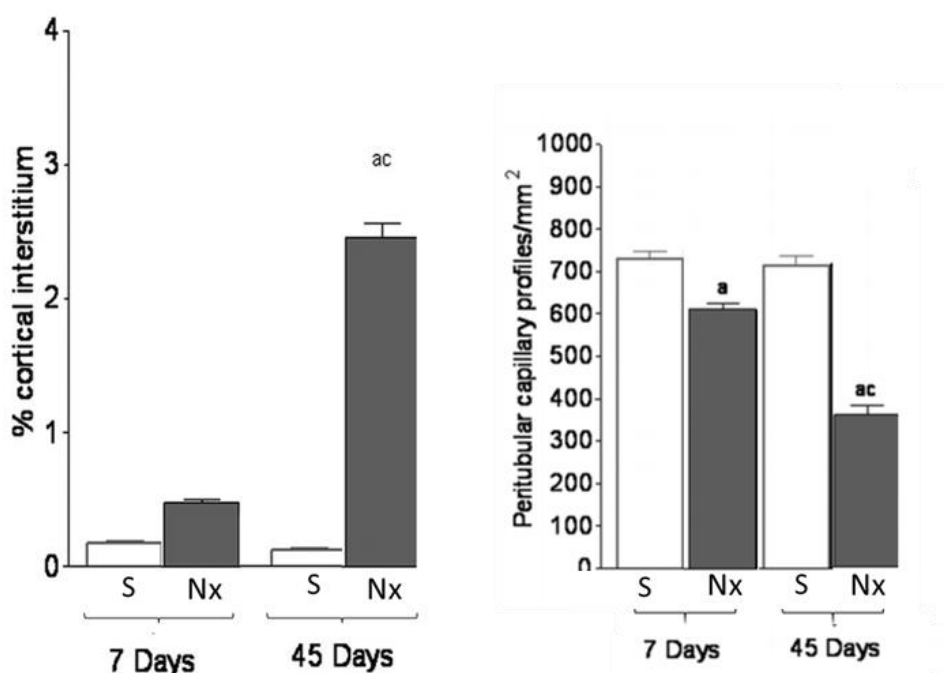
Esse arranjo reduz gradualmente a tensão de oxigênio direção à papila. O oxigênio sanguíneo do ramo descendente do vaso precocemente se difunde em direção ao ramo ascendente, cuja tensão de oxigênio é mais baixa devido a elevada demanda das regiões mais intrínsecas (59). Com isso, a tensão de  $O_2$  na região medular externa mantém-se constantemente em níveis pouco superiores ao mínimo necessário para atender à demanda metabólica. São esses segmentos os principais a sofrerem necrose tubular em condições de isquemia renal (59-61).

Embora o efeito patogênico da hipóxia na injúria renal aguda seja indiscutível, é controverso na DRC. A hipótese mais difundida é de que a hipóxia inicia, ou pelo menos agrava o desenvolvimento de fibrose que caracteriza a DRC. Condições patológicas, como glomerulopatias primárias e nefrosclerose hipertensiva, favorecem desfechos como rarefação capilar, distorção da arquitetura renal, aumento da demanda metabólica e inflamação/estresse oxidativo que podem contribuir para a hipóxia (61). Mutuamente, eventos inflamatórios aumentam o consumo de  $O_2$  e a

demanda de energia para inúmeros processos celulares, como produção de EROs (62, 63).

Destaca-se a possibilidade de que a hipóxia influencie de alguma forma para a progressão da DRC. Se a hipóxia pode resultar da doença renal e ao mesmo tempo contribuir para agravá-la, haverá possivelmente um ciclo de realimentação positiva, representando mecanismo para agravamento, propagação e perpetuação do processo. Alguns mecanismos como a perda de capilares peritubulares, a fibrose intersticial, o estresse oxidativo e a anemia poderiam agravar a hipóxia e favorecer a evolução da DRC (59, 61, 62).

Outra possibilidade seria de a hipóxia se tratar apenas um epifenômeno, não atuando efetivamente na patogênese da DRC. É possível que a hipóxia seja consequência, e não causa, da injúria renal progressiva. Por exemplo, em ratos NX foi observada crescente rarefação de nas regiões medular e cortical (64, 65). Entretanto, a rarefação capilar pode resultar da própria fibrose renal e de alterações estruturais decorrentes do intenso processo inflamatório característico da DRC (Figura 5) (65).



**Figura 5.** Gráficos representativos do estudo de Machado et al (65). Aos 7 dias, os animais Nx apresentavam pequena expansão intersticial na córtex renal, enquanto a redução de capilares peritubulares foi significativa. Aos 45 dias, esses animais apresentaram intensa expansão da área intersticial e perda significativa de capilares peritubulares na região cortical. S: sham; <sup>a</sup>p<0,05 vs. Respectivo S; <sup>ac</sup>p<0,05 vs. Respectivo Dia 7.

#### 1.4 Hipóxia ambiental

A composição do ar atmosférico é de 78% Nitrogênio, 21% de oxigênio e 1% de outros gases, no entanto, o oxigênio é, sem dúvidas, o componente mais importante para a manutenção das funções orgânicas e fonte de vida dos organismos terrestres. É responsável por fornecer energia aos processos químicos celulares e alterações na pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) na atmosfera pode causar alterações fisiológicas importantes nos seres vivos (66). A baixa  $pO_2$  é chamada de hipóxia e é definida como a deficiência de oxigênio no organismo, suficiente para causar alterações fisiológicas, sejam elas sistêmicas ou teciduais. Diferentemente da anóxia, na qual o  $O_2$  está ausente e não é compatível à vida, os organismos conseguem se adaptar à um certo grau de hipóxia (67). Essa adaptação ocorre através de

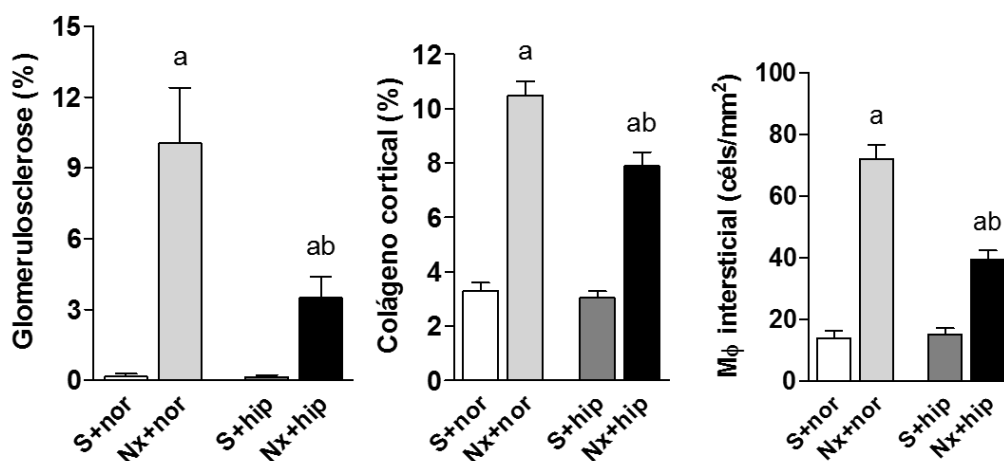
mecanismos fisiológicos (68, 69). Agudamente a hipóxia promoverá aumento da taxa metabólica basal, hiperventilação e taquicardia, com redução do raciocínio. Exposição a hipóxia hipobárica por maior tempo, leva ao aumento da síntese de eritropoietina (EPO) e consequente maior produção de hemácias, a fim de potencializar a captação de oxigênio nos alvéolos pulmonares(70-73).

Segundo Hurtado e col. (74) e Julian & Moore (69), cerca de 2% da população mundial vive em localidades altas, ou seja, 2400m acima do nível do mar, como os grupos étnicos Amhara (Etiópia), Tibetanos (Tibete) e Andinos (América do Sul), os quais possuem adaptações genéticas e fisiológicas bem estabelecidas para viver nessas regiões.

Apesar de alguns estudos demonstrarem que habitantes de localidades altas expostos cronicamente à hipóxia tenham a chamada Síndrome Renal da Alta-altitude (*High-Altitude Renal Syndrome*, HARS), cujos efeitos renais são decorrentes da combinação de policitemia, hipertensão sistêmica, hiperuricemia microalbuminúria (75-77), há evidências, incluindo algumas recentemente obtidas por nosso laboratório, que demonstram que a hipóxia pode até mesmo promover um efeito protetor em doenças inflamatórias, cardiovasculares e renais. Winkelmayer e col (78) compararam pacientes renais crônicos quem viviam próximo ao nível do mar com pacientes que residem em diferentes estratos de altitude e observaram que a mortalidade mostrou-se reduzida em 3% em regiões de 76 a 609m, em 7% de 610 a 1218m, em 12% de 1219m a 1828m e redução de 15% em localidades superiores a 1828m acima do nível do mar.

Outros estudos também demonstraram que indivíduos portadores de diversas morbidades e que vivem em localidades altas ao redor do mundo têm uma taxa de

mortalidade menor quando comparada à daquelas que residem ao nível do mar(74, 79-82). Diversos estudos experimentais também demonstram esses efeitos benéficos da exposição à hipóxia. Em um estudo experimental com ratos diabéticos que permaneceram em hipóxia hipobárica durante 6h/dia por 28 dias apresentaram melhora da nefropatia e do estresse oxidativo renal (83). Resultados recentemente publicados por nosso laboratório demonstram que ratos Nx submetidos à hipóxia por 60 dias apresentaram redução da glomerulosclerose, do infiltrado de macrófagos e da área intersticial, indicando um efeito renoprotetor da hipóxia (Figura 6) (84).



**Figura 6.** Gráficos representativos do estudo de Rempel et al (84). Depois de 60 dias, os animais Nx que permaneceram em condições de normóxia (nor) desenvolveram esclerose glomerular, deposição de Colágeno 1 e infiltrado macrófágico no interstício renal. Após o mesmo período, os animais Nx submetidos à hipóxia (hip) apresentaram redução significativa desses parâmetros, quando comparados aos animais Nx+nor, sugerindo efeitos benéficos da hipóxia. <sup>a</sup>p<0,05 vs. Respectivo S; <sup>b</sup>p,0,05 vs. Nx+nor.

Por enquanto, as evidências em apoio a essa tese são escassas (85, 86). Os mecanismos compreendidos nessa possível renoproteção exercida pela hipóxia não foram elucidados. Um possível mecanismo é a ativação do fator de transcrição induzido pela hipóxia (HIF, *Hypoxia-inducible Factor*) por citocinas e ROS (87). Esse fator de transcrição é composto por 3 subunidades: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e HIF-3 $\alpha$ . A atividade do HIF-1 $\alpha$  tem sido apontada em células tubulares, e a do HIF-2 $\alpha$  em células

endoteliais e fibroblastos, porém, pouco se sabe sobre o HIF-3 $\alpha$  (61, 88). Em condições de normóxia, a subunidade  $\alpha$  do HIF sofre hidroxilação pelas PHDs (do inglês, *Prolyl Hydroxylase Domain Proteins*), interagindo com a proteína Von Hippel-Lindau (pVHL) e posterior ubiquitinação e proteólise. As PHDs são hidroxilases dependentes de Ferro e oxigênio, ou seja, sua atividade catalítica só ocorre na presença dessas moléculas. Suas três principais isoformas são expressas em diversos tecidos, entre eles hepático, renal e cardíaco. Todas as PHDs (PHD1, PHD2 e PHD3) são expressas em células epiteliais tubulares renais. Elevados níveis de PHDs foram observados na porção espessa ascendente da alça de Henle, no túbulo convoluto distal e coletor da medula interna, onde a tensão de oxigênio é fisiologicamente reduzida (88, 89). A PHD1 é expressa na porção nuclear, a PHD2 no citoplasma enquanto a PHD3 é expressa em ambas as porções celulares(90). As PHDs são responsáveis por regular a atividade do HIF, porém a PHD2 é a principal reguladora da expressão de HIF-  $\alpha$  e responsável pela degradação do HIF-1 $\alpha$  em normóxia, enquanto as PHD1 e PHD3 determinam a expressão seletiva de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  (88, 91-93)

Em condições de hipóxia, a subunidade  $\alpha$  é estabilizada e, ao ligar-se com sua subunidade constitutiva 1 $\beta$ , transloca-se para o núcleo da célula e atua como fator de transcrição de inúmeros genes-alvo relacionados a angiogênese, eritropoiese, apoptose, proliferação celular, metabolismo da glicose, regulação de pH e proteólise(59, 94-96). Estudos recentes demonstram que fatores induzidos por hipóxia possuem sua atividade gênica aumentada em pacientes renais crônicos que vivem em localidades altas, sugerindo melhor eficiência da eritropoiese por induzir a expressão de Eritropoietina (EPO) e regulação de enzimas de ação angiogênica como

o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*), Heme Oxigenase-1 (HO-1) e NO sintetase induzível (iNOS) (74, 78).

Em tal contexto, é possível que um ou mais desses produtos gênicos exerça um papel renoprotetor. Portanto, o efeito da hipóxia sobre a DRC ainda é uma questão em aberto. O estudo aqui proposto busca elucidar essa questão já que alguns trabalhos já demonstraram os efeitos benéficos da ativação do HIF em distintos modelos de doenças renais (85, 97-100), embora outros tenham demonstrado que sua ativação em células epiteliais renais esteja associada a progressão da fibrose renal (101, 102).

## **2. OBJETIVOS**

Investigar os efeitos renoprotetores da hipóxia em dois modelos experimentais diferentes de DRC, sendo um que promove nefrite tubulointersticial pela sobrecarga de adenina na dieta e outro a hipertensão arterial induzida da inibição crônica do óxido nítrico.

## **3. MÉTODOS**

### **3.1 Obtenção do modelo experimental**

No presente estudo foram utilizados ratos da linhagem Munich-Wistar machos, pesando entre 280-300g, adquiridos de uma colônia do biotério do Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais permaneceram em condições de temperatura ambiente de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $60\pm 5\%$  e ciclo claro/escuro de 12/12h. Todos os procedimentos



experimentais utilizados seguiram as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), aprovado pela Comissão De Ética No Uso De Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP (CAPPesq 1166/2018).

Os modelos experimentais de DRC utilizados neste estudo seguem 2 protocolos. O protocolo 1 compreende na administração de adenina (Sigma-Aldrich, Saint Luis, USA) adicionada à ração ofertada aos animais (RHOSTER, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil) acrescida de caseína a 15%, durante 2 semanas (ADE). A porcentagem de adenina acrescentada à ração foi de 0,50%. Um grupo de animais foi usado como , que recebeu a mesma ração sem a adição de adenina, foi usado como controle ©.

O protocolo 2 compreende na administração de um inibidor da síntese de óxido nítrico, o N $\omega$ -L- nitro arginina metil ester (L-NAME, Sigma-Aldrich, USA), na dose de 20 mg/rato (aproximadamente 80 mg/kg/dia) diluído na água do bebedouro. Os animais foram acompanhados durante 4 semanas, com ração padrão para roedores (Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil). Um grupo sem tratamento com L-NAME foi acompanhado pelo mesmo período e utilizado como controle.

### **3.2 Indução de hipóxia**

A atmosfera pobre em oxigênio (12 %), mimetizando uma altitude de aproximadamente 6.000 metros acima do nível do mar, foi gerada através de uma câmara de hipóxia. Os estudos a respeito da exposição prolongada do tecido renal à hipóxia são ainda escassos. Nossos resultados preliminares demonstram que os

animais são capazes de se manterem saudáveis durante meses nessas condições (84, 103).

Nos protocolos 1 e 2, os animais foram divididos em dois grupos: os que permanecerão sob normóxia (78 % de N<sub>2</sub>, 21 % de O<sub>2</sub> e 1 % de outros gases) e aqueles que permanecerão em câmaras normobáricas de hipóxia com atmosfera pobre em oxigênio (88 % de N<sub>2</sub> e 12 % de O<sub>2</sub>).

#### *Esquema experimental – Protocolo 1*

- **C<sub>NOR</sub>**: Animais C acompanhados durante 2 semanas sob normóxia (n=13);
- **C<sub>HIP</sub>**: Animais C acompanhados durante 2 semanas em câmara normobárica de hipóxia com atmosfera pobre em oxigênio (n=16);
- **ADE<sub>NOR</sub>**: Animais ADE 0,5% acompanhados durante 2 semanas sob normóxia (n=15);
- **ADE<sub>HIP</sub>**: Animais ADE 0,5% acompanhados durante 2 semanas em câmara normobárica de hipóxia com atmosfera pobre em oxigênio (n=16).

#### *Esquema experimental – Protocolo 2*

- **C<sub>NOR</sub>**: Animais C acompanhados durante 4 semanas sob normóxia (n=12);
- **C<sub>HIP</sub>**: Animais C acompanhados durante 4 semanas em câmara normobárica de hipóxia com atmosfera pobre em oxigênio (n=12);
- **NAME<sub>NOR</sub>**: Animais L-NAME na dose de 20mg/kg/dia acompanhados durante 4 semanas sob normóxia (n=12);

- **NAME<sub>HIP</sub>**: Animais L-NAME na dose de 20mg/kg/dia acompanhados durante 4 semanas em câmara normobárica de hipóxia com atmosfera pobre em oxigênio (n=12).

### 3.3 Procedimentos Gerais

Após as respectivas semanas de tratamento, avaliamos o peso corpóreo, a pressão caudal (PC) e pela impossibilidade de coletar urina de 24 horas desses animais, a albuminúria estimada foi feita pela relação albumina/creatinina ( $U_{ALB}/U_{CREAT}$ ) em amostras isoladas de urina. A avaliação da PC foi feita, após breve aquecimento dos animais, utilizando um método opto-eletrônico (BP 2000 Blood Pressure Analysis System, Visitech Systems, Apex, North Carolina, Estados Unidos). Posteriormente, os ratos foram mantidos em gaiolas metabólicas, por até duas horas, para coletar urina e posteriormente determinar a albuminúria e a creatinúria. Para a coletar amostras de sangue e órgãos, os ratos foram anestesiados com injeção intramuscular de Ketamina (Cristália, 50 mg/kg) e Rompun (Bayer, 10 mg/kg). O sangue foi coletado pela aorta abdominal para determinar as concentrações de Hematócrito, Hemoglobina,  $K^+$  plasmático e creatinina (Kit Labtest Diagnóstica S.A.). Os dois rins foram perfundidos inicialmente com solução salina gelada, a uma pressão igual à sistêmica, sendo em seguida o rim direito removido e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, mantido a  $-80^{\circ}C$  para futuras análises por Western-Blot ou ELISA de mediadores inflamatórios e componentes da imunidade inata. Em seguida, foi usada a solução de Duboscq-Brasil para perfusão e fixação “*in situ*” do rim esquerdo preparado para análises histológicas posteriores.

Para marcação da hipóxia tecidual, 4 ratos de cada grupo de ambos os protocolos receberão injeções intraperitoneais de Pimonidazol-HCl/ Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 (IRG Biosciences, EUA), um composto que, sob baixa pO<sub>2</sub>, liga-se a proteínas tissulares formando adutos, ou seja, produtos de sua ligação direta a essas proteínas. Esse composto foi preparado diluindo-se o Pimonidazol-HCl em na dosagem de 60mg/kg em soro fisiológico 0,9% e os ratos receberam injeções intraperitoneais 40 minutos antes do sacrifício. Posteriormente à anestesia, foi feita a coleta dos rins, os quais foram fixados com solução Duboscq-Brasil e preparados para análise histomorfométrica e de imuno-histoquímica para detecção dos adutos formados. Dessa forma, foi possível comprovar a hipóxia nas diferentes regiões do parênquima renal.

### 3.4 Análises bioquímicas

**Albuminúria** – A concentração de albumina urinária (U<sub>ALB</sub>) foi avaliada pelo método de imunodifusão radial, utilizado um anticorpo específico (anti-albumina de rato, MPBiomedicals LLC, EUA) (104).

**Creatinina**– A dosagem urinária e sérica de creatinina (U<sub>CREAT</sub> e S<sub>CREAT</sub>) foi avaliada através da análise colorimétrica utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica S.A.).

**Potássio Plasmático**– A determinação da concentração do potássio plasmático foi feita a partir de coleta sanguínea da aorta abdominal e dosada em um analisador de eletrólitos 9140 (AVL Medical Instruments).

**Hematócrito e hemoglobina**– Os parâmetros hematológicos básicos (hematócrito e concentração de hemoglobina) foram avaliados por métodos convencionais em

sangue venoso coletado de uma veia caudal. A hemoglobina foi dosada através de kit comercial (LabtestDiagnóstica S.A.) seguindo as instruções do fabricante.

**KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1)** – A concentração urinária de KIM-1 foi feita pela análise colorimétrica com o método ELISA com kit comercial (R&D Systems, Minnessota, EUA). O protocolo da técnica e as concentrações utilizadas seguiram as recomendações do fabricante.

### **3.5 Análises histológicas e imuno-histoquímicas**

Depois da perfusão-fixação "*in situ*", os rins foram pesados, seccionados em 2-3 segmentos coronais, fixados em tampão fosfato com formaldeído 10% e permaneceram por 14 horas em processador automático de tecidos (Jung Histokinette 2000, Leica Instruments GmbH, Alemanha) para desidratação, diafanização e impregnação em parafina.

Para posteriores análises imuno-histoquímicas, os tecidos montados em blocos de parafina foram seccionados na espessura de 4  $\mu\text{m}$  e colocados em lâminas não silanizadas. Depois foram submetidos a um processo de desparafinização, mantidos inicialmente por 30 minutos em estufa a 60°C, para em seguida, passarem por 3 banhos seguidos de xilol. Após a desparafinização, os rins foram reidratados em banhos sucessivos em misturas etanol/água com proporções decrescentes de etanol e, finalmente, água destilada.

Para o processo de silanização, as lâminas foram colocadas em um banho de álcool 96° durante 1 minuto, seguido de banhos sucessivos de acetona PA durante 1

minuto e silano 6% durante 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas em 2 banhos de acetona e 2 banhos de água destilada, sendo posteriormente secadas em estufa a 60°C durante 24 horas.

#### *Ácido Periódico de Schiff (PAS)*

A Reação PAS foi utilizada para evidenciar as lesões glomerulares. Os tecidos foram submetidos à oxidação por solução de ácido periódico 0,5% por 15 minutos e lavadas em água destilada. Posteriormente, as lâminas foram coradas com o reativo de Schiff (solução aquosa de fucsina básica a 0,5% acrescida de 15 ml de ácido clorídrico 1N e 9g de metabissulfito de sódio a cada 100 ml da solução) por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e contracoradas por 5 minutos com hematoxilina de Harris. Os cortes foram montados com lâmina e lamínula com permount.

As lesões glomerulares (% esclerose e % isquemia glomerular) foram quantificadas através da observação sucessiva de cerca de 200 glomérulos de cada animal em aumento final de 400X (105).

#### *Tricrômio de Massom*

Para avaliar a quantidade intersticial de cristais de 2,8 dihidroxiadenina (2,8-DHA), foi empregada a coloração de Tricrômio de Masson. Durante 10 minutos, as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris. Após lavagem em água destilada,

foram coradas por 1 minuto com solução de escarlate de Biebrich (solução aquosa, 0,9 % de escarlate de Biebrich, 0,1 % de fucsina ácida e 0,01 % de ácido acético glacial). Após lavagem com água destilada, as lâminas foram coradas por 10 a 15 minutos com diferenciador de Masson (solução aquosa, 2,5 % de ácido fosfotúngstico e 2,5 % de ácido fosfomolibdico), em seguida, azul de anilina 2,5 % acrescido de 2 mL de ácido acético glacial para cada 100 mL de solução. Após coradas, as lâminas foram desidratadas e diafanizadas em banhos sequenciais de soluções de etanol com concentração crescente, seguidos de 2 banhos em xilol. Os cortes foram montados entre lâmina e lamínula com permount. A quantificação de cristais de 2,8 DHA foi obtido pela contagem de 50 campos consecutivos em um aumento final de 400X e o valor obtido foi expresso em número de cristais por mm<sup>2</sup>.

### **3.6 Imuno-histoquímica do tecido renal**

A análise de mediadores inflamatórios e fibrose foi feita através de imuno-histoquímica. Os tecidos parafinizados cortados em espessura de 4 µm e colocados em lâminas previamente silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).

Os tecidos renais montados em lâminas silanizadas foram mantidos em estufa a 60°C durante 30 minutos. Após esse procedimento, os tecidos foram submetidos à desparafinização em 3 banhos de xilol e re-hidratados em etanol (concentrações decrescentes) e água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em panela a vapor por 30 minutos a temperatura de 98 °C, em solução de ácido cítrico 10 mM de pH

6,0. Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida para evitar o ressecamento dos cortes.

#### *Infiltração de Macrófagos (M $\phi$ total)*

O método da Fosfatase Alcalina foi usado para identificar de células positivas para M $\phi$ . Após desparafinização e recuperação antigênica, foi realizado o bloqueio da biotina endógena incubando os cortes com solução de bloqueio de Avidina e Biotina (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 15 minutos cada. Depois, incubados por 30 minutos com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) na concentração de 1:50 diluído em solução de BSA 1% em TBS. Foi feita a incubação com o anticorpo primário desenvolvido em camundongo anti-CD68 (Serotec, MCA341R Oxford, Reino Unido) na diluição 1:200 em temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Após a retirada do excesso de anticorpo primário, os cortes foram lavados com TBS e incubados com o anticorpo secundário anti-Camundongo Biotinilado (Vector, #BA2001) na diluição 1:200 em solução de BSA 1%, sob temperatura ambiente, por 45 minutos. Depois, os cortes foram incubados durante 30 minutos com o Complexo Estreptavidina-Fosfatase Alcalina (Vector Lab, Burlingame, EUA) por 30 minutos. Ao término desse procedimento, os tecidos foram lavados com TBS e estavam prontos para a revelação em tempo variável com substrato cromogênico Fast Red filtrado (1 mg de naftol AS-MX fosfato (Sigma 067K5300), 100  $\mu$ l de dimetilformamida, 4,9 ml de solução Tris 0,1 M de pH 8,2, 5  $\mu$ l de levamisol 1 M e 5 mg de FastRed). A precipitação do produto da reação da fosfatase alcalina do Complexo e do FastRed presente no substrato cromogênico permitiu a visualização das células positivas para o epítipo ED-1. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquoso de Mayer



(Glicergel) e em seguida devidamente etiquetados. A contagem de macrófagos foi feita através de células marcadas no córtex renal com aumento de 400X. Foram observados 25 campos microscópicos para cada rato, o que corresponde a uma área de 1,6 mm<sup>2</sup> e os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/m<sup>2</sup>).

#### *Infiltração de Macrófagos com fenótipo M2 (CD206+)*

Para a identificar os macrófagos com fenótipo M2, foi empregado o método da Fosfatase Alcalina. Após desparafinização e recuperação antigênica, as marcações inespecíficas foram bloqueadas com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) na concentração de 1:50 diluído em solução de Leite desnatado 5% em TBS durante 50 minutos. Em seguida, foi feita a incubação por 18 horas com o anticorpo primário anti-Receptor de Manose (#Ab64693) na diluição 1:10.000 em BSA 1%, em câmara úmida. Após lavagem em TBS, os cortes receberam 80µl de solução Envision Link Rabbit/Mouse (Dako, Carpinteria, CA, EUA), por 30 minutos. Depois de lavados com TBS, foram incubados com 80µl da solução Enzima AP (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 30 minutos. Novamente lavados com em TBS [1X], os cortes foram incubados com substrato cromogênico Permanet Red (Dako, Carpinteria, CA, EUA), preparado na proporção de 1:100 em substrato. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquosa de Mayer (Glicergel). A quantificação de macrófagos com fenótipo M2 foi realizada pela contagem de células marcadas no córtex renal com aumento de 400X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada animal, correspondendo a uma área de 1,6 mm<sup>2</sup> e os resultados expressos em células por milímetro quadrado (cél/m<sup>2</sup>).

### *Infiltração de células intersticiais NLRP3+*

As células positivas para o inflamassoma NLRP3 foram identificadas método da Peroxidase Endógena. Após desparafinização e recuperação antigênica, a Peroxidase Endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio acrescida de metanol por 30 minutos. Após lavagem em tampão TBS, os cortes foram incubados por 30 minutos com solução Dako Protein Block (Dako, Carpinteria, CA, EUA), para bloqueio de marcação inespecífica. Removeu-se o excesso dessa solução e os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-NLRP3 (#NovusBioNBP2-12446) na diluição 1:400 em BSA 1%, durante 18 horas em câmara úmida. Após banho de TBS, foram incubados por 30 minutos com solução de Envision Flex HRP (Dako, Carpinteria, CA, EUA). O substrato cromogênico DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi preparado na proporção de 1:20 em substrato. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquosa de Mayer (Glicergel). A quantificação de células positivas para o inflamassoma NLRP3 foi realizada pela contagem de células marcadas no córtex renal com aumento de 400X. Foram examinados 25 campos microscópicos para cada seção, correspondendo a uma área de 1,6 mm<sup>2</sup>. Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/m<sup>2</sup>).

### *Identificação de Colágeno 1 (Col-1) e Aminopeptidase Endotelial (JG-12)*

O método da Peroxidase Endógena foi empregado para a identificação de Col-1 e JG-12. Após a desparafinização e recuperação antigênica procedeu-se o bloqueio da Peroxidase Endógena, como descrito anteriormente, por 30 minutos. Após serem lavagem com TBS, o bloqueio da marcação inespecífica foi feito durante 30 minutos

com soro não imune de cavalo na diluição de 1:50 em solução de BSA 1% e Leite 2%, respectivamente. Em seguida, os tecidos renais foram incubados durante 18 horas com os anticorpos primários anti-Colágeno tipo 1 (Abcam®, Cambridge, UK) diluído na proporção de 1:200 em solução de BSA 1% em TBS e anti-JG-12 (BenderMed System, GmbH, Austria) diluído na proporção 1:100 em Leite 2%, à temperatura de 3-8°C. Após lavagem em TBS, os cortes de JG-12 receberam o bloqueio pós-primário com uma solução de BSA 1%+ Leite 2%. Em seguida, todos os cortes foram incubados por 30 minutos com 80µl de Envision Flex HRP (Dako, Carpinteria, CA, EUA). O substrato cromogênico DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi preparado na proporção de 1:20 em substrato. Os cortes montados com lamínula com meio aquoso de Mayer (Glicergel) e devidamente etiquetados. A porcentagem da córtex renal ocupada por Col-1 e a % de área de vasos positivos para JG-12 foram quantificadas pelo método de contagem de pontos em 25 campos microscópicos consecutivos, num aumento final de 400x com uma ocular graticulada de 144 pontos (106).

#### *Identificação de células Ang II e $\alpha$ -SMA positivas*

Para avaliar a expressão de Ang II e  $\alpha$ -SMA foi empregada a técnica da Estreptavidina-Biotina-Fosfatase Alcalina. Após a desparafinização e exposição dos epítomos, os tecidos foram submetidos ao bloqueio da biotina endógena através da incubação com solução de bloqueio de Avidina e Biotina (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 15 minutos cada. Depois, foram incubados com soro não imune de cavalo (Vector Lab, Burlingame, EUA) na concentração de 1:50 diluído em solução de Leite desnatado 5% e 2% em TBS, respectivamente, por 30 minutos. Em seguida, incubados por 24

horas com os respectivos anticorpos primários; anti-All (Península Laboratories #T4007) e anti- $\alpha$ -SMA (Sigma-Aldrich), diluídos em BSA 1% nas proporções de 1:400 e 1:800. Após 18 horas, os cortes foram incubados com seus respectivos anticorpos secundários, anti-coelho biotinizado (Vector BA-1000) e anti-camundongo biotinizado (Vector BA-2001), diluídos em BSA 1% nas proporções de 1:1000 e 1:200, durante 45 minutos. Posteriormente, os cortes para All foram incubados durante 30 minutos com o Complexo Estreptavidina-Fosfatase Alcalina (Vector Lab, Burlingame, EUA) e os cortes para  $\alpha$ -SMA com Dako Estreptavidina Fosfatase Alcalina (Dako Carpinteria, CA, EUA) e por fim, revelados com substrato cromogênico Fast Red, preparado conforme descrito anteriormente, com tempo variável. Os cortes foram colocados entre a lâmina e a lamínula com meio de montagem aquosa de Mayer (Glicergel) e foram em seguida devidamente etiquetados.

Para quantificar o infiltrado de células intersticiais AngII positivas foi feita a contagem de células marcadas no córtex renal, ao microscópio com aumento de 400x, analisando-se 25 campos de cada animal, correspondendo à área de 1,6 mm<sup>2</sup>. Os resultados foram apresentados como células positivas por milímetro quadrado (céls/mm<sup>2</sup>).

A expressão de  $\alpha$ -SMA é constitutivamente em artérias e arteríolas, porém, diante de um processo inflamatório crônico, passa a se instalar no interstício renal, indicando a presença de miofibroblastos nesse compartimento. O percentual de área intersticial renal ocupada pela  $\alpha$ -SMA foi avaliada pelo método de contagem de pontos em 25 campos microscópicos consecutivos, sob um aumento de 400x, com auxílio de

uma ocular graticulada de 144 pontos (106). As artérias e arteríolas positivas foram desconsideradas, já que a positividade nessas estruturas é considerada constitutiva.

#### *Hipóxia renal: Pimonidazol*

Como mencionado anteriormente, os animais receberam injeções intraperitoneais de PimonidazolHCl / Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 (IRG Biosciences, EUA) diluído em soro fisiológico a 0,9%, um composto que, sob baixa pO<sub>2</sub>, liga-se a proteínas tissulares formando adutos, ou seja, produtos de sua ligação direta a essas proteínas. Após os procedimentos de desparafinização e recuperação dos antígenos, foi realizado o bloqueio da Peroxidase Endógena, c. Sucedeu-se o bloqueio de marcações inespecíficas no tecido, incubando-os com 1 gota (cerca de 80µl) de Avidina (Dako #X0590) por 15 minutos, lavados em TBS por 5 minutos sob leve agitação. Em seguida, foram incubados com 1 gota de Biotina (Dako #X0590) também por 15 minutos. Por fim, após nova lavagem em TBS por 5 minutos sob leve agitação, aplicou-se 1 gota de Protein Block (Dako #X0909) sobre os cortes, os quais foram incubados por 30 minutos. A partir disso, os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-Pimonidazol (Mab1 #9.7.11, Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 Kit) na diluição 1:500 em solução de BSA 1%, sob temperatura de 3-8°C durante um período de 18 horas. Em seguida, os cortes foram lavados com TBS por 5 minutos sob leve agitação e incubados com anticorpo secundário anti-Camundongo Biotinilado (Vector, #BA2001) na diluição 1:200 em solução de BSA 1%, sob temperatura ambiente, por 45 minutos. Após banho em TBS por 5 minutos sob leve agitação, os cortes foram incubados com 1 gota de Streptavidina HRP por 30 minutos (Dako, #K0690) e novamente lavados em TBS por 5 minutos sob

leve agitação. A revelação foi feita com cromógeno DAB (Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 6 minutos e a contracoloração com hematoxilina de Harris por 2 minutos. Os cortes foram avaliados apenas qualitativamente, sob um aumento de 20x, observando a coloração das regiões corticais e medulares.

### **3.7 Análises do conteúdo proteico do tecido renal**

**Extração e quantificação de proteínas teciduais** – Amostras de tecido renal pesando entre 100-200 mg foram colocadas em tubos de polipropileno reforçado, contendo microesferas de cerâmica (OMNI 19-628), juntamente com tampão RIPA (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e inibidores de proteases e fosfatases (Complete-EDTA e PhosSTOP, Roche®), para serem homogeneizados no aparelho OMNI BEAD RUPTOR 24. A concentração proteica total foi determinada utilizando um kit comercial (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific®, Massachusetts, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

### **3.8 Western Blot**

#### *Conteúdo proteico de TLR4, NLRP3, Caspase-1 e IL-6*

De cada animal, 100 µg de proteína do extrato tecidual diluídos em tampão de amostra (Laemmli Sample Buffer – BIORAD) foram usados para a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em concentração estabelecida pelo laboratório, durante em 90 minutos a 120 Volts. Posteriormente, a transferência

dos géis (transferência úmida e semi-úmida, respectivamente) para membranas de nitrocelulose foi realizada por 2 horas a 400mA para transferência úmida e 45 minutos a 20V para transferência semi-úmida. Em seguida, para conferir a transferência, as membranas foram coradas com Solução de Ponceau (Sigma Aldrich, USA) e lavadas três vezes com solução de TBSt (TBS [NaCl Glicina Tris-Base ,10x], Água destilada, Tween 20, pH 7.4). As membranas seguiram para o bloqueio por 2 horas à temperatura ambiente sob leve agitação em solução de BSA 5% em TBSt para TLR4 e Leite 5% em TBSt para NLRP3, Caspase-1 e IL-6. Depois, foram incubadas com os respectivos anticorpos primários, diluído em BSA a 1% em TBSt, na seguinte proporção: anti-TLR4 (Santa Cruz) 1:250, anti-NLRP3 (NovusBio) 1:200, anti-Caspase-1 (Santa Cruz) 1:1000 e anti-IL-6 (Sigma Aldrich)1:1000. A incubação foi a temperatura de 4°C sob leve agitação e durou 18 horas (over night). Em seguida, as membranas foram lavadas com solução de TBSt por 5 minutos e incubadas com os respectivos anticorpos secundários (Anti-Coelho-HRP: 1:5000, Sigma-Aldrich; Anti-Camundongo HRP: 1:15000, Sigma-Aldrich), durante 2 horas, a 4°C, sob leve agitação, seguindo-se três banhos de TBSt de 5 minutos.

#### *Fração Nuclear do dímero p65 do Sistema NF- $\kappa$ B*

Para separar a porção nuclear da citoplasmática, 100 mg de tecido renal foi utilizado, adicionando-se 1000  $\mu$ L da solução Tampão A (HEPES [10X], KCl [10X], MgCl<sub>2</sub> [10X], Sacarose [5X], glicerol PA, NP-40 PA e inibidores de protease e fosfatase (Roche, Suíça). A amostra foi homogeneizada em gelo com o Dounce Homogenizer (Sigma Aldrich, USA), transferindo o conteúdo para um tubo pré-

refrigerado, centrifugando a 1000G por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante (fração citoplasmática) foi transferido para um tubo pré-refrigerado e o pellet ressuspendido com 1mL do tampão A, centrifugado a 1000G por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi novamente suspenso em 200 µL no tampão B (Sacarose, SDS, Tris-HCl [10X], Bromo-phenol-blue e beta mercaptoetanol PA). Por 15 minutos, a solução foi centrifugada a 1500G a 4 °C. O sobrenadante (fração nuclear) foi transferido para um tubo pré-refrigerado e armazenado. As amostras de fração nuclear foram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), durante 90 minutos a 120 Volts. Em seguida, o gel foi transferido (transferência semi-úmida) a uma membrana de nitrocelulose, durante 45 minutos a 20V. Após a transferência, a membrana foi corada com Solução de Ponceau conferência da transferência e depois lavada três vezes com solução de TBSt (TBS [10x] água destilada Tween 20, pH 7.4), foi bloqueada por 2 horas à temperatura ambiente sob leve agitação em solução de Leite3% + BSA3% em TBSt. Após o bloqueio, foi feita a incubação com o anticorpo primário anti-p65 fosforilado (CellSignaling, Massachussets, EUA) diluído em BSA a 1% em TBS na proporção 1:100, durante 18 horas a 4°C. Em seguida, foi lavada com solução de TBSt por 5 minutos e acrescentado com o anticorpo secundário (Anti-coelho-HRP: 1:5000, Sigma-Aldrich), por 2 horas, a 4°C, sob agitação, seguindo-se três lavagens de 5 minutos com TBSt.



### *Conteúdo proteico de HO-1, SOD1 e SOD2*

Para cada amostra, 100µg (paraHO-1 e SOD1) e 25 µg (para MnSOD) de proteína do extrato tecidual diluídos em tampão de amostra (Laemmli Sample Buffer – BIORAD) foram utilizados para a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em concentração padronizado pelo laboratório, a 120 Volts. A transferência (transferência semi-úmida) dos géis para membranas de nitrocelulose foi feita durante 45 minutos a 20V. Após esse processo, a Solução de Ponceau foi usada conferir a transferência. Posteriormente lavadas com solução de TBSt e bloqueadas por 2 horas à temperatura ambiente sob leve agitação em solução de Leite 5% em TBSt para as 3 moléculas alvo. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários, diluídos em TBSt, na seguinte proporção: anti-HO-1 (Abcam) 1:500, anti-SOD1 (Abcam) 1:50.000 e anti-SOD2 (Cayman) 1:10.000. A incubação foi feita durante 18 horas a 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas em TBSt por 5 minutos e incubadas com os respectivos anticorpos secundários (Anti-Camundongo HRP: 1:15000 (Sigma-Aldrich) e Anti-coelho-HRP: 1:5000 (Sigma-Aldrich), por 2 horas, a 4°C, sob agitação, seguindo-se três lavagens de 5 minutos com TBSt.

### *Identificação e quantificação das bandas*

A quimioluminescência foi o método adotado para a revelar as proteínas alvo das membranas, através de kit comercial (Pierce SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific®), e as imagens registradas através

de um aparelho fotodocumentador (UVITEC Cambridge®). A identificação, análise e quantificação das bandas foram feitas utilizando o software Uvisoft-Uviband Max (UVITEC Cambridge®, UK). A proteína constitutiva  $\beta$ -actina (anti- $\beta$ -actina, Sigma-Aldrich, 1:5000 em BSA 1%) foi utilizada Para a normalização dos resultados das proteínas alvo TLR4, NLRP3, Caspase-1, IL-6, HO-1, SOD1 e SOD2. Para a normalização dos resultados da proteína alvo p65 fosforilada, a proteína constitutiva nuclear histona H2B (anti-histona H2B, Abcam, 1:1000 em BSA 1%). Para bloquear marcações inespecíficas das proteínas constitutivas, as membranas foram previamente incubadas com BSA 5% e em seguida, o excesso foi retirado, adicionando-se os respectivos anticorpos primários, as quais permaneceram durante 18 horas à 4°C. Em seguida, foram lavadas com TBSt e incubadas com os respectivos anticorpos secundários e posteriormente reveladas.

### **3.9 Análise Estatística**

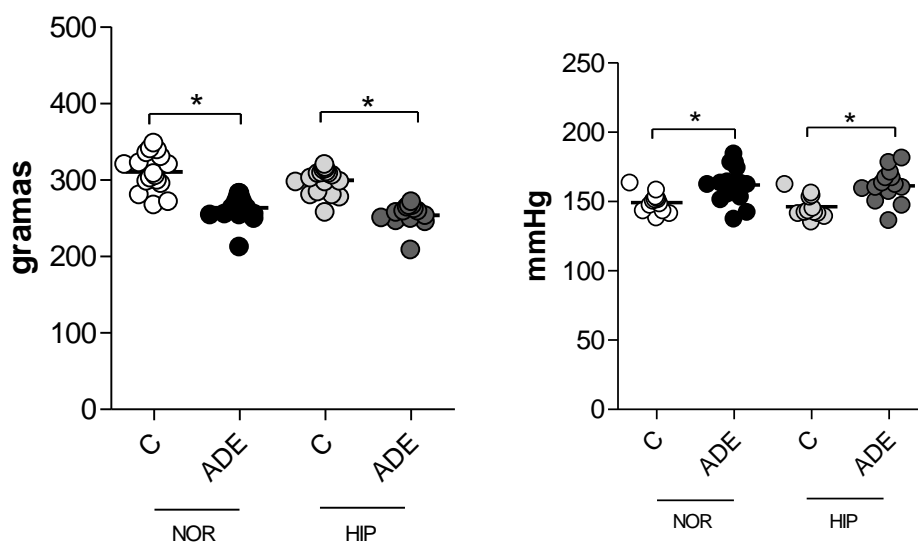
A análise de variância (ANOVA) de um fator seguida de pós-teste pelo método de Newman-Keuls (107) foi utilizada para avaliar os resultados, considerando significantes os valores de “p” menores que 0,05. O software GraphPad Prism® versão 4.0 foi utilizado para realizar os cálculos e os resultados apresentados no formato média  $\pm$  erro padrão.

## 4. RESULTADOS

### Protocolo 1 – Sobrecarga de Adenina na dieta

#### *Mortalidade, Peso corpóreo (PE) e Pressão Caudal (PC)*

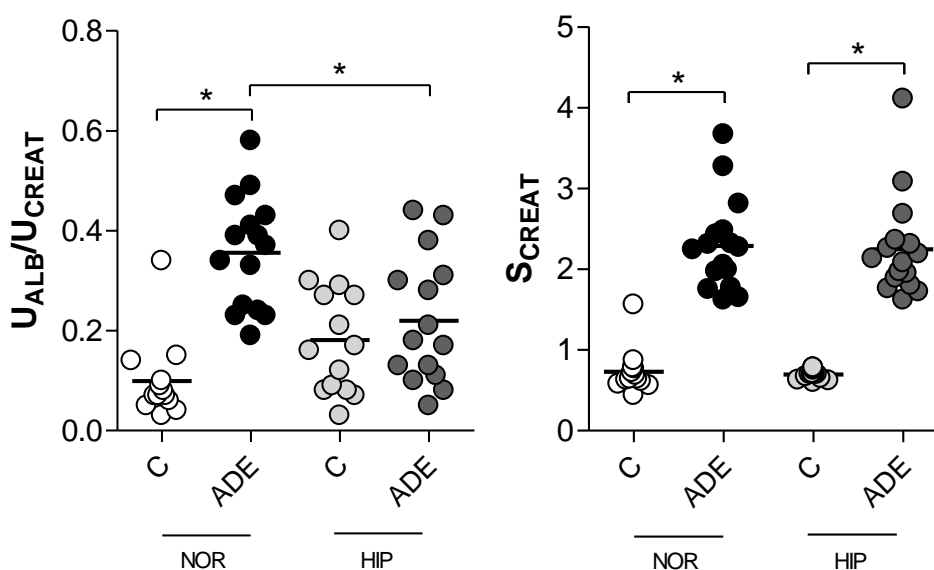
Todos os animais sobreviveram até o final do protocolo. Os animais que receberam a dieta contendo ADE 0,5% apresentaram perda de peso. Essa redução no peso corpóreo dos animais se deu a uma baixa ingestão da ração contendo ADE 0,5%. No entanto, mesmo com a menor ingestão, foi possível verificar a presença de cristais de 2,8-DHA no tecido renal. Os animais que receberam a dieta contendo ADE 0,5% apresentaram aumento da pressão caudal ( $p < 0,05$  vs C). Nesse modelo, a hipertensão pode ser atribuída à constrição vascular renal relacionada a elevação da viscosidade do sangue e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (108).



**Figura 7.** Peso corpóreo e pressão caudal dos grupos de estudo após 2 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP.

*Relação da Excreção Urinária de Albumina e Creatinina ( $U_{ALB}/U_{CREAT}$ ) e Concentração Sérica de Creatinina ( $S_{CREAT}$ )*

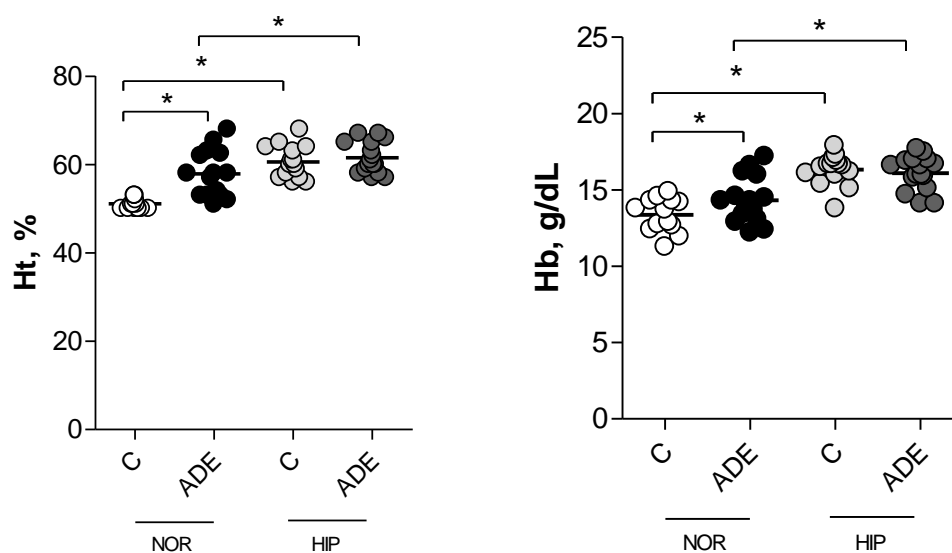
Os animais ADE 0,5% que permaneceram em condições de normóxia apresentaram aumento da relação da excreção urinária de albumina e creatinina ( $p < 0,05$  vs C). Os animais ADE 0,5% submetidos a hipóxia apresentaram redução numérica da relação  $U_{ALB}/U_{CREAT}$  ( $p < 0,05$  vs  $ADE_{NOR}$ ), semelhante aos animais controle submetidos a hipóxia ( $p < 0,05$  vs  $C_{HIP}$ ). Os animais ADE 0,5%, tanto em normóxia como em hipóxia, apresentaram maior retenção de creatinina sérica, ( $p < 0,05$  vs respectivo C), indicando redução na função renal.



**Figura 8.** Relação  $U_{ALB}/U_{CREAT}$  e concentração sérica de creatinina dos grupos de estudo após 2 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP.

### Hematócrito (Ht) e Hemoglobina (Hb)

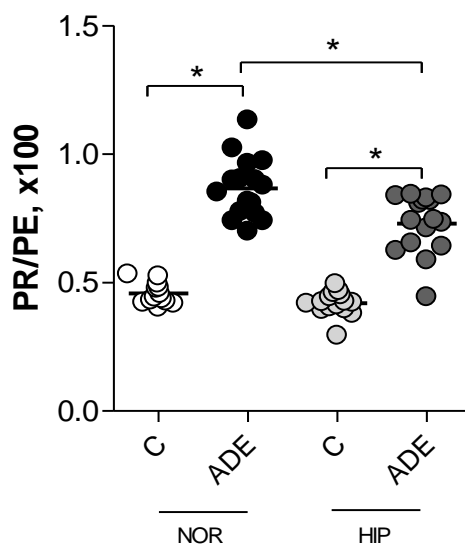
Os animais ADE<sub>NOR</sub> apresentaram aumento do hematócrito e da hemoglobina ( $p < 0,05$  vs respectivo C), possivelmente devido à hemoconcentração e ao aumento da viscosidade sanguínea (108, 109). Sabe-se que a hipóxia é capaz de promover aumento do número de hemácias e da hemoglobina, uma adaptação destinada a melhorar a captação de oxigênio pelas células. Esses aumentos foram observados em ambos os grupos submetidos à hipóxia ( $p < 0,05$  vs respectivo C;  $p < 0,05$  vs ADE<sub>NOR</sub>).



**Figura 9.** Hematócrito e hemoglobina dos grupos de estudo após 2 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP.

### Hipertrofia Renal

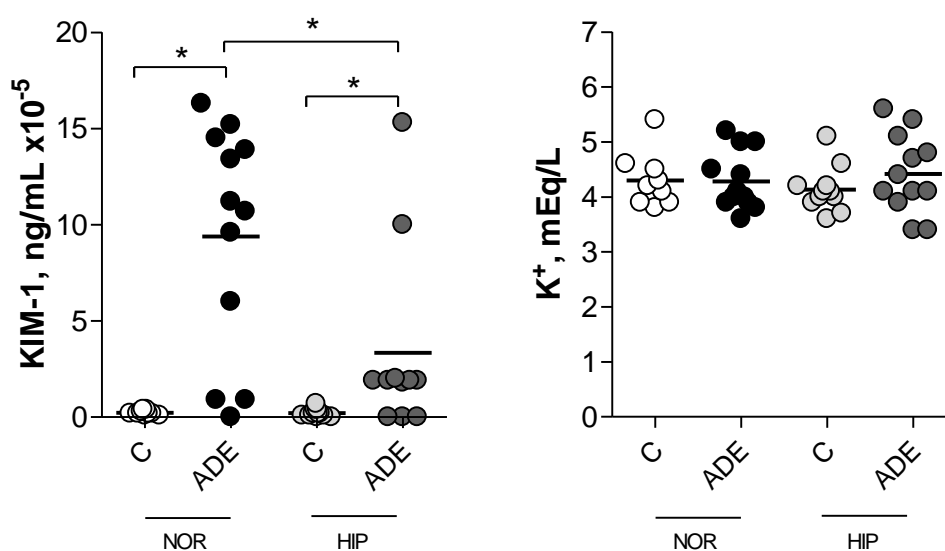
A hipertrofia renal foi demonstrada através da relação entre o peso renal (PR) e o peso corpóreo (PE) dos animais. Os animais ADE, tanto em normóxia como em hipóxia, apresentaram aumento do PR/PE ( $p < 0,05$  vs respectivo C), provavelmente devido ao edema intenso desencadeado pela sobrecarga de Adenina. No entanto, os animais que permaneceram em hipóxia apresentaram redução dessa relação ( $p < 0,05$  vs respectivo C;  $p < 0,05$  vs ADE<sub>NOR</sub>), sugerindo que a hipóxia possa atenuar o edema tecidual.



**Figura 10.** Relação do Peso Renal/Peso Corpóreo dos grupos de estudo após 2 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP.

### KIM-1 urinário e Potássio Plasmático

Os animais ADE apresentaram aumento substancial da concentração urinária de KIM-1 em relação aos animais C ( $p < 0,05$ ), sugerindo intensa lesão tubular nesses animais. No entanto, a concentração de KIM-1 (ng/mL) na urina dos animais ADE submetidos à hipóxia foi reduzida, indicando redução da injúria tubular nesses animais. Em relação ao potássio plasmático (mEq/L), não foram observadas alterações significantes entre os grupos de acompanhamento.

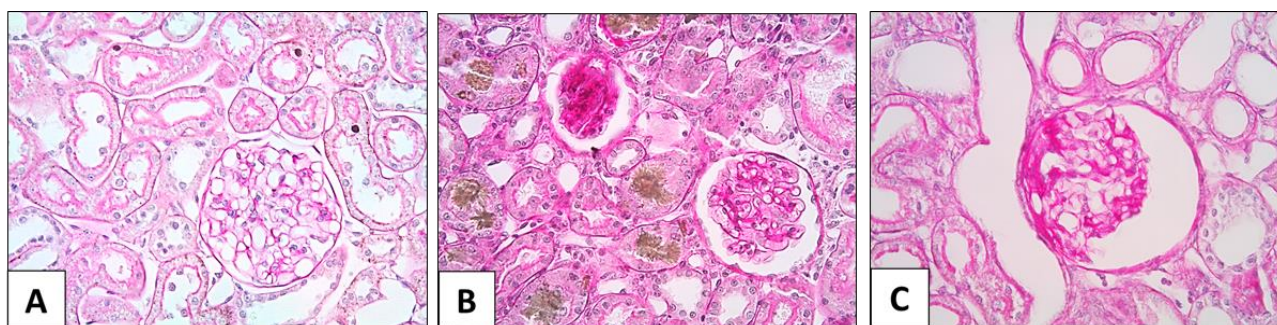


**Figura 11.** Concentração urinária de KIM-1 (ng/mL) e Potássio plasmático (mEq/L) dos grupos de estudo após 2 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média ± EP.

## *Análise Histológica do Tecido Renal*

### *Isquemia Glomerular e Esclerose Glomerular*

Na Figura12 estão apresentadas fotomicrografias das lesões glomerulares (ISQ e GS) observadas nos grupos de estudo. É sabido que o modelo de sobrecarga de adenina não intensifica as lesões glomerulares, apenas no túbulointersticial. Após duas semanas, os animais ADE<sub>NOR</sub> e ADE<sub>HIP</sub> apresentaram algumas dessas lesões glomerulares, no entanto, os valores obtidos neste estudo de curto prazo são muito inferiores aos observados em outros estudos de longo prazo (110), por tanto foi realizada apenas a análise qualitativa das lesões.

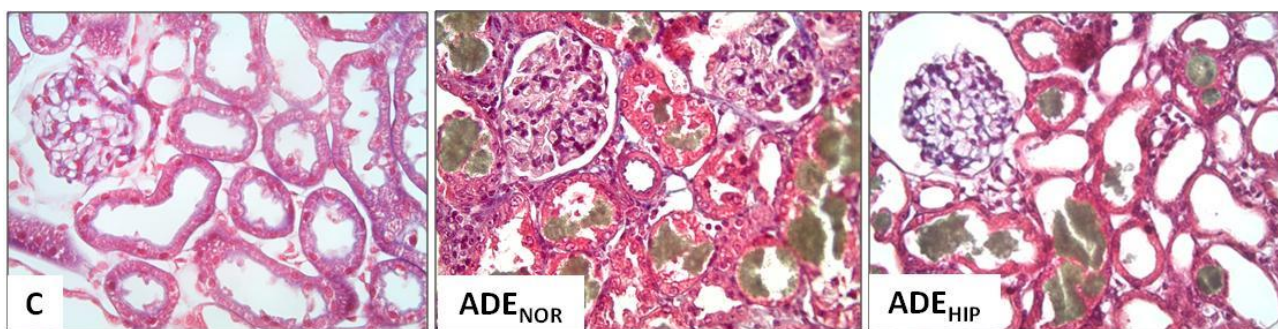


**Figura12.** Fotomicrografias representativas de glomérulo normal (A) do grupo C, glomérulo isquêmico (B) e glomérulo com esclerose (C) do grupo ADE. Coloração PAS, aumento 400X.

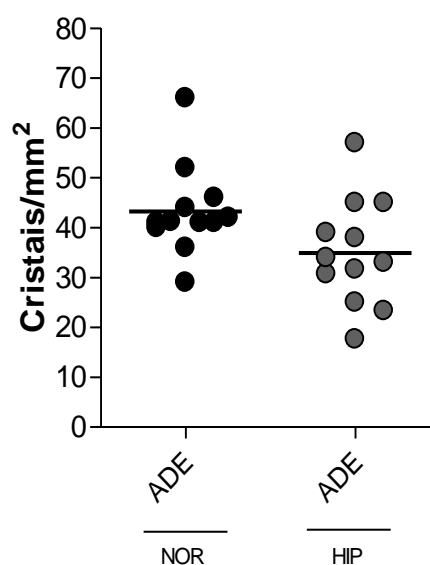


### *Cristais de 2,8-DHA no parênquima renal*

Através da coloração de Tricrômio de Masson, foi possível observar a presença de cristais no parênquima renal (intersticial, no lúmen tubular, em regiões intratubulares ou até mesmo formando granulomas) dos animais ADE, sendo a principal característica desse modelo de nefrite tubulointersticial (21). Não houve diferença na densidade de cristais entre os grupos ADE<sub>NOR</sub> e ADE<sub>HIP</sub>, sugerindo que a permanência na câmara de hipóxia não alterou o consumo da dieta. Como esperado os animais C não apresentaram cristais de 2,8-DHA no interstício renal.



**Figura 13.** Fotomicrografias representativas da presença de cristais de 2,8 DHA após 2 semanas de acompanhamento. C: animal controle. ADE: animal adenina. Aumento de 400x.



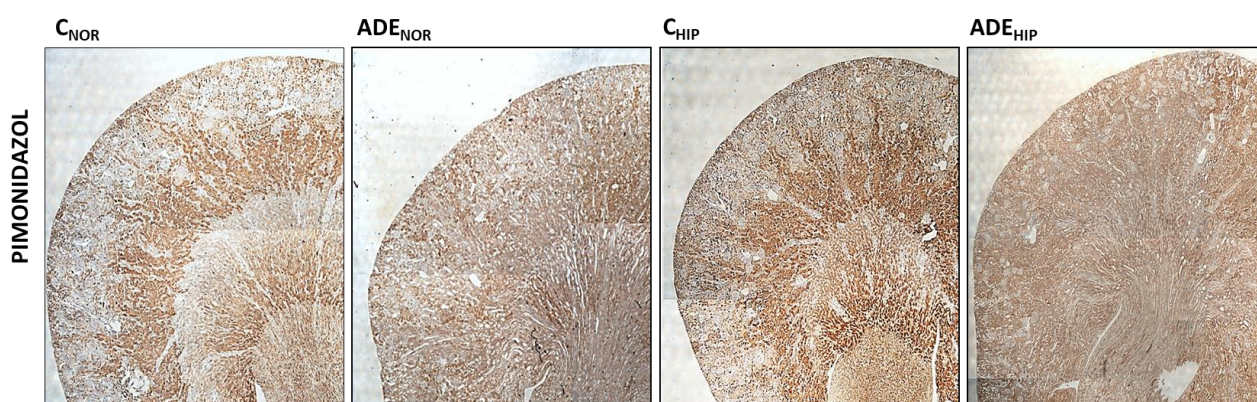
**Figura 14.** Número de cristais de 2,8-DHA no interstício renal dos grupos de estudo após 2 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP.

### *Análise da Hipóxia Tecidual*

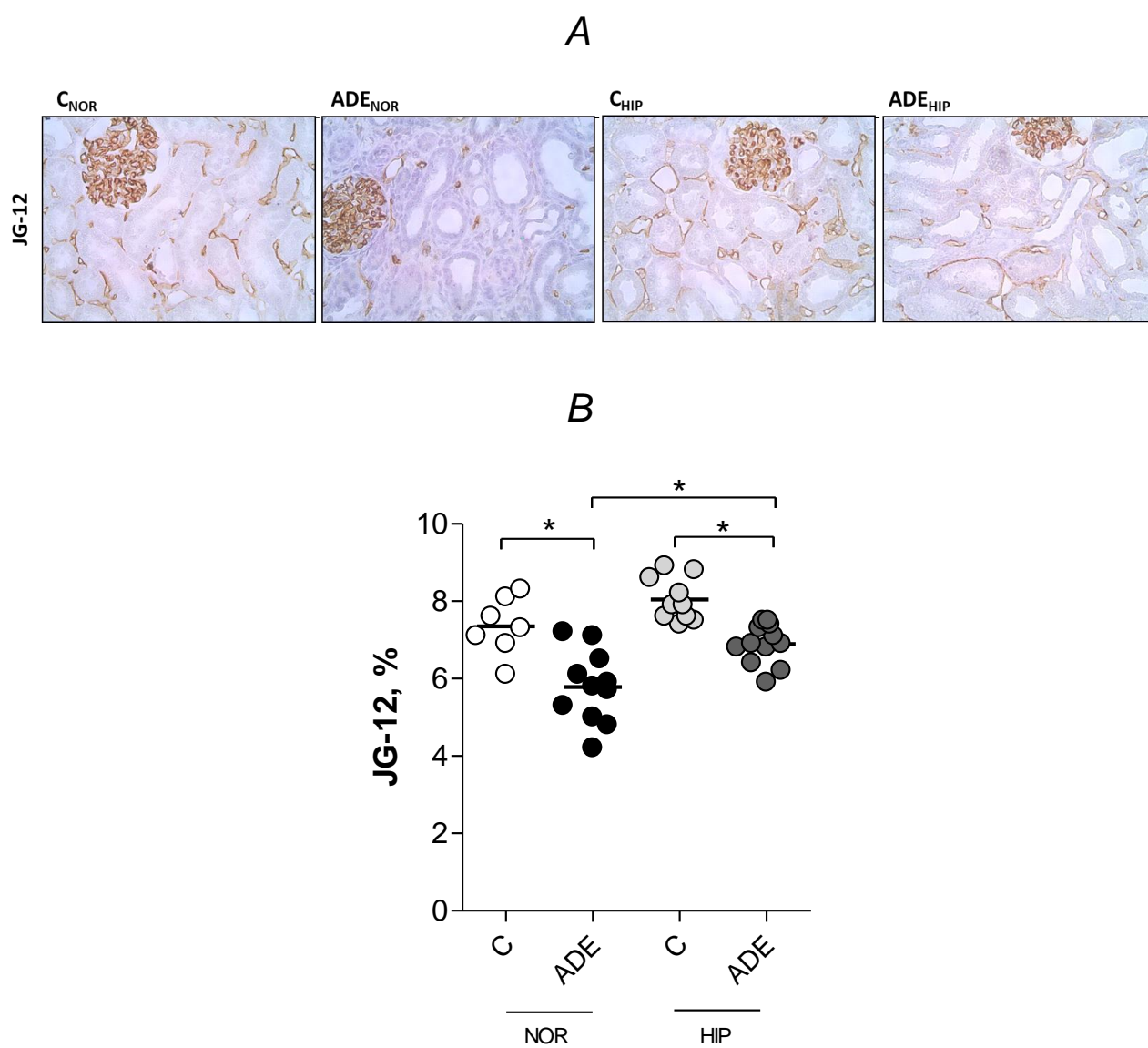
A análise qualitativa da Hipóxia renal foi avaliada através da marcação imuno-histoquímica para adutos tissulares formados em baixa  $pO_2$  através da ligação direta de proteínas ao composto Pimonidazol injetado. Como sabemos, a hipóxia renal está presente na região medular devido ao intenso transporte ativo desses segmentos do néfron.

Os animais C e ADE em normóxia apresentaram marcação apenas nessa região enquanto os animais submetidos à hipóxia apresentaram marcação positiva nas regiões corticais, sugerindo que a hipóxia se estendeu por todo o rim, com exceção dos glomérulos (Figura 15).

Em relação à análise quantitativa (Figuras 16A e 16B), avaliada através da densidade de capilares peritubulares positivos para a marcação da Aminopeptidase (JG-12), observamos que houve uma redução significativa da densidade capilar nos animais ADE<sub>NOR</sub>, decorrente, principalmente, pela intensa fibrose intersticial do tecido renal desses animais. Já os animais ADE<sub>HIP</sub> apresentaram menor rarefação capilar, o que sugere possível efeito renoprotetor da hipóxia, mantendo a densidade capilar.



**Figura 15.** Fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica de Pimonidazol para detecção da hipóxia renal dos grupos após 2 semanas de acompanhamento. Aumento de 100X.



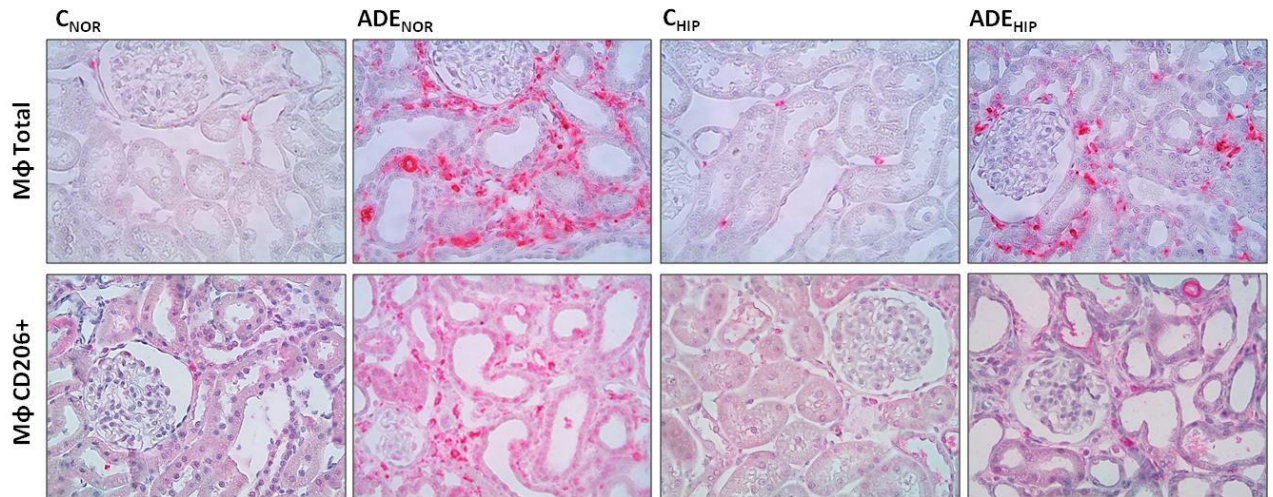
**Figura 16.** A: Fotomicrografias representativas imuno-histoquímica de JG-12 dos grupos após 2 semanas de acompanhamento. Aumento de 400X; B: Porcentagem de JG-12 dos grupos de estudo após 2 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP.

## *Análise imuno-histoquímica do Tecido Renal*

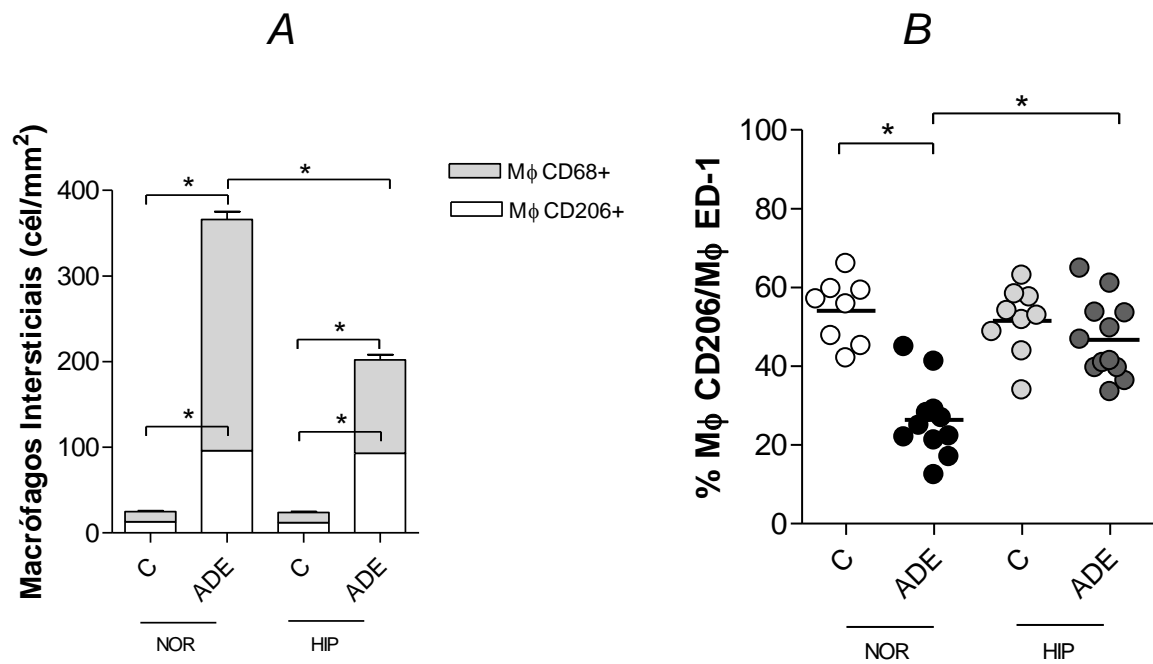
### *Infiltrado Intersticial de Macrófagos*

A sobrecarga de ADE provocou elevada infiltração de macrófagos no interstício renal, indicando intenso processo inflamatório ( $p < 0,05$  vs C). Os animais ADE submetidos à hipóxia apresentaram menor infiltrado intersticial de macrófagos, sugerindo um efeito protetor contra a inflamação. Em relação ao número de macrófagos com fenótipo M2 (CD206+), observamos que os animais ADE apresentaram aumento significativo em relação a seu respectivo grupo controle ( $p < 0,05$  vs C).

Entretanto, ao analisarmos a proporção entre os fenótipos dos macrófagos intersticiais, observamos nos animais ADE<sub>NOR</sub> uma menor abundância de macrófagos do tipo M2, um perfil anti-inflamatório, sugerindo que a maior parte dos macrófagos presentes possui perfil M1, contribuindo para a inflamação intersticial nesses animais. Nos animais ADE<sub>HIP</sub>, a quantidade de macrófagos M2 foi semelhante à observada nos animais C e significativamente elevada quando comparada aos animais ADE<sub>NOR</sub> ( $p < 0,05$  vs ADE<sub>NOR</sub>), além disso, corresponde à metade do total de macrófagos encontrados nesse grupo, sugerindo que a hipóxia não apenas reduziu a infiltração de macrófagos no interstício renal, mas também favoreceu a polarização para o fenótipo M2.



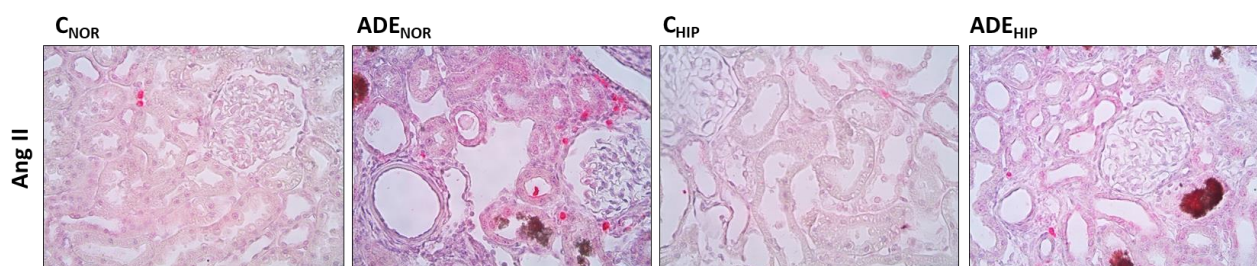
**Figura 17.** Fotomicrografias representativas do infiltrado de macrófagos dos grupos de estudo. Aumento de 400X.



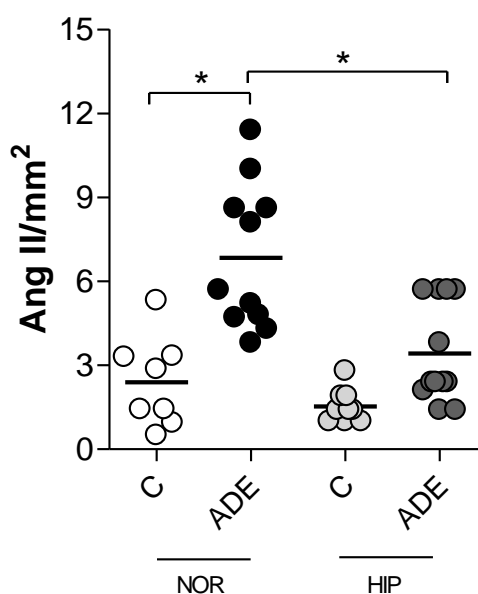
**Figura 18.** A: Infiltrado de macrófagos (Mφ) dos grupos de estudo após 2 semanas de acompanhamento. B: Relação Mφ CD206+/Mφ CD68. Resultados apresentados como Média±EP.

### Infiltrado Intersticial de Células Angiotensina II+

Os animais ADE apresentaram aumento no número de células Ang II+ intersticiais ( $p < 0,05$  vs  $C_{NOR}$ ), as quais exercem efeitos inflamatórios importantes no interstício renal. Os animais ADE submetidos à hipóxia apresentaram menor infiltrado intersticial de células Ang II+, o que sugere um possível efeito renoprotetor da hipóxia na inflamação do interstício renal.



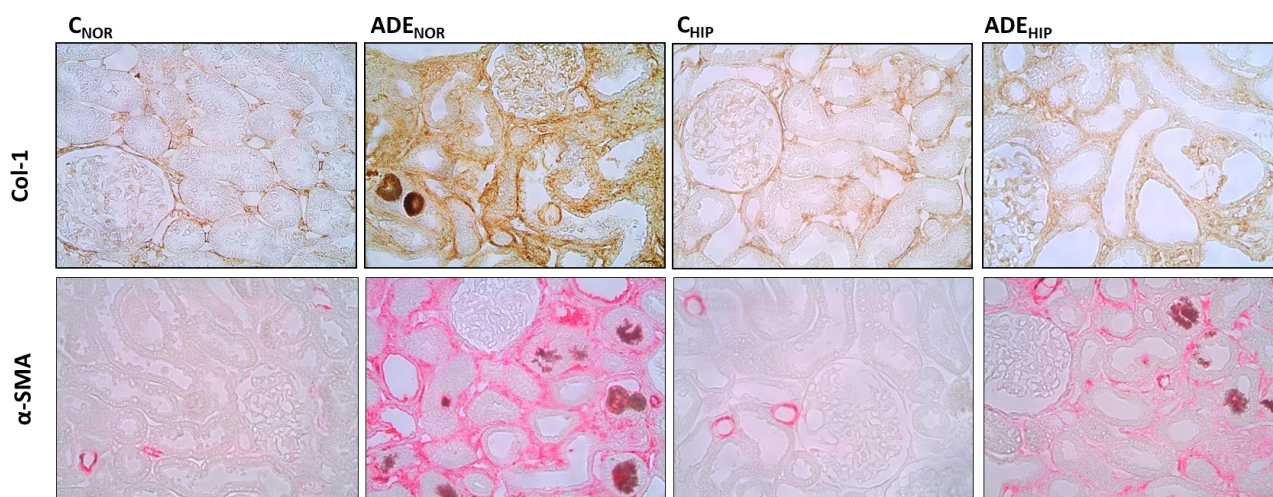
**Figura 19.** Microfotografia representativa do infiltrado de células Ang II+ dos grupos de estudo. Aumento de 400X.



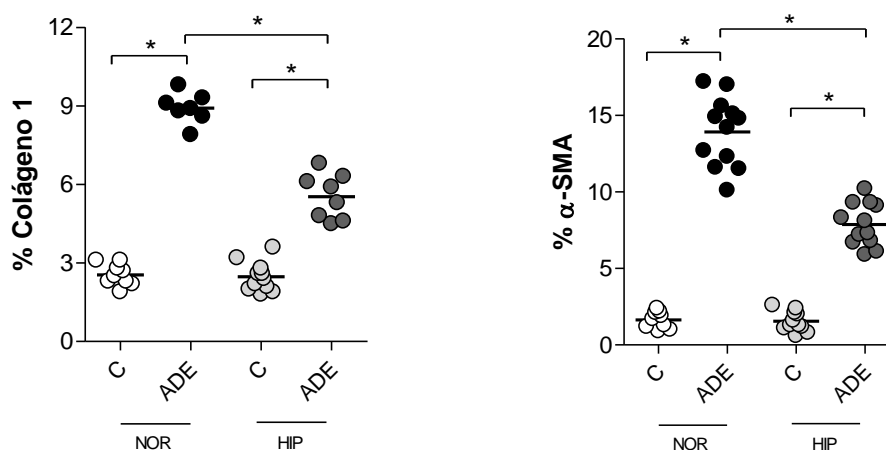
**Figura 20.** Infiltrado de células Ang II+ dos grupos de estudo após 2 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média ± EP.

### Deposição intersticial de Colágeno-1 e $\alpha$ -SMA

Após 2 semanas, a sobrecarga de adenina promoveu maior deposição intersticial de Col-1 e maior infiltração de miofibroblastos, observados pela expressão de  $\alpha$ -SMA ( $p < 0,05$  vs  $C_{NOR}$ ), favorecendo a fibrogênese renal. Ainda que elevada em relação aos animais C, os animais  $ADE_{HIP}$  apresentaram menor deposição intersticial desses marcadores ( $p < 0,05$  vs ADE), sugerindo que a hipóxia foi capaz de atenuar esse processo, reduzindo a progressão da fibrose renal nesses animais.



**Figura 21.** Fotomicrografias representativas da Deposição intersticial de Colágeno-1 e  $\alpha$ -SMA (miofibroblastos) dos grupos de estudo. Aumento de 400X.



**Figura 22.** Deposição intersticial de Colágeno 1 e  $\alpha$ -SMA dos grupos de estudo após 2 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média  $\pm$  EP.

### *Expressão renal dos componentes da imunidade inata*

Na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos renoprotetores observados pela exposição de animais ADE à hipóxia durante 2 semanas, foram avaliados os principais componentes das vias de sinalização do sistema NF- $\kappa$ B e do inflamassoma NLRP3, já demonstrados anteriormente estarem ativados neste modelo.

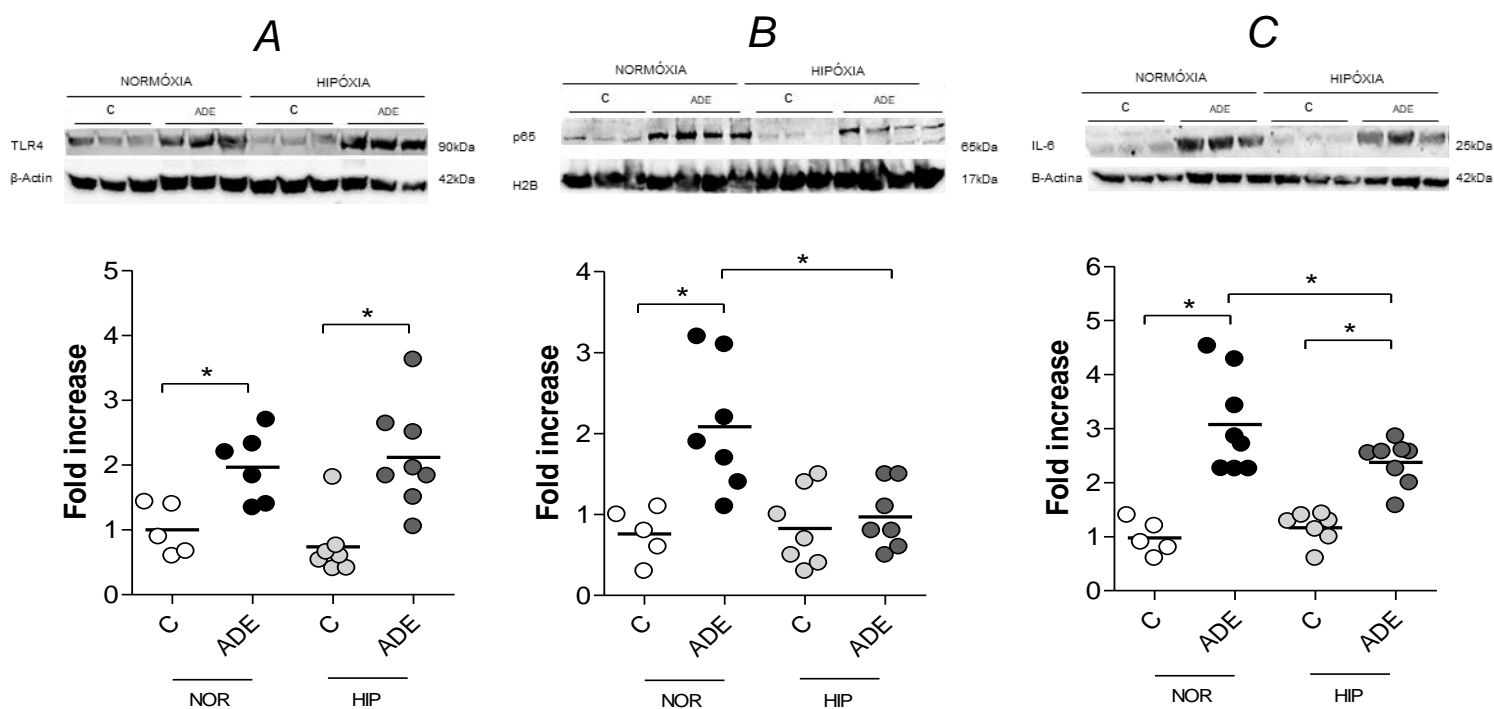
#### *Componentes do sinal 1 da Imunidade Inata*

Após 2 semanas, a expressão de TLR4 no tecido renal dos animais ADE estava aumentada quando comparada aos animais C ( $p < 0.05$ ) e a hipóxia não foi capaz de reduzir a expressão desse componente em relação aos animais ADE<sub>NOR</sub>.

A expressão da subunidade p65 fosforilada na fração nuclear estava exacerbada nos animais ADE ( $p < 0,05$  vs C), indicando ativação acentuada do NF- $\kappa$ B na presença da intensa nefrite tubulointersticial decorrente da sobrecarga de adenina. A hipóxia foi capaz de atenuar a ativação do sistema NF- $\kappa$ B nos animais ADE, sugerindo possível mecanismo na renoproteção da hipóxia.

Um dos produtos da ativação da via do NF- $\kappa$ B é a IL-6, portanto, era esperado o aumento da expressão renal de IL-6 nos animais ADE. A hipóxia foi capaz de atenuar a expressão de IL-6 em relação aos animais ADE<sub>NOR</sub> ( $p < 0,05$ ), decorrente da reduzida ativação do sistema NF- $\kappa$ B.

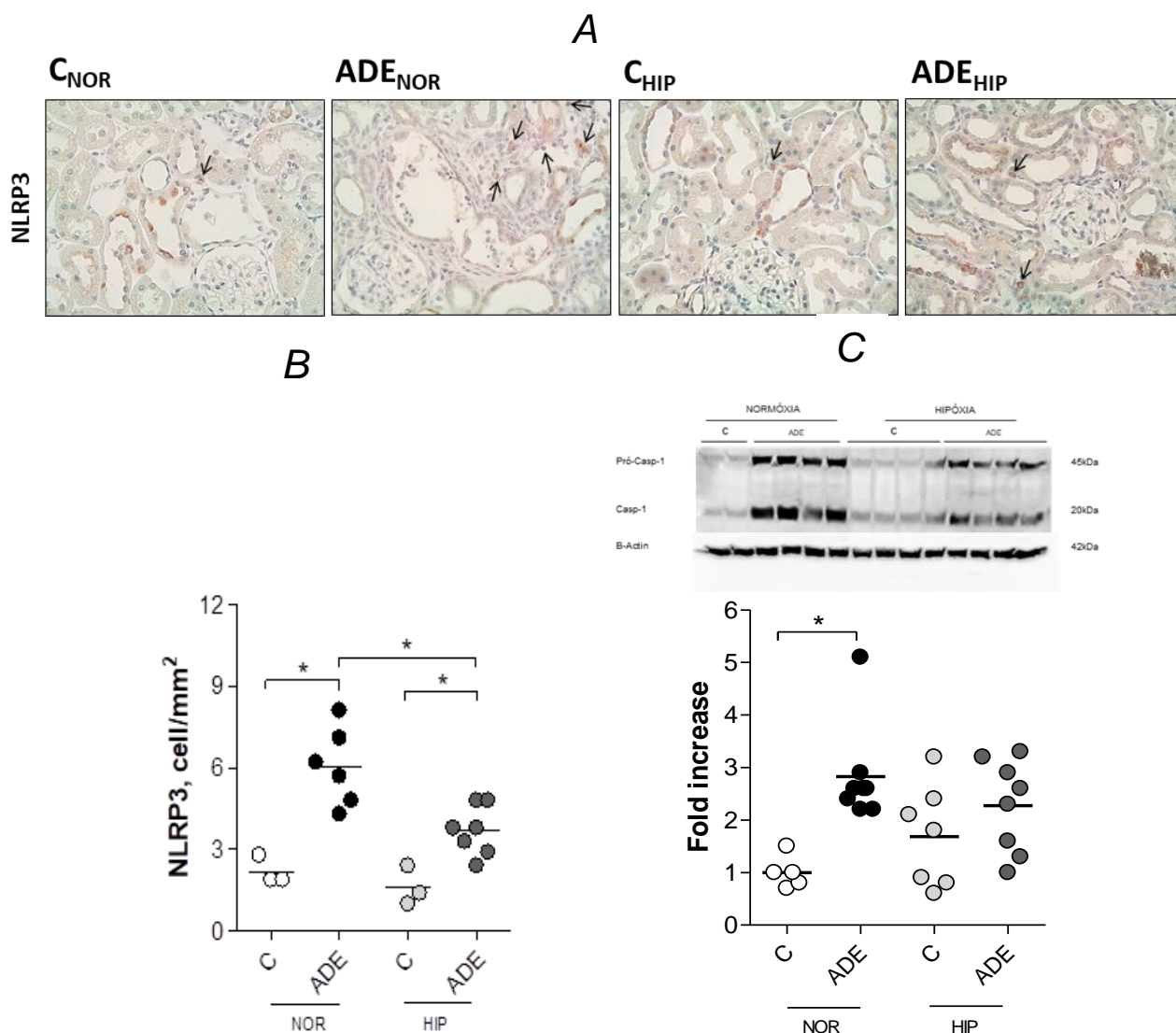




**Figura 23.** Expressão proteica dos componentes do sinal 1: A: TLR4; B: NF- $\kappa$ B e C: IL-6 obtidos do tecido renal dos grupos de estudo após 2 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP.

### *Componentes do sinal 2 da Imunidade Inata*

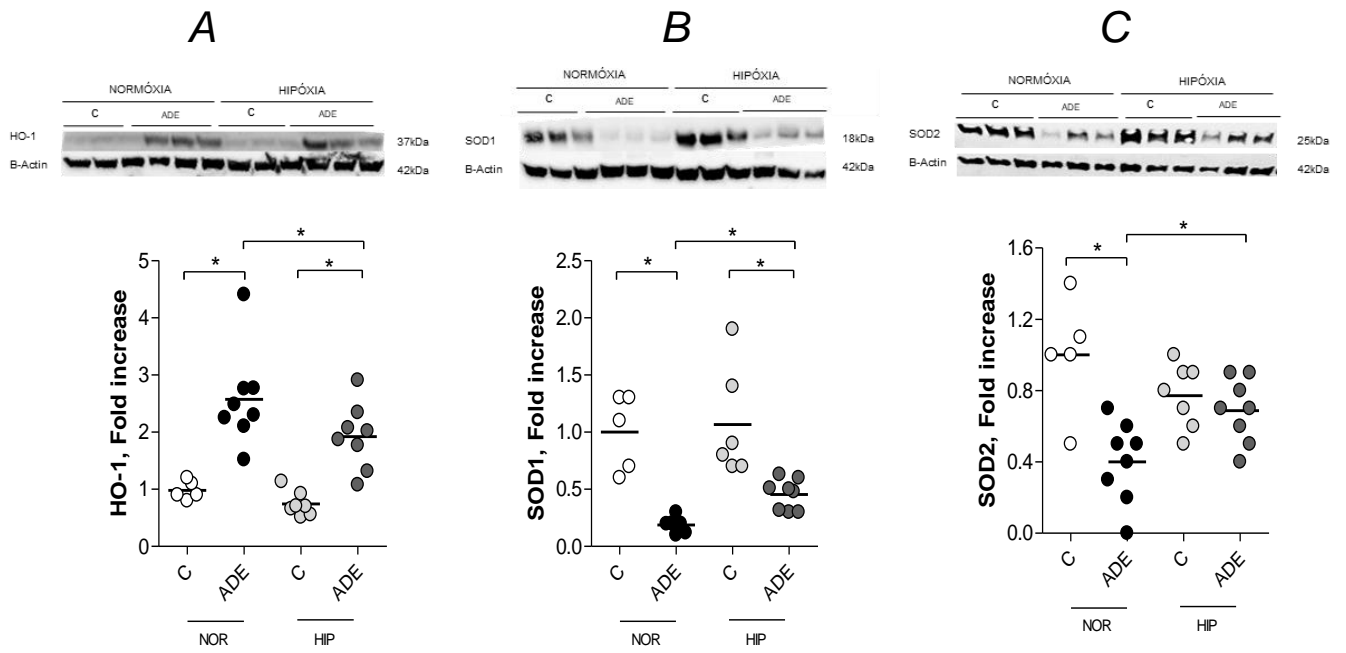
Após 2 semanas, os animais ADE<sub>NOR</sub> apresentaram maior infiltração de células positivas para NLRP3 no interstício renal e maior expressão de Caspase-1 ( $p < 0.05$  vs C<sub>NOR</sub>), sugerindo a formação do complexo do inflamassoma. A exposição à hipóxia atenuou o infiltrado intersticial de células NLRP3+ ( $p < 0,05$  vs ADE<sub>NOR</sub>) e reduziu a expressão de Caspase-1 ( $p < 0,05$  vs ADE<sub>NOR</sub>) mesmo que ainda elevadas em relação ao C<sub>HIP</sub> ( $p < 0,05$ ), sugerindo possível efeito protetor da hipóxia nessa via.



**Figura 24.** A: fotomicrografia representativa da infiltração de células intersticiais NLRP3+ (setas pretas), aumento de 400X. B: Infiltrado de células intersticiais NLRP3+ após 2 semanas de acompanhamento. Expressão proteica de Caspase-1 (C) dos grupos de estudo após 2 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP.

### *Expressão renal de marcadores anti-oxidantes*

A fim de verificar os efeitos protetores da hipóxia sobre o estresse oxidativo, foi avaliado o conteúdo renal de Heme oxigenase-1 (HO-1), Cobre Superóxido Dismutase (SOD1 ou CuSOD) e Manganês Superóxido Dismutase (SOD2 ou MnSOD) após 2 semanas de acompanhamento.



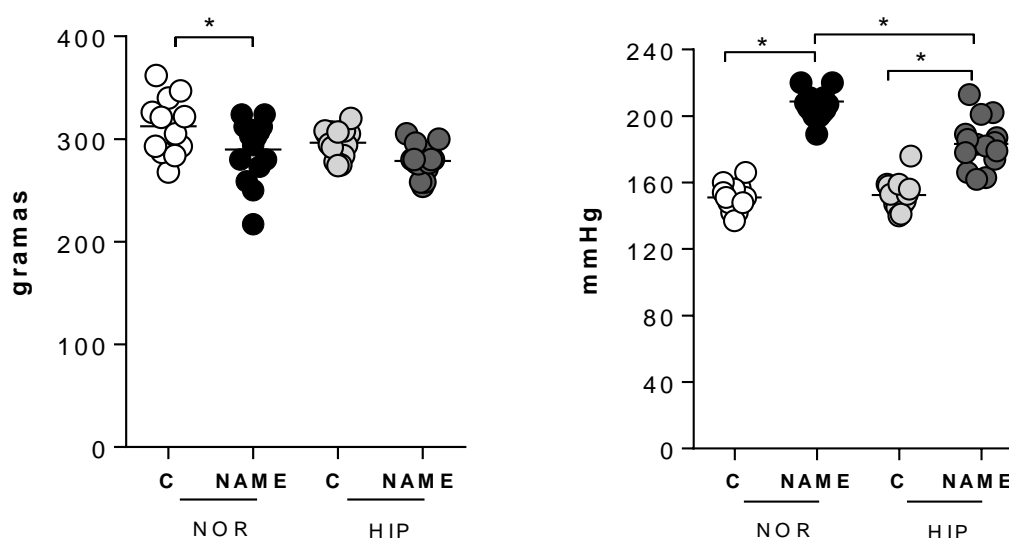
**Figura 25.** Expressão de HO-1 (A), SOD1 (B) e SOD2 (C) dos grupos de estudo após 2 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP.

## Protocolo 2 – Inibição do Óxido Nítrico

### *Mortalidade, Peso corpóreo (PE) e Pressão Caudal (PC)*

Ao final das 4 semanas de acompanhamento, não houve mortalidade entre os grupos, porém os animais NAME<sub>NOR</sub> apresentaram menor ganho de peso nos animais em relação ao seu respectivo Controle. Não houve diferenças relevantes em relação ao peso dos animais nos demais grupos de estudo.

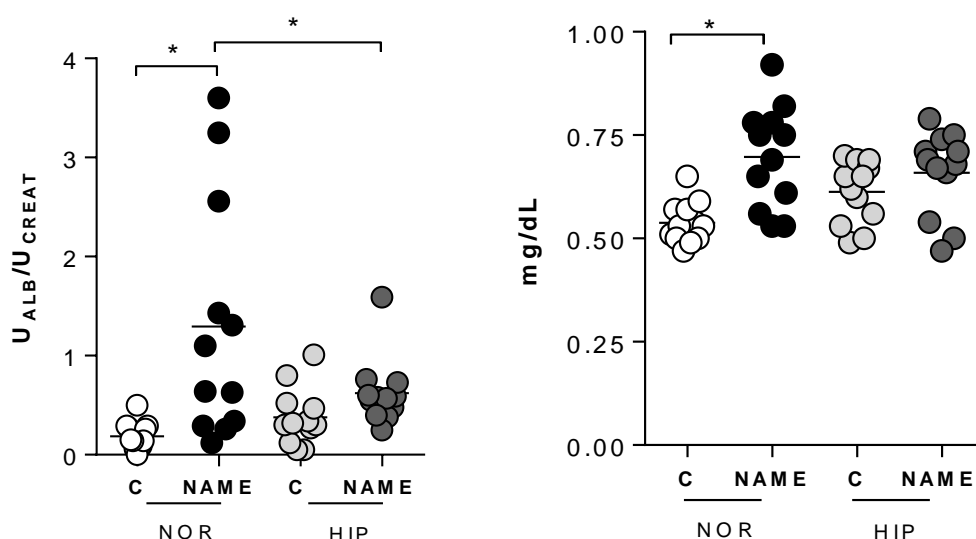
O bloqueio da síntese de NO promoveu hipertensão sistêmica acentuada ( $p < 0.05$  vs respectivo C), corroborando os dados dos trabalhos anteriores do nosso laboratório. A hipertensão foi atenuada nos animais que receberam L-NAME e foram submetidos à hipóxia ( $p < 0,05$  vs NAME<sub>NOR</sub>), sugerindo um efeito anti-hipertensivo dessa condição.



**Figura 26.** Peso corpóreo e da pressão caudal dos grupos de estudo após 4 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP.

*Relação da Excreção Urinária de Albumina e Creatinina ( $U_{ALB}/U_{CREAT}$ ) e dosagem sérica de Creatinina*

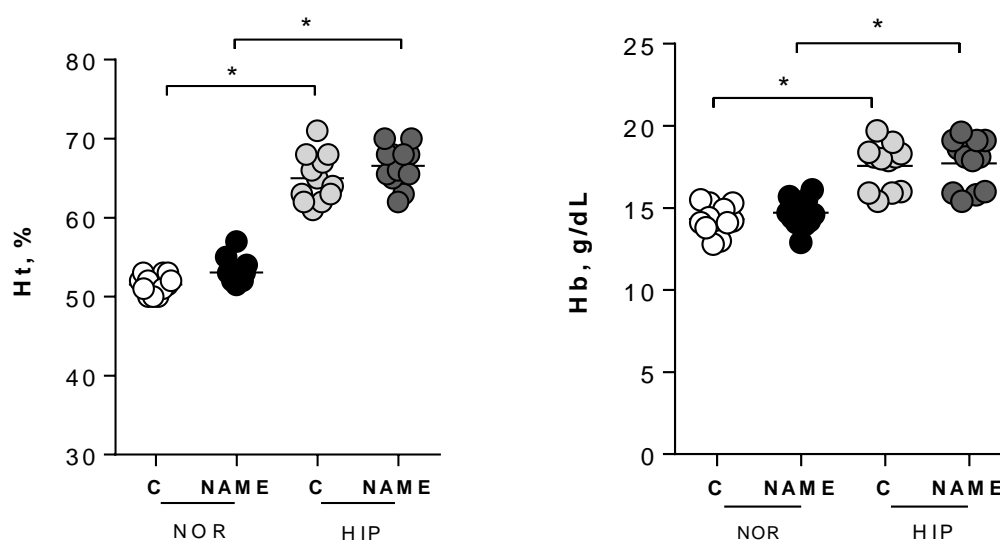
Houve aumento na relação  $U_{ALB}/U_{CREAT}$  dos animais  $NAME_{NOR}$  ( $p < 0,05$  vs  $C_{NOR}$ ). Esse parâmetro foi atenuado nos animais  $NAME$  que permaneceram em condições de hipóxia ( $p < 0,05$  vs  $NAME_{NOR}$ ). Após 4 semanas de acompanhamento, os animais  $NAME_{NOR}$  apresentaram retenção sérica de creatinina, sugerindo uma redução da função renal. A hipóxia não exerceu efeito significativo na redução da retenção de creatinina, no entanto, cabe lembrar que a creatinina não é um bom marcador de função renal em ratos, pois existe secreção tubular desse composto.



**Figura 27.** Relação  $U_{ALB}/U_{CREAT}$  e da creatinina sérica (ng/dL) dos grupos de estudo após 4 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP.

### Hematócrito (Ht) e Hemoglobina (Hb)

Como citado anteriormente, a baixa concentração de O<sub>2</sub> promove o aumento de glóbulos vermelhos e da concentração de Hemoglobina. Portanto, como esperado, os animais submetidos à hipóxia apresentaram elevação do Ht e da Hb após 4 semanas de acompanhamento ( $p < 0,05$  vs respectivo C;  $p < 0,05$  vs NAME<sub>NOR</sub>).

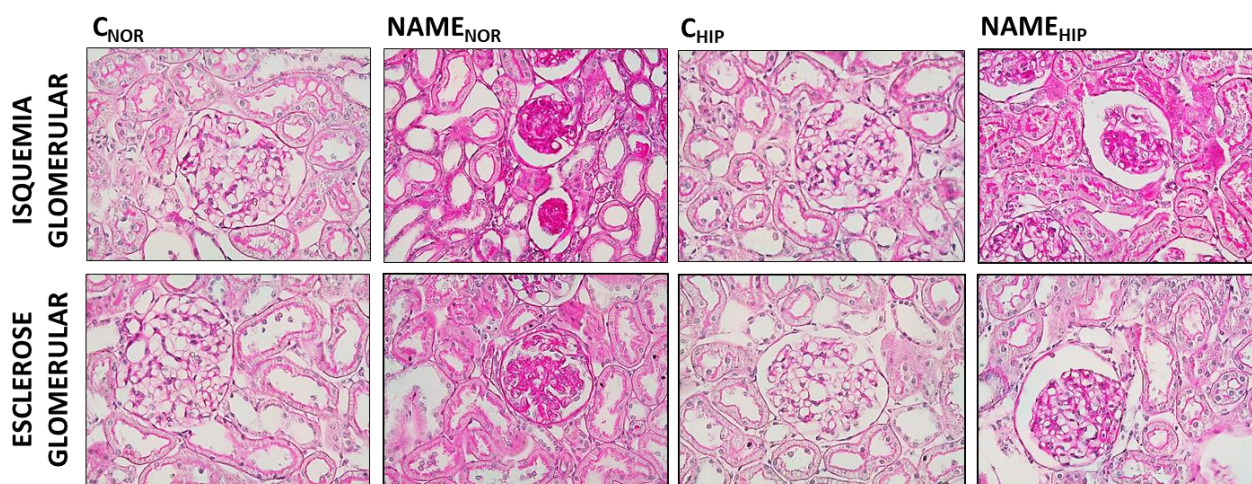


**Figura 28.** Hematócrito e hemoglobina dos grupos de estudo após 4 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP.

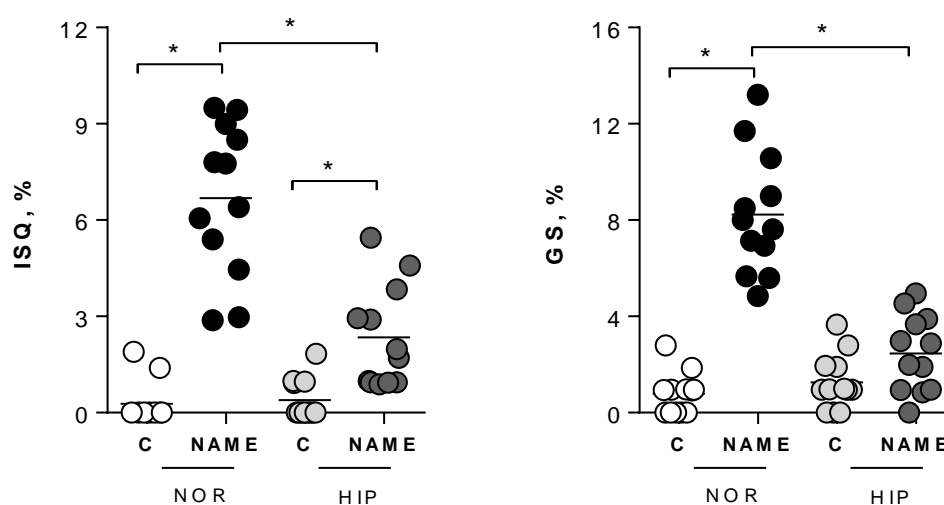
## Análise Histológica do Tecido Renal

### Isquemia Glomerular e Esclerose Glomerular

Como demonstrado anteriormente por nosso grupo, a lesão glomerular tipo isquêmica é a mais frequente nesse modelo ( $p < 0,05$  vs  $C_{NOR}$ ), provavelmente em decorrência do predomínio de agentes vasoconstritores. Apesar da % de lesões do tipo esclerose ser inferior à do tipo isquêmico, ainda foi significativamente maior que no grupo  $C_{NOR}$  ( $P < 0,05$ ).



**Figura 29.** Fotomicrografias representativas de glomérulo normal (A) do grupo C, glomérulo isquêmico (B) e glomérulo com esclerose (C) do grupo ADE. Coloração PAS, aumento (400X).



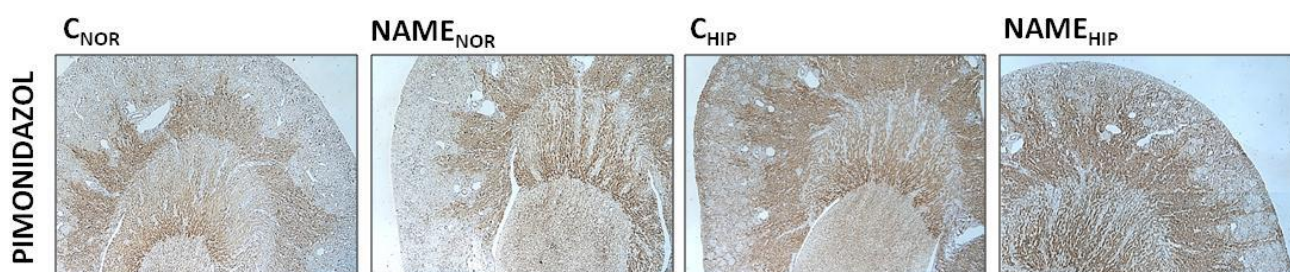
**Figura 30.** Porcentagem de glomérulos isquêmicos (ISQ) e escleróticos (GS) dos grupos de estudo após 4 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP.

### *Análise Hipóxia Tecidual*

Assim como no Protocolo 1, a análise qualitativa da hipóxia renal foi avaliada através da marcação imuno-histoquímica para o composto Pimonidazol injetado. Como sabemos, a hipóxia renal está presente na região medular devido ao intenso transporte ativo desses segmentos do néfron.

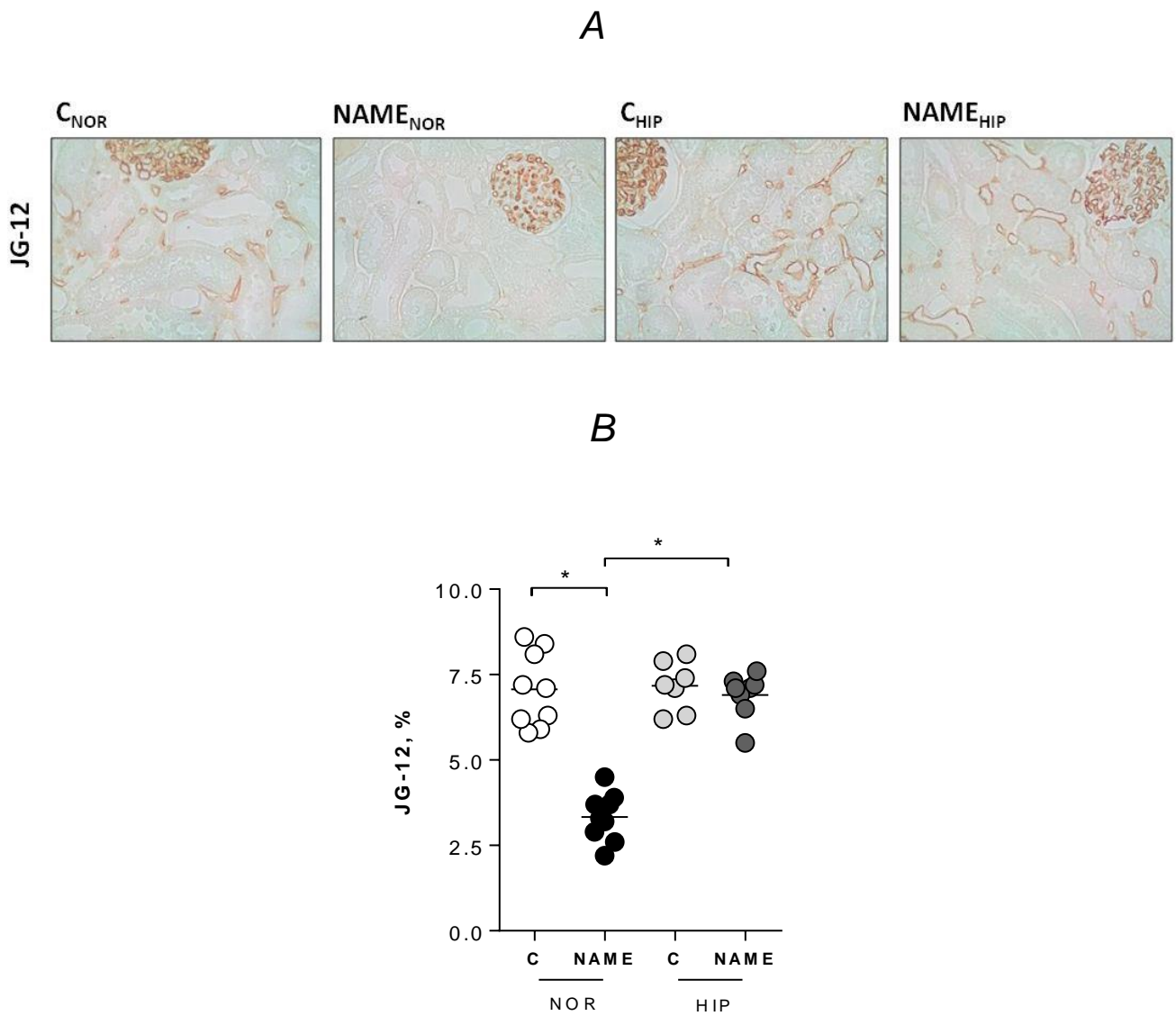
Nos animais em normóxia, apenas as regiões medulares apresentaram marcação positiva para os adutos de Pimonidazol, demonstrando que a hipóxia se restringiu a essa região. Entretanto, foram observadas marcações positivas nas regiões corticais, além das medulares, dos animais que permaneceram em hipóxia, sugerindo que a hipóxia tecidual foi generalizada (Figura 31).

Em relação à análise quantitativa (Figuras 32A e 32B), avaliada através da densidade de capilares peritubulares positivos para a marcação da Aminopeptidase (JG-12), observamos que uma redução importante na marcação positiva para JG-12 nos animais NAME<sub>NOR</sub>, sugerindo uma menor densidade capilar decorrente, principalmente, da inflamação e fibrose intersticial do tecido renal desses animais. A hipóxia preveniu a rarefação capilar nos animais NAME<sub>HIP</sub>, sugerindo possível efeito protetor da hipóxia nos capilares peritubulares do tecido renal.



**Figura 31.** Fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica de Pimonidazol para detecção da hipóxia renal dos grupos após 4 semanas de acompanhamento. Aumento de 100X.



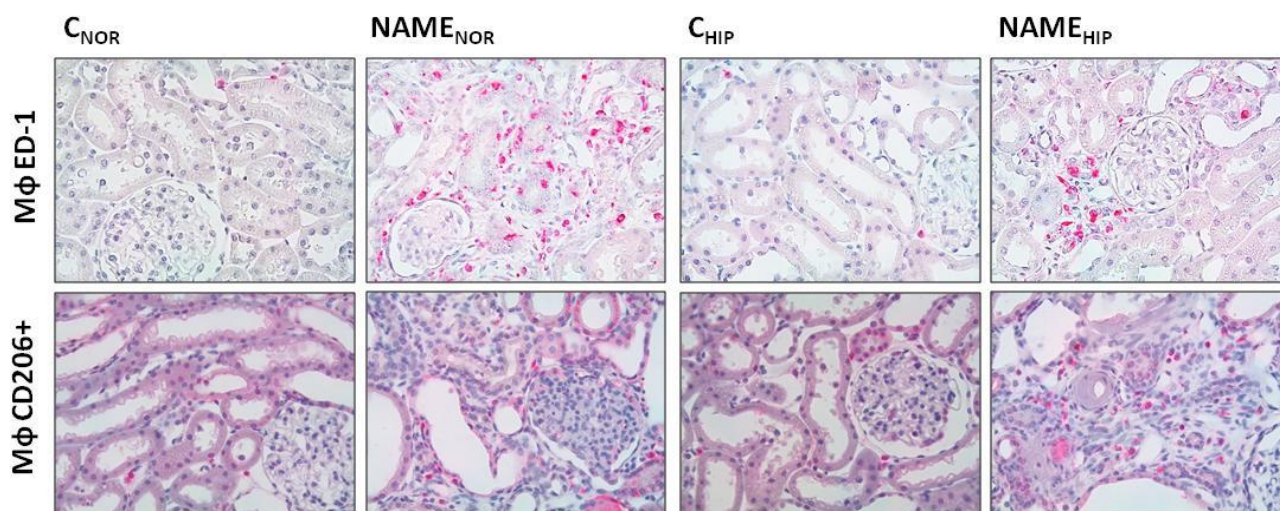


**Figura 32.** A: Fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica de JG12 dos grupos de estudo. Aumento de 400X; B: Porcentagem de JG-12 dos grupos de estudo após 4 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP.

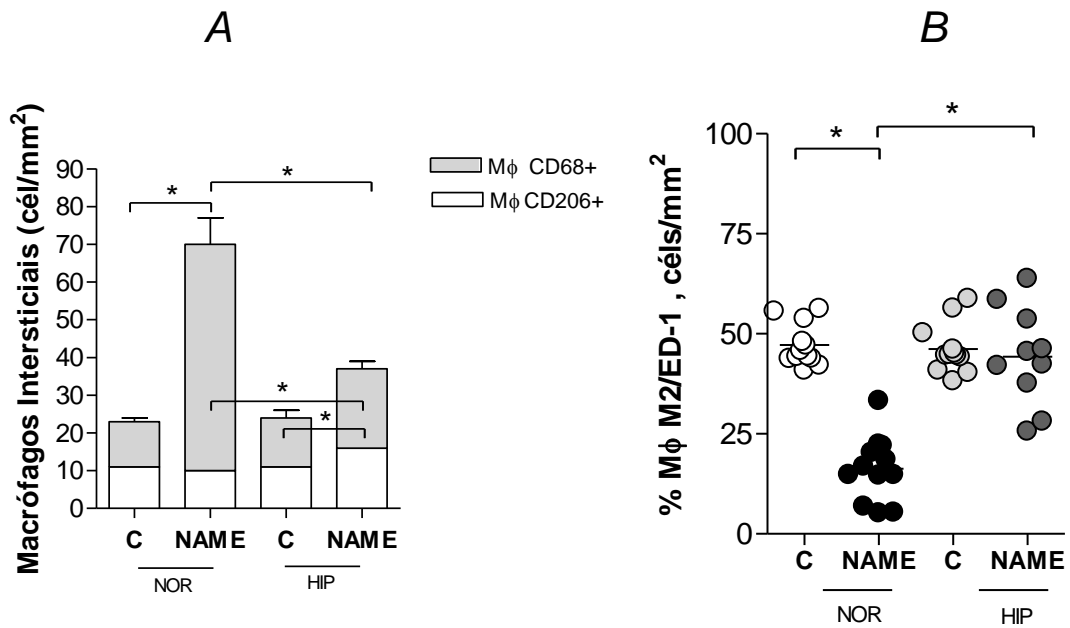
## Análise imuno-histoquímica do Tecido Renal

### Infiltrado Intersticial de Macrófagos

O bloqueio do NO provocou infiltração de macrófagos no interstício renal, indicando intenso processo inflamatório ( $p < 0,05$  vs  $C_{NOR}$ ). Os animais NAME submetidos à hipóxia apresentaram menor infiltrado intersticial de macrófagos, sugerindo um efeito protetor contra a inflamação. Quando avaliamos o perfil inflamatório dos macrófagos infiltrados, observamos que os animais  $NAME_{NOR}$  apresentaram menor abundância de macrófagos com perfil anti-inflamatório (M2). Já os animais NAME submetidos à hipóxia apresentaram aumento dessa quantidade quando observamos o número total dessas células, o que sugere que a hipóxia foi capaz de influenciar o perfil inflamatório dos macrófagos para M2, o qual possui um papel de reparo e benéfico.



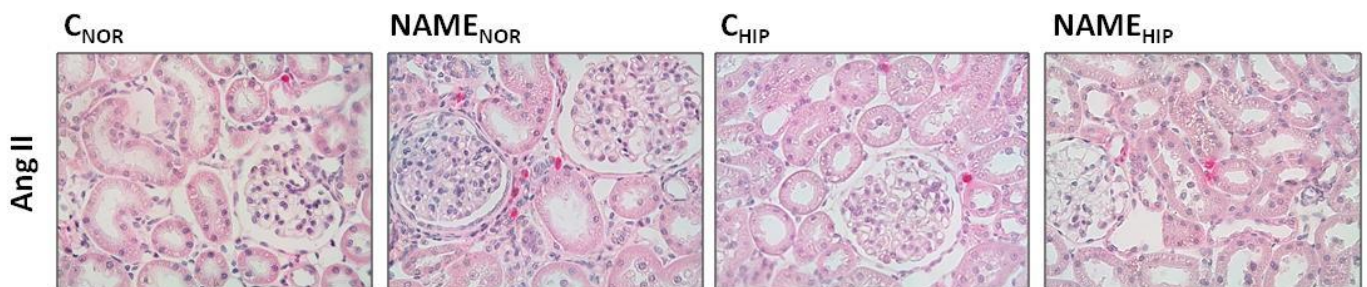
**Figura 33.** Fotomicrografias representativas da infiltração de macrófagos totais (ED-1) e CD206+ (M2) dos grupos de estudo. Aumento de 400X.



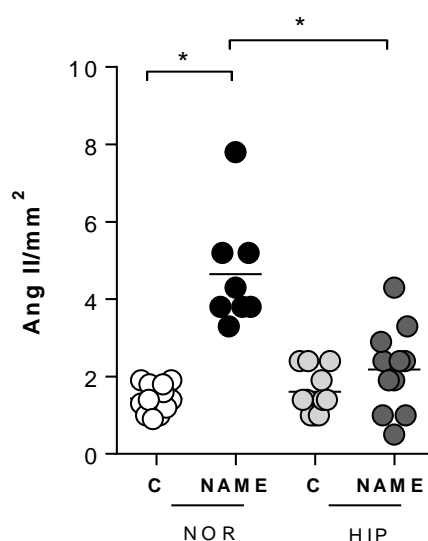
**Figura 34.** A: Infiltrado de macrófagos (Mφ) dos grupos de estudo após 4 semanas de acompanhamento. B: Relação Mφ CD206+/Mφ CD68. Resultados apresentados como Média±EP.

#### *Infiltrado Intersticial de Células Angiotensina II+*

A inibição crônica do NO desencadeou um aumento no número de células Ang II+ no interstício renal ( $p < 0,05$  vs  $C_{NOR}$ ). Os animais  $NAME_{HIP}$  apresentaram menor infiltrado de células Ang II+ no interstício renal, sugerindo que a hipóxia promoveu efeito renoprotetor e que pode estar associado aos efeitos da Angiotensina II.



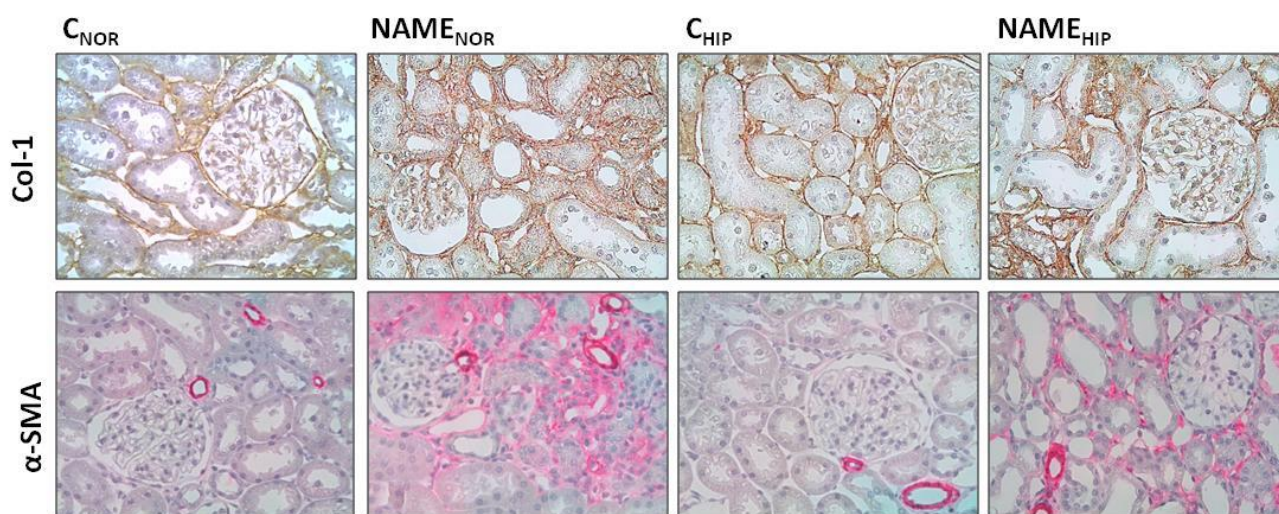
**Figura 35.** Fotomicrografias representativas da infiltração de células Angiotensina II+ dos grupos de estudo. Aumento de 400X.



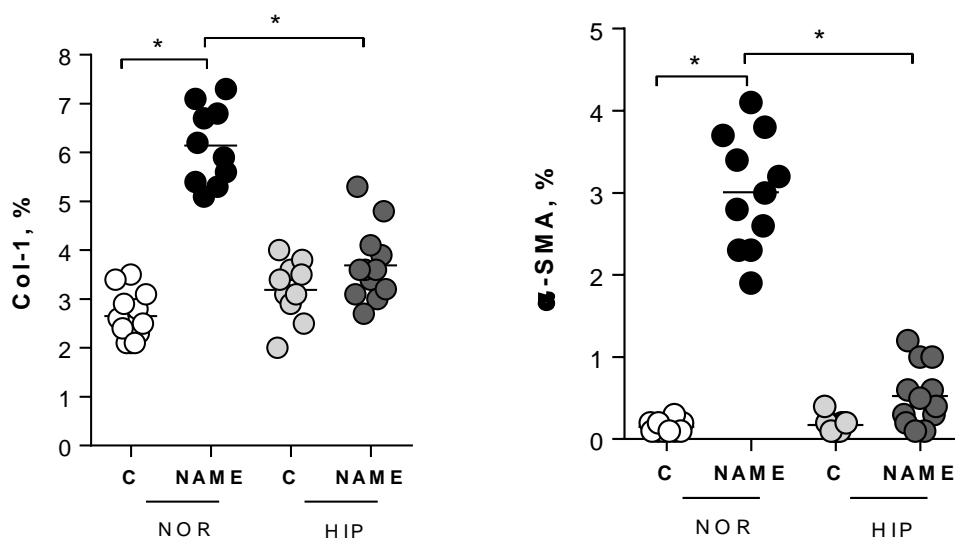
**Figura 36.** Infiltrado de células Ang II+ dos grupos de estudo após 4 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP.

### *Deposição intersticial de Colágeno-1 e $\alpha$ -SMA*

Após 30 dias, intensos depósitos intersticiais de Col-1 e  $\alpha$ -SMA nos animais NAME<sub>NOR</sub> ( $p < 0,05$  vs C<sub>NOR</sub>), participando do desenvolvimento da fibrogênese renal. A hipóxia foi capaz de impedir esse processo no interstício renal ( $p < 0,05$  vs NAME<sub>NOR</sub>), reduzindo a progressão da fibrose renal nos animais NAME<sub>HIP</sub>.



**Figura 37.** Fotomicrografias representativas da deposição intersticial de Col-1 e  $\alpha$ -SMA dos grupos de estudo. Aumento de 400X.



**Figura 38.** Deposição intersticial de Colágeno 1e  $\alpha$ -SMA dos grupos de estudo após 4 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP.

### *Expressão renal dos componentes da imunidade inata*

Para entender os mecanismos envolvidos na renoproteção proporcionada pela exposição à hipóxia durante 4 semanas de animais submetidos ao modelo de bloqueio crônico do NO, foram avaliados os componentes das primordiais vias de sinalização da imunidade inata.

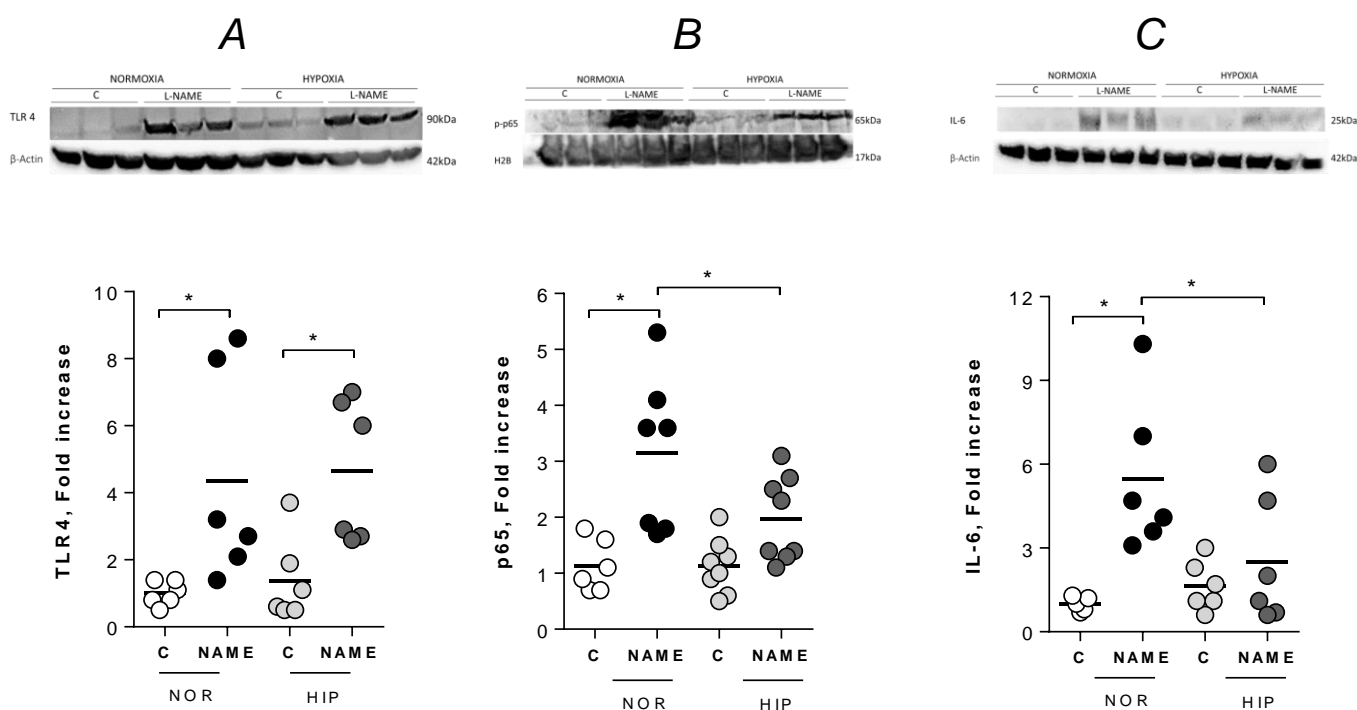
#### *Componentes do sinal 1 da Imunidade Inata*

Após 4 semanas, a expressão proteica de TLR4 no tecido renal dos animais NAME mostrou-se aumentada ( $p < 0,05$  vs respectivo C) e a hipóxia não foi capaz de atenuar a expressão dessa molécula ( $p > 0,05$  vs NAME<sub>NOR</sub>).

A expressão da subunidade p65 fosforilada na porção nuclear estava substancialmente elevada nos animais NAME<sub>NOR</sub> ( $p < 0,05$  vs C<sub>NOR</sub>), demonstrando uma ativação acentuada do NF- $\kappa$ B quando há inibição do NO. Esse perfil foi alterado com a exposição dos animais à hipóxia, ( $p < 0,05$  vs NAME<sub>NOR</sub>), prevenindo a

ativação do sistema NF- $\kappa$ B. A IL-6 corresponde a um dos produtos finais da ativação do sistema NF- $\kappa$ B, assim, o aumento da expressão renal de IL-6 era esperado nos animais NAME<sub>NOR</sub>.

Como a hipóxia atenuou a ativação do sistema NF- $\kappa$ B, os animais NAME<sub>HIP</sub> apresentaram menor expressão de IL-6 no tecido renal ( $p < 0,05$  vs NAME<sub>NOR</sub>), sugerindo que a hipóxia exerceu um efeito renoprotetor através da menor ativação do sistema NF- $\kappa$ B.

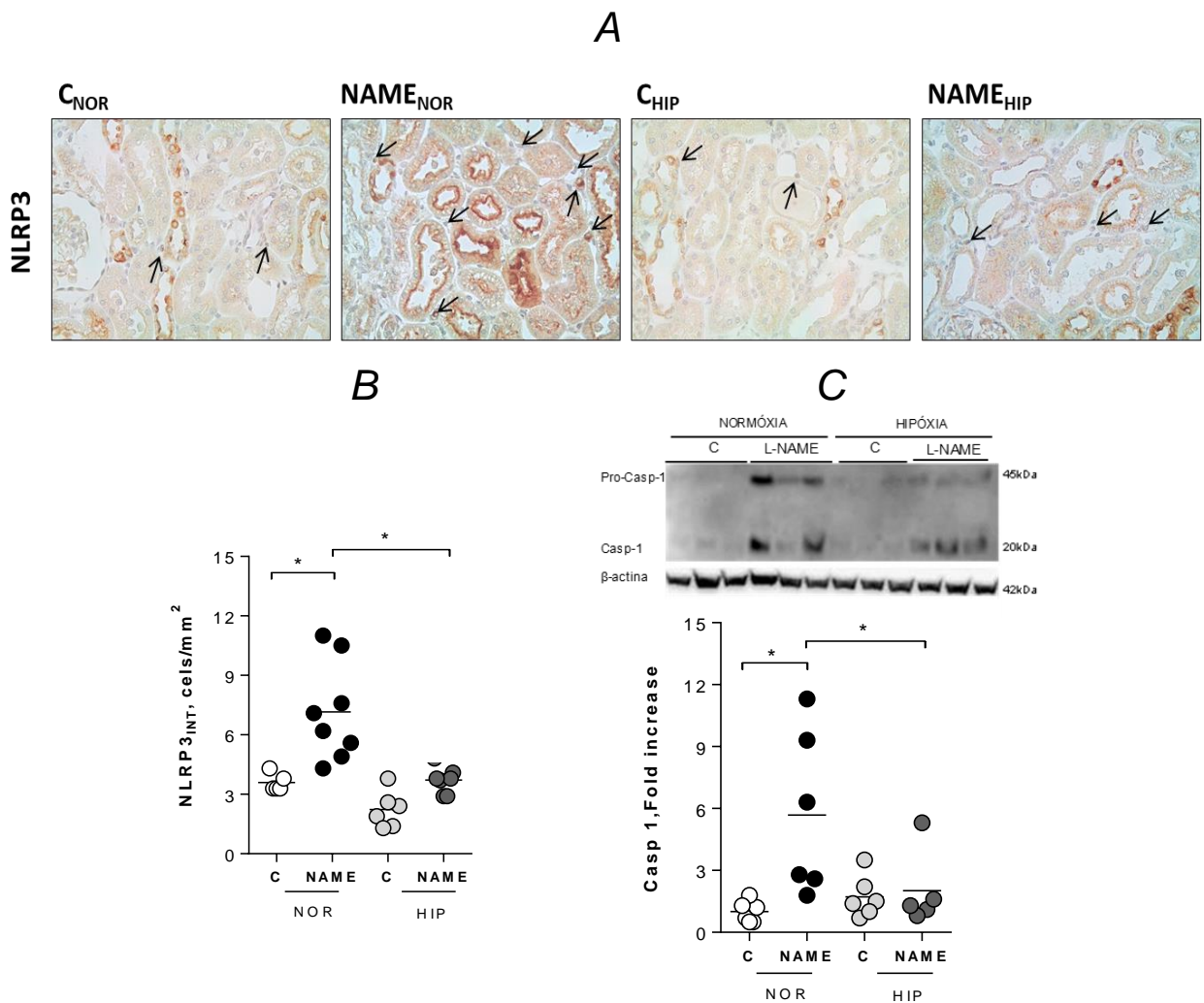


**Figura 39.** Expressão proteica dos componentes do sinal 1: TLR4 (A), NF- $\kappa$ B (B) e IL-6 (C) obtidos do tecido renal dos grupos de estudo após 4 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP.

### *Componentes do sinal 2 da Imunidade Inata*

Após 4 semanas, os animais NAME<sub>NOR</sub> apresentaram maior produção renal de ácido úrico ( $p < 0,05$  vs C<sub>NOR</sub>) e estudos demonstram que o ácido úrico atua como um sinalizador de injúria celular, ativando o inflamassoma NLRP3. Como observado, os

animais NAME<sub>NOR</sub> apresentaram maior número de células intersticiais positivas para o inflamassoma NLRP3 e aumento da expressão renal de caspase-1 ativa (20kDa) em relação aos animais C<sub>NOR</sub>, sugerindo a possível ativação do sinal 2 nesses animais. A exposição à hipóxia atenuou essa cascata de ativação, reduzindo o número de células intersticiais NLRP3 + e atenuando a expressão de Caspase-1 ( $p < 0,05$  vs NAME<sub>NOR</sub>), sugerindo um efeito da hipóxia sobre a via do sinal 2 da imunidade inata.

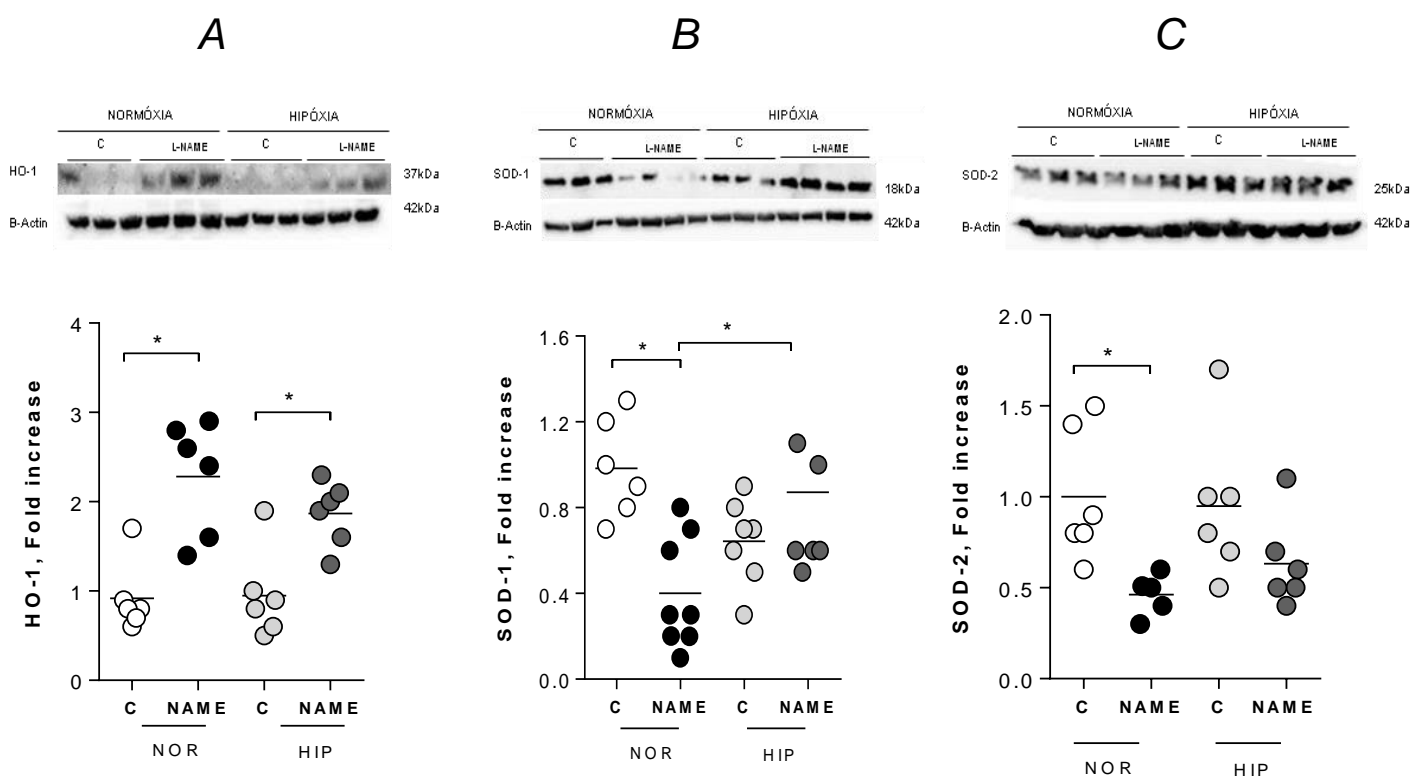


**Figura 42.** A: fotomicrografia representativa da infiltração de células intersticiais NLRP3+ (setas pretas), aumento de 400X. B: Infiltrado de células intersticiais NLRP3+ após 4 semanas de acompanhamento. Expressão proteica de Caspase-1 (C) dos grupos de estudo após 4 semanas de acompanhamento. Resultados apresentados como Média±EP.

### Expressão proteica de marcadores anti-oxidantes

Após 4 semanas, os animais NAME<sub>NOR</sub> apresentaram maior expressão de HO-1 ( $p < 0,05$  vs C<sub>NOR</sub>), sugerindo a ativação de um mecanismo renoprotetor contra o estresse oxidativo e apoptose por morte celular. Apesar de ainda elevado ( $p < 0,05$  vs C<sub>HIP</sub>), observamos uma expressão numericamente menor nos animais NAME<sub>HIP</sub>, o que sugere um possível efeito protetor da hipóxia nesses animais.

Tanto a SOD-1 quanto a SOD-2 apresentaram redução nos animais NAME<sub>NOR</sub>, sugerindo que os efeitos do estresse oxidativo alteram estado redox citoplasmático e mitocondrial. Os animais NAME<sub>HIP</sub> apresentaram maior expressão renal de SOD-1 ( $p < 0,05$  vs NAME<sub>NOR</sub>) e um singelo aumento da expressão de SOD-2.



**Figura 43.** Expressão de HO-1 (A), SOD-1 (B) e SOD-2 (C) dos grupos após 4 semanas. Resultados apresentados como Média $\pm$ EP.



## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo buscamos verificar o possível efeito renoprotetor da hipóxia sobre as lesões renais, retardando a progressão da DRC desencadeada por uma nefrite túbulo-intersticial no Protocolo 1 e pela hipertensão no Protocolo 2.

No Protocolo 1, os animais que receberam sobrecarga de ADE na dieta por duas semanas apresentaram alterações de parâmetros bioquímicos e morfológicos, já observados em estudos anteriores deste e de outros laboratórios (18, 21, 110-112), evidenciando um processo multifatorial. Observamos hipertensão e aumento na relação da  $U_{ALB}/U_{CREAT}$  e da creatinina sérica, o que sugere uma pequena redução da função renal nesses animais. Apesar de menos evidentes quando comparados a estudos de longo prazo (21, 112-115), algumas lesões glomerulares foram notáveis à microscopia ótica como esclerose e isquemia glomerular, que podem ter contribuído para o aumento da pressão arterial nesses animais. Além disso, observamos hipertrofia renal e aumento do KIM-1 urinário, um importante biomarcador de injúria renal aguda (116).

A inflamação aguda e as alterações intersticiais foram substanciais após duas semanas. A presença de macrófagos com fenótipo pró-inflamatório e células positivas para Ang II sugere participação relevante nesse processo, já que pudemos observar células gigantes multinucleadas que favorecem à formação de granulomas de corpo estranho, como observado em estudos anteriores (21, 111, 117). A intensa fibrose intersticial associou-se a uma rarefação vascular, indicada pela menor porcentagem de marcação positiva para JG-12 no tecido renal dos animais ADE<sub>NOR</sub>.

No protocolo 2, como descrito anteriormente (118-122), a inibição do NO promoveu hipertensão acentuada e intensa albuminúria, juntamente com graves alterações renais, funcionais e morfológicas, como isquemia e esclerose glomerular, além de rarefação vascular, evidenciada pela menor expressão de JG-12. Além dessas alterações, o tecido renal dos animais L-NAME<sub>NOR</sub> apresentou intensa infiltração de macrófagos pró-inflamatórios e células Ang II positivas. Juntamente com a presença de miofibroblastos, indicada pela maior expressão de  $\alpha$ -SMA, e uma acentuada deposição intersticial de Colágeno -1. Essas alterações demonstram a presença de um processo de inflamação e fibrose renal, caracterizando um quadro de DRC.

Em ambos os protocolos, a progressão da inflamação e fibrose renal associou-se à ativação de duas importantes vias da imunidade inata, o sistema NF- $\kappa$ B (123, 124) e o inflamassoma NLRP3 (125). Esses resultados corroboram estudos anteriores, que mostraram o envolvimento dessas vias na patogênese da nefropatia associada ao excesso de adenina (18, 21, 25, 126) e da hipertensão provocada pelo L-NAME (25, 126-128), assim como na de outros modelos de DRC (18, 20-22, 25, 129).

Inúmeros estudos sugerem que a hipóxia crônica do tecido renal, provocada por condições locais tais como rarefação capilar e expansão intersticial, pode ser um fator de iniciação e perpetuação da DRC (59, 61, 62, 130, 131). Em desacordo com essa hipótese, evidências recentes sugerem que a exposição a baixas taxas de oxigênio na atmosfera pode exercer um efeito protetor sobre o sistema cardiovascular (132, 133) e renal (23,84). Winkelmayr e col. (78, 80) observaram que a taxa de mortalidade de pacientes em programa de hemodiálise que vivem em localidades

elevadas foi inferior à observada ao nível do mar. Da mesma forma, Shapiro e cols. (79) demonstraram mortalidade reduzida em populações vivendo em altitudes elevadas – aí incluídos pacientes em diálise crônica – em comparação com moradores de localidades situadas ao nível do mar.

Corroborando dados anteriores obtidos em nosso laboratório (84), a exposição crônica a hipóxia promoveu alterações hematológicas adaptativas típicas como policitemia e aumento da hemoglobina, além de acentuar a hipóxia renal em ratos Controle, indicado pelo aumento da marcação para adutos de Pimonidazol na córtex renal. Neste mesmo estudo (84), questionamos mais diretamente a hipótese de que a hipóxia tecidual exerce um efeito deletério sobre os rins: demonstramos que, quando expostos cronicamente a baixas taxas atmosféricas de oxigênio, ratos Nx, um modelo que mimetiza estágios avançados de DRC, apresentaram melhora da hipertensão, da função renal e do dano estrutural ao rim remanescente.

No presente estudo, a exposição à hipóxia de controles normais de ambos os protocolos por 2 ou 4 semanas não promoveu inflamação renal nem ativação do sistema NF- $\kappa$ B e do inflamassoma NLRP3, uma das principais vias de ativação da imunidade inata. Essas observações reafirmam o conceito de que a hipóxia tecidual é incapaz de iniciar por si só um processo de inflamação renal. Além disso, a exposição de animais ADE e NAME a baixas taxas de O<sub>2</sub> não só não agravou a DRC como atenuou o desenvolvimento de hipertensão e de alterações renais, sejam funcionais, morfológicas (glomerulares e tubulares) ou inflamatórias, mais uma vez em consonância com nossas observações anteriores (84). Os mecanismos responsáveis por esses efeitos ainda são incertos.

Apesar dos animais ADE<sub>HIP</sub> permanecerem hipertensos, nos animais NAME<sub>HIP</sub>, a hipóxia atenuou a pressão arterial, assim como observado por Rempel e col. em ratos Nx (84). Os efeitos da hipóxia sobre o sistema cardiovascular ainda não estão claros(134). Inúmeras alterações fisiológicas ocorrem durante a exposição crônica à hipóxia. Apesar de diversos estudos demonstrarem o aumento do risco de doenças cardiovasculares (DCV) com a exposição à hipóxia, resultados recentes demonstram os benefícios provocados pela altitude, ou seja, pela baixa concentração de O<sub>2</sub> em indivíduos com DCV (132, 134, 135). Alguns estudos demonstram que a hipóxia promove aumento da atividade do sistema nervoso simpático através de *down regulation* dos receptores tipo beta (136-138), reduzindo a pressão arterial. A melhora na densidade vascular dos animais submetidos à hipóxia pode ser um possível efeito benéfico da hipóxia na redução da pressão arterial observada, já que a expressão de moléculas que estimulam a angiogênese está condicionada ao balanço de O<sub>2</sub>, como VEGF e angiopoietinas (65, 139).

Em relação às alterações renais, em ambos os protocolos observamos a melhora em diversos parâmetros funcionais e histológicos. O desenvolvimento de alterações glomerulares, observada nos animais ADE<sub>NOR</sub> e NAME<sub>NOR</sub>, foi prevenido pela hipóxia. Além desses parâmetros, os animais ADE<sub>HIP</sub> apresentaram menor hipertrofia renal e menor dosagem urinária de KIM-1, o que sugere efeitos renoprotetores da hipóxia.

Como mencionado anteriormente, os mecanismos responsáveis pela renoproteção exercida pela hipóxia ainda permanecem incertos. No entanto, diversos estudos experimentais apontam que a ativação local da imunidade inata é um provável mecanismo que promove inflamação e lesão tecidual na DRC (6, 9, 18, 20-22, 25,

129). Corroborando achados recentes de nosso laboratório(84), a baixa  $pO_2$  atenuou a inflamação renal, através do menor infiltrado intersticial de células Ang II+ e macrófagos. Além disso, a hipóxia foi capaz de polarizar os macrófagos para o perfil M2 (anti-inflamatório) (25, 140-142), contribuindo para o reparo tecidual. Confirmando esse conceito, Braga et al. (143) demonstraram que camundongos com obstrução ureteral unilateral (UUO) apresentaram inicialmente um infiltrado de macrófagos M1, enquanto o acúmulo de macrófagos M2 foi observado em fases mais avançadas do processo inflamatório (88, 144).

Contrariando achados anteriores de que a hipóxia inicia e/ou agrava a lesão renal e que pode ser um fator de agressão celular que, por si só, pode promover a ativação de várias vias da imunidade inata (62, 145, 146), através da análise de componentes consolidados das principais vias de ativação, como o sistema NF- $\kappa$ B e a via do inflamassoma NLRP3, pudemos avaliar os efeitos da hipóxia sobre a ativação dessas vias em dois modelos experimentais de DRC, os quais já foram anteriormente demonstrados a participação dessas vias na patogênese da doença(18, 21, 25, 126).

Embora a hipóxia não tenha reduzido a abundância do TLR4 no tecido renal, a ativação do sistema NF- $\kappa$ B foi menor do que nos ratos em normóxia, conforme atestado pela menor translocação nuclear da subunidade p65 e pela menor expressão renal da IL-6, uma das moléculas-alvo desse sistema. Esse achado também contraria a hipótese de que a hipóxia ativa o sistema NF- $\kappa$ B, conforme proposto por alguns grupos (147-149), mas está completamente de acordo com nossas observações anteriores de que a ativação desse sistema é atenuada pela hipóxia em ratos com ablação renal de 5/6 (84). Diversos trabalhos demonstram a interação entre a hipóxia e a ativação do sistema NF- $\kappa$ B. Estudos sugerem que a hipóxia tecidual promova a

ativação do sistema através de vias não canônicas (147-149) e também pelo efeito do HIF (150), no entanto, nossos resultados corroboram resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório (84), mas os mecanismos pelo qual isso ocorre ainda permanecem não esclarecidos.

Em ambos os modelos, a hipóxia também atenuou a ativação do inflamassoma NLRP3 e a expressão da Caspase-1 ativa foi menor nos ratos expostos à hipóxia. Sabe-se que a ativação dessa via pode ocorrer através de cristais, como 2,8-DHA e ácido úrico (17, 18, 22, 25, 48, 50, 52, 56). Nos animais ADE, tanto o grupo normóxia quanto hipóxia, apresentaram números semelhantes de cristais no parênquima renal, sugerindo que apesar da melhora geral dos parâmetros analisados, o número de cristais não foi alterado.

A razão para a menor ativação das vias do NF- $\kappa$ B e do inflamassoma NLRP3 ainda não está clara, mas é provável que se deva ao menos em parte à atenuação do estresse oxidativo, um dos principais fatores estimuladores desses sistemas (22, 25, 151-153). Estudos anteriores sugeriram que a exposição prolongada, ainda que intermitente, a uma baixa  $pO_2$  diminui a capacidade renal de produzir EROs (84, 154-156) diante de estímulos como por exemplo a exposição a lipopolissacarídeos bacterianos.

A participação do estresse oxidativo foi avaliada através da expressão de proteínas citosólicas HO-1 e SOD-1; e mitocondrial SOD-2. Em nenhum dos protocolos a hipóxia alterou os níveis de HO-1, SOD-1 e SOD-2 dos controles normais em comparação os animais em normóxia. Em ambos os protocolos, os animais ADE<sub>NOR</sub> e NAME<sub>NOR</sub> apresentaram aumento da HO-1, uma resposta já bem estabelecida na literatura sobre a adaptação ao estresse oxidativo e citotoxicidade

(157-159) e redução das SODs, sugerindo uma disfunção no sistema de remoção de EROs, que por sua vez também influenciam a ativação da imunidade inata(22, 25, 151-153, 160).

Em contraste, os grupos ADE<sub>HIP</sub> e NAME<sub>HIP</sub> apresentaram melhoras significativas no perfil dessas enzimas, corroborando achados anteriores de que a hipóxia pode prevenir o desenvolvimento do estresse oxidativo renal. Dessa forma, o efeito benéfico da exposição a uma baixa pO<sub>2</sub>, observado no presente estudo, pode ter decorrido, ao menos em parte, de uma atenuação do estresse oxidativo associado a esses dois modelos de lesão renal. A renoproteção propiciada por esse perfil oxidativo mais favorável pode ter decorrido de uma redução do efeito direto das ERO sobre a estrutura renal e de uma menor ativação, promovida por esses compostos, das duas vias da imunidade inata examinadas no presente estudo.

Um importante mecanismo adicional para ajudar a explicar o efeito renoprotetor da hipóxia observada no presente estudo é a menor ativação local do sistema renina-angiotensina, conforme indicado pela redução do número de células Ang II positivas (161, 162). É fato bem conhecido que o estresse oxidativo é um poderoso ativador desse sistema, o qual por sua vez exerce uma série de efeitos pró-inflamatórios, incluindo a ativação das vias do NF- $\kappa$ B e do NLRP3 (163-165).

Como já mencionado, estudos anteriores sugerem que a hipóxia atue como um fator de progressão da DRC e da ativação da imunidade inata (11, 59, 62, 144, 145, 166-168). Além disso, há relatos de que indivíduos sofrendo da síndrome da alta-altitude apresentaram aumento de citocinas inflamatórias na circulação, principalmente IL-6 (146, 169, 170). No entanto, a exposição crônica à hipóxia

promoveu menor ativação de vias inflamatórias. A expressão do HIF-1 $\alpha$  está relacionada à adaptação inicial à hipóxia e é rapidamente induzida (86, 171, 172). As enzimas PHDs regulam a estabilidade do HIF-1 $\alpha$ , promovendo sua hidroxilação em situações de normóxia. Em condições de hipóxia, há a inibição dessas enzimas, o que permite a translocação nuclear do HIF-1 $\alpha$  formando um dímero com o HIF-1 $\beta$  e regular a transcrição de elementos responsivos à hipóxia (HRE, *Hypoxia-responsive Elements*) (173). A expressão das PHDs varia de acordo com a oxigenação do tecido e sua expressão gênica deve-se a indução via HIF-1 $\alpha$  em hipóxia (88, 92, 174). Schley e col. (175) observaram que a inibição de PHDs é capaz de atenuar a disfunção renal e a inflamação, sem alterar a expressão de HIF-1 $\alpha$ , no modelo de sobrecarga de adenina.

A via de ativação do HIF é responsável pela expressão de diversos HREs, incluindo respostas celulares para eritropoiese, angiogênese, metabolismo anaeróbico, metabolismo do ferro e do NO (71, 88, 139, 172, 176). Diversos genes alvos do HIF já foram identificados, entre eles a HO-1, iNOS, a Eritropoietina (EPO), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), entre outros(177). Em condições de hipóxia, o acúmulo do HIF promove a expressão da EPO, principalmente pelas células renais semelhantes a fibroblastos (178). Outra função da EPO é proteger contra injúria renal, reduzindo a apoptose e a inflamação e aumentando a proliferação tubular (179). A EPO renal é expressa principalmente pelos pericitos (células semelhantes a fibroblastos) e em um quadro de DRC, essas células se transdiferenciam em miofibroblastos cuja capacidade de produção de EPO é reduzida (180). Achados corroboram a ideia de que a interação entre EPO e NO representam um mecanismo relevante de atenuar os danos causados pela hipertensão (181-183)



e que a exposição à hipóxia crônica pode ser uma estratégia terapêutica para elevar os níveis de EPO e outros mecanismos associados a redução da inflamação.

Outro produto da ativação do HIF-1 $\alpha$  é o VEGF. Em rins normais, o VEGF é expresso de forma constitutiva em podócitos e células epiteliais tubulares da córtex e medula renal (184). Entre as principais funções do VEGF, destacam-se a angiogênese, estímulo para proliferação e migração celular e inibição da apoptose (65, 184). Alguns estudos observaram correlação entre a expressão renal de VEGF e a densidade de capilares peritubulares, sugerindo efeito renoprotetor através da atividade pró-angiogênica do VEGF (65, 185, 186). No modelo de glomerulonefrite experimental, as lesões glomerulares e a inflamação renal diminuíram com a administração de VEGF (187). Alguns achados demonstraram que a hipóxia promove a expressão de VEGF, assim como observado em outros estudos e que esse aumento pode estar relacionado à melhora da lesão renal observada nos animais submetidos à hipóxia (188, 189).

Em resumo, o presente estudo mostra que, em dois modelos distintos de DRC, a hipóxia exerce renoproteção, ao invés de atuar como fator patogênico. Esses achados são consistentes com resultados anteriores obtidos com o modelo de ablação renal 5/6 e parecem revelar um efeito geral, independente da natureza ou patogênese da doença renal. Esse efeito está associado à diminuição da ativação da imunidade inata e redução do estresse oxidativo, podendo derivar da ação de moléculas produzidas localmente como resposta adaptativa à hipóxia. Esses achados podem esclarecer a patogênese da DRC e contribuir para o desenvolvimento de estratégias inovadoras para interromper a progressão da doença.

## 6. CONCLUSÕES

1. Exposição à hipóxia não promove por si só lesão renal em ratos saudáveis;
2. Exposição à hipóxia, ao contrário do esperado, tem efeito protetor e anti-hipertensivo, corroborando observações anteriores;
3. O efeito protetor da hipóxia está intimamente relacionado a uma ação antiinflamatória;
4. O mecanismo de proteção pode envolver diminuição da ativação da imunidade inata, da Angiotensina II e do estresse oxidativo, quebrando a complexa interação pró-inflamatória;
5. Esses efeitos podem decorrer diretamente da resposta adaptativa à hipóxia, que se expressa na produção de moléculas como HIF, EPO e VEGF.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nerbass FB, Lima HDN, Thomé FS, Vieira Neto OM, Lugon JR, Sesso R. Brazilian Dialysis Survey 2020. *J Bras Nefrol.* 2022.
2. Nagy J. [The chronic kidney disease "epidemy"]. *Orv Hetil.* 2013;154(2):43-51.
3. Anderson S. Mechanisms of injury in progressive renal disease. *Exp Nephrol.* 1996;4 Suppl 1:34-40.
4. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest.* 1986;77(6):1925-30.
5. Fujihara CK, De Nucci G, Zatz R. Chronic nitric oxide synthase inhibition aggravates glomerular injury in rats with subtotal nephrectomy. *J Am Soc Nephrol.* 1995;5(7):1498-507.
6. Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R, Noronha IL. Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int.* 1998;54(5):1510-9.
7. Fujihara CK, Avancini Costa Malheiros DM, de Lourdes Noronha, De Nucci G, Zatz R. Mycophenolate Mofetil Reduces Renal Injury in the Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition Model. *Hypertension.* 2001;37(1):170-5.
8. Quiroz Y, Pons H, Gordon KL, Rincón J, Chávez M, Parra G, et al. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;281(1):F38-47.
9. Utimura R, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha IL, Zatz R, et al. Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes. *Kidney Int.* 2003;63(1):209-16.
10. Rastegar A, Kashgarian M. The clinical spectrum of tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int.* 1998;54(2):313-27.
11. Liu M, Ning X, Li R, Yang Z, Yang X, Sun S, et al. Signalling pathways involved in hypoxia-induced renal fibrosis. *J Cell Mol Med.* 2017;21(7):1248-59.
12. Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int.* 1991;39(3):550-6.
13. Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(11):1819-34.
14. Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH, Amenta PS, Watanabe M, Harper RA, et al. Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol.* 1988;107(4):1359-68.
15. Yang N, Wu LL, Nikolic-Paterson DJ, Ng YY, Yang WC, Mu W, et al. Local macrophage and myofibroblast proliferation in progressive renal injury in the rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(8):1967-74.
16. Zhang G, Moorhead PJ, el Nahas AM. Myofibroblasts and the progression of experimental glomerulonephritis. *Exp Nephrol.* 1995;3(5):308-18.
17. Anders HJ, Schaefer L. Beyond tissue injury-damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(7):1387-400.
18. Correa-Costa M, Braga TT, Semedo P, Hayashida CY, Bechara LR, Elias RM, et al. Pivotal role of Toll-like receptors 2 and 4, its adaptor molecule MyD88, and inflammasome complex in experimental tubule-interstitial nephritis. *PLoS One.* 2011;6(12):e29004.
19. Gonçalves GM, Castoldi A, Braga TT, Câmara NO. New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries. *Scand J Immunol.* 2011;73(5):428-35.

20. Fujihara CK, Antunes GR, Mattar AL, Malheiros DM, Vieira JM, Zatz R. Chronic inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(1):F92-9.
21. Okabe C, Borges RL, de Almeida DC, Fanelli C, Barlette GP, Machado FG, et al. NF- $\kappa$ B activation mediates crystal translocation and interstitial inflammation in adenine overload nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;305(2):F155-63.
22. Foresto-Neto O, Ávila VF, Arias SCA, Zambom FFF, Rempel LCT, Faustino VD, et al. NLRP3 inflammasome inhibition ameliorates tubulointerstitial injury in the remnant kidney model. *Lab Invest.* 2018;98(6):773-82.
23. Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, Wang W, Chin R, Hirota S, et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(10):1732-44.
24. Wang C, Pan Y, Zhang QY, Wang FM, Kong LD. Quercetin and allopurinol ameliorate kidney injury in STZ-treated rats with regulation of renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation. *PLoS One.* 2012;7(6):e38285.
25. Zambom FFF, Oliveira KC, Foresto-Neto O, Faustino VD, Ávila VF, Albino AH, et al. Pathogenic role of innate immunity in a model of chronic NO inhibition associated with salt overload. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2019.
26. Foresto-Neto O, Albino AH, Arias SCA, Faustino VD, Zambom FFF, Cenedeze MA, et al. NF- $\kappa$ B System Is Chronically Activated and Promotes Glomerular Injury in Experimental Type 1 Diabetic Kidney Disease. *Front Physiol.* 2020;11:84.
27. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.
28. Couser WG. Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(3):381-99.
29. Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Krönke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA. Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature.* 1993;365(6442):182-5.
30. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997;336(15):1066-71.
31. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* 2009;183(2):787-91.
32. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, et al. NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(8):1254-62.
33. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, et al. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension.* 1992;19(5):464-74.
34. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest.* 1994;93(6):2431-7.
35. Hisada Y, Sugaya T, Yamanouchi M, Uchida H, Fujimura H, Sakurai H, et al. Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *J Clin Invest.* 1999;103(5):627-35.
36. Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, Mannon PJ, Audoly LP, Amuchastegui CS, et al. Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J Clin Invest.* 1999;104(12):1693-701.
37. Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, et al. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation.* 1999;100(11):1223-9.
38. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(6):881-900.

39. Liu SF, Ye X, Malik AB. Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents *In vivo* expression of proinflammatory genes. *Circulation*. 1999;100(12):1330-7.
40. Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, Park JK, Schmidt F, Fiebeler A, et al. NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension*. 2000;35(1 Pt 2):193-201.
41. Sahali D, Pawlak A, Le Gouvello S, Lang P, Valanciuté A, Remy P, et al. Transcriptional and post-transcriptional alterations of IkappaBalpha in active minimal-change nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(8):1648-58.
42. Mezzano SA, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Aros CA, Caorsi I, et al. Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2000;57(1):147-58.
43. Zhou Y, Hong Y, Huang H. Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF-kB Signaling Pathway. *Kidney Blood Press Res*. 2016;41(6):901-10.
44. Zhang H, Sun SC. NF-kB in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci*. 2015;5:63.
45. Mezzano SA, Barría M, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Flores C, et al. Tubular NF-kappaB and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int*. 2001;60(4):1366-77.
46. Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, et al. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappaB. *Diabetologia*. 1999;42(2):222-32.
47. Mezzano S, Aros C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, et al. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(10):2505-12.
48. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;10(2):417-26.
49. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 2003;425(6957):516-21.
50. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:229-65.
51. Ghaemi-Oskouie F, Shi Y. The role of uric acid as an endogenous danger signal in immunity and inflammation. *Curr Rheumatol Rep*. 2011;13(2):160-6.
52. Lorenz G, Darisipudi MN, Anders HJ. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(1):41-8.
53. Abais JM, Xia M, Zhang Y, Boini KM, Li PL. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(13):1111-29.
54. Masood H, Che R, Zhang A. Inflammasomes in the Pathophysiology of Kidney Diseases. *Kidney Dis (Basel)*. 2015;1(3):187-93.
55. Isaka Y, Takabatake Y, Takahashi A, Saitoh T, Yoshimori T. Hyperuricemia-induced inflammasome and kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31(6):890-6.
56. Braga TT, Forni MF, Correa-Costa M, Ramos RN, Barbuto JA, Branco P, et al. Soluble Uric Acid Activates the NLRP3 Inflammasome. *Sci Rep*. 2017;7:39884.
57. Kim SM, Lee SH, Kim YG, Kim SY, Seo JW, Choi YW, et al. Hyperuricemia-induced NLRP3 activation of macrophages contributes to the progression of diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;308(9):F993-F1003.
58. Wen H, Ting JP, O'Neill LA. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases--did Warburg miss inflammation? *Nat Immunol*. 2012;13(4):352-7.
59. Shoji K, Tanaka T, Nangaku M. Role of hypoxia in progressive chronic kidney disease and implications for therapy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014;23(2):161-8.

60. Heyman SN, Brezis M, Reubinoff CA, Greenfeld Z, Lechene C, Epstein FH, et al. Acute renal failure with selective medullary injury in the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1988;82(2):401-12.
61. Norman JT, Fine LG. Intrarenal oxygenation in chronic renal failure. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2006;33(10):989-96.
62. Mimura I, Nangaku M. The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6(11):667-78.
63. Deng A, Arndt MA, Satriano J, Singh P, Rieg T, Thomson S, et al. Renal protection in chronic kidney disease: hypoxia-inducible factor activation vs. angiotensin II blockade. *American journal of physiology Renal physiology*. 2010;299(6):F1365-73.
64. Kang DH, Joly AH, Oh SW, Hugo C, Kerjaschki D, Gordon KL, et al. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2001;12(7):1434-47.
65. Machado FG, Kuriki PS, Fujihara CK, Fanelli C, Arias SC, Malheiros DM, et al. Chronic VEGF blockade worsens glomerular injury in the remnant kidney model. *PLoS One*. 2012;7(6):e39580.
66. Ortiz-Prado E, Dunn JF, Vasconez J, Castillo D, Viscor G. Partial pressure of oxygen in the human body: a general review. *Am J Blood Res*. 2019;9(1):1-14.
67. Choudhury R. Hypoxia and hyperbaric oxygen therapy: a review. *Int J Gen Med*. 2018;11:431-42.
68. Julian CG. An Aptitude for Altitude: Are Epigenomic Processes Involved? *Front Physiol*. 2019;10:1397.
69. Julian CG, Moore LG. Human Genetic Adaptation to High Altitude: Evidence from the Andes. *Genes (Basel)*. 2019;10(2).
70. Scholz H, Schurek HJ, Eckardt KU, Bauer C. Role of erythropoietin in adaptation to hypoxia. *Experientia*. 1990;46(11-12):1197-201.
71. Haase VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299(1):F1-13.
72. Beall CM. Andean, Tibetan, and Ethiopian patterns of adaptation to high-altitude hypoxia. *Integr Comp Biol*. 2006;46(1):18-24.
73. Beall CM. Two routes to functional adaptation: Tibetan and Andean high-altitude natives. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104 Suppl 1:8655-60.
74. Hurtado A, Escudero E, Pando J, Sharma S, Johnson RJ. Cardiovascular and renal effects of chronic exposure to high altitude. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27 Suppl 4:iv11-6.
75. Whayne TF. Cardiovascular medicine at high altitude. *Angiology*. 2014;65(6):459-72.
76. Luks AM, Johnson RJ, Swenson ER. Chronic kidney disease at high altitude. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(12):2262-71.
77. Arestegui AH, Fuquay R, Sirota J, Swenson ER, Schoene RB, Jefferson JA, et al. High altitude renal syndrome (HARS). *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(11):1963-8.
78. Winkelmayer WC, Liu J, Brookhart MA. Altitude and all-cause mortality in incident dialysis patients. *JAMA*. 2009;301(5):508-12.
79. Shapiro BB, Streja E, Rhee CM, Molnar MZ, Kheifets L, Kovesdy CP, et al. Revisiting the association between altitude and mortality in dialysis patients. *Hemodialysis international International Symposium on Home Hemodialysis*. 2014;18(2):374-83.
80. Winkelmayer WC, Hurley MP, Liu J, Brookhart MA. Altitude and the risk of cardiovascular events in incident US dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(6):2411-7.
81. Brookhart MA, Schneeweiss S, Avorn J, Bradbury BD, Rothman KJ, Fischer M, et al. The effect of altitude on dosing and response to erythropoietin in ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(7):1389-95.
82. Brookhart MA, Bradbury BD, Avorn J, Schneeweiss S, Winkelmayer WC. The effect of altitude change on anemia treatment response in hemodialysis patients. *Am J Epidemiol*. 2011;173(7):768-77.

83. Schiffer TA, Friederich-Persson M. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Kidney Hypoxia in the Development of Diabetic Nephropathy. *Front Physiol.* 2017;8:211.
84. Rempel LCT, Faustino VD, Foresto-Neto O, Fanelli C, Arias SCA, Moreira GCDS, et al. Chronic exposure to hypoxia attenuates renal injury and innate immunity activation in the remnant kidney model. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2019.
85. Tanaka T, Kojima I, Ohse T, Ingelfinger JR, Adler S, Fujita T, et al. Cobalt promotes angiogenesis via hypoxia-inducible factor and protects tubulointerstitium in the remnant kidney model. *Lab Invest.* 2005;85(10):1292-307.
86. Kapitsinou PP, Sano H, Michael M, Kobayashi H, Davidoff O, Bian A, et al. Endothelial HIF-2 mediates protection and recovery from ischemic kidney injury. *J Clin Invest.* 2014;124(6):2396-409.
87. Mairböurl H. Red blood cell function in hypoxia at altitude and exercise. *Int J Sports Med.* 1994;15(2):51-63.
88. Shu S, Wang Y, Zheng M, Liu Z, Cai J, Tang C, et al. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Kidney Injury and Repair. *Cells.* 2019;8(3).
89. Soilleux EJ, Turley H, Tian YM, Pugh CW, Gatter KC, Harris AL. Use of novel monoclonal antibodies to determine the expression and distribution of the hypoxia regulatory factors PHD-1, PHD-2, PHD-3 and FIH in normal and neoplastic human tissues. *Histopathology.* 2005;47(6):602-10.
90. Schödel J, Klanke B, Weidemann A, Buchholz B, Bernhardt W, Bertog M, et al. HIF-prolyl hydroxylases in the rat kidney: physiologic expression patterns and regulation in acute kidney injury. *Am J Pathol.* 2009;174(5):1663-74.
91. Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia. *EMBO J.* 2003;22(16):4082-90.
92. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 2004;279(37):38458-65.
93. Kaelin WG, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell.* 2008;30(4):393-402.
94. Bonomini M, Del Vecchio L, Sirolli V, Locatelli F. New Treatment Approaches for the Anemia of CKD. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation.* 2015.
95. Franke K, Kalucka J, Mamlouk S, Singh RP, Muschter A, Weidemann A, et al. HIF-1 $\alpha$  is a protective factor in conditional PHD2-deficient mice suffering from severe HIF-2 $\alpha$ -induced excessive erythropoiesis. *Blood.* 2013;121(8):1436-45.
96. Song YR, You SJ, Lee YM, Chin HJ, Chae DW, Oh YK, et al. Activation of hypoxia-inducible factor attenuates renal injury in rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(1):77-85.
97. Hill P, Shukla D, Tran MG, Aragones J, Cook HT, Carmeliet P, et al. Inhibition of hypoxia inducible factor hydroxylases protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(1):39-46.
98. Matsumoto M, Makino Y, Tanaka T, Tanaka H, Ishizaka N, Noiri E, et al. Induction of renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(7):1825-32.
99. Weidemann A, Bernhardt WM, Klanke B, Daniel C, Buchholz B, Câmpean V, et al. HIF activation protects from acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(3):486-94.
100. Tanaka T, Matsumoto M, Inagi R, Miyata T, Kojima I, Ohse T, et al. Induction of protective genes by cobalt ameliorates tubulointerstitial injury in the progressive Thy1 nephritis. *Kidney Int.* 2005;68(6):2714-25.
101. Higgins DF, Biju MP, Akai Y, Wutz A, Johnson RS, Haase VH. Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;287(6):F1223-32.

102. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2007;117(12):3810-20.
103. Hayashida T LX, Hubchak S, et al. . Hypoxia-inducible factor expression is upregulated and accelerates fibrosis in Adriamycin-induced murine glomerulonephropathy. . *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(4):16A).
104. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*. 1965;2(3):235-54.
105. Fujihara CK, Michellazzo SM, de Nucci G, Zatz R. Sodium excess aggravates hypertension and renal parenchymal injury in rats with chronic NO inhibition. *Am J Physiol*. 1994;266(5 Pt 2):F697-705.
106. Jepsen FL, Mortensen PB. Interstitial fibrosis of the renal cortex in minimal change lesion and its correlation with renal function. A quantitative study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1979;383(3):265-70.
107. Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res*. 1980;47(1):1-9.
108. Ataka K, Maruyama H, Neichi T, Miyazaki J, Gejyo F. Effects of erythropoietin-gene electrotransfer in rats with adenine-induced renal failure. *Am J Nephrol*. 2003;23(5):315-23.
109. MOREIRA GCS. The role of innate immunity in chronic kidney disease following the treatment with a temporary overload dietary adenine. <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5148/tde-19062017-155418/pt-br.php>: University of Sao Paulo; 2017.
110. MOREIRA GCS, MACHADO FG, FUJIHARA CK, HUMPHREYS BD, ZATZ R. Adenine Overload Causes Severe AKI Progressing to CKD by Activation of Innate Immunity in Rats and Mice. 2016.
111. Tong Y, Han B, Guo H, Liu Y. Protection of Chinese herbs against adenine-induced chronic renal failure in rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2010;7(4):331-8.
112. Evan AP, Bledsoe SB, Connors BA, Deng L, Liang L, Shao C, et al. Sequential analysis of kidney stone formation in the Appt knockout mouse. *Kidney Int*. 2001;60(3):910-23.
113. Kashioulis P, Lundgren J, Shubbar E, Nguy L, Saeed A, Guron CW, et al. Adenine-Induced Chronic Renal Failure in Rats: A Model of Chronic Renocardiac Syndrome with Left Ventricular Diastolic Dysfunction but Preserved Ejection Fraction. *Kidney Blood Press Res*. 2018;43(4):1053-64.
114. Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats. *Nephrology (Carlton)*. 2018;23(1):5-11.
115. Baracho NC, Kangussu LM, Prestes TR, Silveira KD, Pereira RM, Rocha NP, et al. Characterization of an experimental model of progressive renal disease in rats. *Acta Cir Bras*. 2016;31(11):744-52.
116. Alge JL, Arthur JM. Biomarkers of AKI: a review of mechanistic relevance and potential therapeutic implications. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(1):147-55.
117. PHILIPS FS, THIERSCH JB, BENDICH A. Adenine intoxication in relation to in vivo formation and deposition of 2,8-dioxyadenine in renal tubules. *J Pharmacol Exp Ther*. 1952;104(1):20-30.
118. Paulis L, Zicha J, Kunes J, Hojna S, Behuliak M, Celec P, et al. Regression of L-NAME-induced hypertension: the role of nitric oxide and endothelium-derived constricting factor. *Hypertens Res*. 2008;31(4):793-803.
119. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisollo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension*. 1992;20(3):298-303.
120. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest*. 1992;90(1):278-81.
121. Pechánová O, Dobesová Z, Cejka J, Kunes J, Zicha J. Vasoactive systems in L-NAME hypertension: the role of inducible nitric oxide synthase. *J Hypertens*. 2004;22(1):167-73.
122. Kopincová J, Púzserová A, Bernátová I. L-NAME in the cardiovascular system - nitric oxide synthase activator? *Pharmacol Rep*. 2012;64(3):511-20.



123. Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT. Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(12):2236-42.
124. Clancy RM, Gomez PF, Abramson SB. Nitric oxide sustains nuclear factor kappaB activation in cytokine-stimulated chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12(7):552-8.
125. Mao K, Chen S, Chen M, Ma Y, Wang Y, Huang B, et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Res.* 2013;23(2):201-12.
126. Sollinger D, Eißler R, Lorenz S, Strand S, Chmielewski S, Aoqui C, et al. Damage-associated molecular pattern activated Toll-like receptor 4 signalling modulates blood pressure in L-NAME-induced hypertension. *Cardiovasc Res.* 2014;101(3):464-72.
127. Bomfim GF, Dos Santos RA, Oliveira MA, Giachini FR, Akamine EH, Tostes RC, et al. Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond).* 2012;122(11):535-43.
128. Vrankova S, Parohova J, Barta A, Janega P, Simko F, Pechanova O. Effect of nuclear factor kappa B inhibition on L-NAME-induced hypertension and cardiovascular remodelling. *J Hypertens.* 2010;28 Suppl 1:S45-9.
129. Faustino VD, Arias SCA, Ferreira Ávila V, Foresto-Neto O, Zambom FFF, Machado FG, et al. Simultaneous activation of innate and adaptive immunity participates in the development of renal injury in a model of heavy proteinuria. *Biosci Rep.* 2018;38(4).
130. Pruijm M, Milani B, Pivin E, Podhajska A, Vogt B, Stuber M, et al. Reduced cortical oxygenation predicts a progressive decline of renal function in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2018;93(4):932-40.
131. Cheng Z, Liu L, Wang Z, Cai Y, Xu Q, Chen P. Hypoxia Activates Src and Promotes Endocytosis Which Decreases MMP-2 Activity and Aggravates Renal Interstitial Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
132. Mortimer EA, Monson RR, MacMahon B. Reduction in mortality from coronary heart disease in men residing at high altitude. *N Engl J Med.* 1977;296(11):581-5.
133. Baibas N, Trichopoulou A, Vroidis E, Trichopoulos D. Residence in mountainous compared with lowland areas in relation to total and coronary mortality. A study in rural Greece. *J Epidemiol Community Health.* 2005;59(4):274-8.
134. Savla JJ, Levine BD, Sadek HA. The Effect of Hypoxia on Cardiovascular Disease: Friend or Foe? *High Alt Med Biol.* 2018;19(2):124-30.
135. Faeh D, Gutzwiller F, Bopp M, Group SNCS. Lower mortality from coronary heart disease and stroke at higher altitudes in Switzerland. *Circulation.* 2009;120(6):495-501.
136. Hansen J, Sander M. Sympathetic neural overactivity in healthy humans after prolonged exposure to hypobaric hypoxia. *J Physiol.* 2003;546(Pt 3):921-9.
137. Lundby C, Calbet J, van Hall G, Saltin B, Sander M. Sustained sympathetic activity in altitude acclimatizing lowlanders and high-altitude natives. *Scand J Med Sci Sports.* 2018;28(3):854-61.
138. Kacimi R, Richalet JP, Corsin A, Abousahl I, Crozatier B. Hypoxia-induced downregulation of beta-adrenergic receptors in rat heart. *J Appl Physiol (1985).* 1992;73(4):1377-82.
139. Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer.* 2011;2(12):1117-33.
140. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest.* 2008;118(11):3522-30.
141. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787-95.
142. Strehl C, Fangradt M, Fearon U, Gaber T, Buttgereit F, Veale DJ. Hypoxia: how does the monocyte-macrophage system respond to changes in oxygen availability? *J Leukoc Biol.* 2014;95(2):233-41.

143. Braga TT, Correa-Costa M, Azevedo H, Silva RC, Cruz MC, Almeida ME, et al. Early infiltration of p40IL12(+)/CCR7(+)/CD11b(+) cells is critical for fibrosis development. *Immun Inflamm Dis*. 2016;4(3):300-14.
144. Taylor CT, Doherty G, Fallon PG, Cummins EP. Hypoxia-dependent regulation of inflammatory pathways in immune cells. *J Clin Invest*. 2016;126(10):3716-24.
145. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(9):609-17.
146. Mishra KP, Ganju L, Singh SB. Hypoxia modulates innate immune factors: A review. *Int Immunopharmacol*. 2015;28(1):425-8.
147. D'Ignazio L, Rocha S. Hypoxia Induced NF- $\kappa$ B. *Cells*. 2016;5(1).
148. Koong AC, Chen EY, Giaccia AJ. Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res*. 1994;54(6):1425-30.
149. Culver C, Sundqvist A, Mudie S, Melvin A, Xirodimas D, Rocha S. Mechanism of hypoxia-induced NF-kappaB. *Mol Cell Biol*. 2010;30(20):4901-21.
150. Willam C. HIF meets NF- $\kappa$ B signaling. *Kidney Int*. 2014;85(2):232-4.
151. Zhuang Y, Yasinta M, Hu C, Zhao M, Ding G, Bai M, et al. Mitochondrial dysfunction confers albumin-induced NLRP3 inflammasome activation and renal tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;308(8):F857-66.
152. Liu Y, Wang Y, Ding W. Mito-TEMPO Alleviates Renal Fibrosis by Reducing Inflammation, Mitochondrial Dysfunction, and Endoplasmic Reticulum Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:5828120.
153. Zhao MM, Xu MJ, Cai Y, Zhao G, Guan Y, Kong W, et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote p65 nuclear translocation mediating high-phosphate-induced vascular calcification in vitro and in vivo. *Kidney Int*. 2011;79(10):1071-9.
154. Gwinner W, Deters-Evers U, Brandes RP, Kubat B, Koch KM, Pape M, et al. Antioxidant-oxidant balance in the glomerulus and proximal tubule of the rat kidney. *J Physiol*. 1998;509 ( Pt 2):599-606.
155. Huang HS, Ma MC, Chen J, Chen CF. Changes in the oxidant-antioxidant balance in the kidney of rats with nephrolithiasis induced by ethylene glycol. *J Urol*. 2002;167(6):2584-93.
156. Jain IH, Zazzeron L, Goli R, Alexa K, Schatzman-Bone S, Dhillon H, et al. Hypoxia as a therapy for mitochondrial disease. *Science*. 2016;352(6281):54-61.
157. Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC, Chau LY. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1998;152(3):711-20.
158. Wagner CT, Durante W, Christodoulides N, Hellums JD, Schafer AI. Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1997;100(3):589-96.
159. Correa-Costa M, Semedo P, Monteiro AP, Silva RC, Pereira RL, Gonçalves GM, et al. Induction of heme oxygenase-1 can halt and even reverse renal tubule-interstitial fibrosis. *PLoS One*. 2010;5(12):e14298.
160. Ishola DA, Post JA, van Timmeren MM, Bakker SJ, Goldschmeding R, Koomans HA, et al. Albumin-bound fatty acids induce mitochondrial oxidant stress and impair antioxidant responses in proximal tubular cells. *Kidney Int*. 2006;70(4):724-31.
161. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res*. 1999;84(6):695-703.
162. Rodríguez-Iturbe B, Franco M, Tapia E, Quiroz Y, Johnson RJ. Renal inflammation, autoimmunity and salt-sensitive hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39(1):96-103.
163. Zhao M, Bai M, Ding G, Zhang Y, Huang S, Jia Z, et al. Angiotensin II Stimulates the NLRP3 Inflammasome to Induce Podocyte Injury and Mitochondrial Dysfunction. *Kidney Dis (Basel)*. 2018;4(2):83-94.

164. Kim JM, Heo HS, Ha YM, Ye BH, Lee EK, Choi YJ, et al. Mechanism of Ang II involvement in activation of NF- $\kappa$ B through phosphorylation of p65 during aging. *Age (Dordr)*. 2012;34(1):11-25.
165. Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RA, Thaiss F. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors. *Kidney Int*. 2002;61(6):1986-95.
166. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature*. 2008;453(7196):807-11.
167. Friederich-Persson M, Thörn E, Hansell P, Nangaku M, Levin M, Palm F. Kidney hypoxia, attributable to increased oxygen consumption, induces nephropathy independently of hyperglycemia and oxidative stress. *Hypertension*. 2013;62(5):914-9.
168. Colgan SP, Furuta GT, Taylor CT. Hypoxia and Innate Immunity: Keeping Up with the HIFsters. *Annu Rev Immunol*. 2020;38:341-63.
169. Hackett PH, Roach RC. High-altitude illness. *N Engl J Med*. 2001;345(2):107-14.
170. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med*. 2011;364(7):656-65.
171. Bartoszewska S, Kochan K, Piotrowski A, Kamysz W, Ochocka RJ, Collawn JF, et al. The hypoxia-inducible miR-429 regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in human endothelial cells through a negative feedback loop. *FASEB J*. 2015;29(4):1467-79.
172. Krzywinska E, Stockmann C. Hypoxia, Metabolism and Immune Cell Function. *Biomedicines*. 2018;6(2).
173. Yang M, Su H, Soga T, Kranc KR, Pollard PJ. Prolyl hydroxylase domain enzymes: important regulators of cancer metabolism. *Hypoxia (Auckl)*. 2014;2:127-42.
174. Fong GH, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ*. 2008;15(4):635-41.
175. Schley G, Klanke B, Kalucka J, Schatz V, Daniel C, Mayer M, et al. Mononuclear phagocytes orchestrate prolyl hydroxylase inhibition-mediated renoprotection in chronic tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int*. 2019;96(2):378-96.
176. Pawlak S, Pawlak D, Buczek W. [Hypoxia involvement in erythropoiesis regulation--a new insight]. *Przegl Lek*. 2004;61(12):1415-9.
177. Nagle DG, Zhou YD. Natural product-derived small molecule activators of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Curr Pharm Des*. 2006;12(21):2673-88.
178. Fandrey J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286(6):R977-88.
179. Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobé G, Johnson DW. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(2):348-55.
180. Shih HM, Wu CJ, Lin SL. Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. *J Formos Med Assoc*. 2018;117(11):955-63.
181. Ozkurt M, Uzuner K, Erkasap N, Kus G, Ozyurt R, Uysal O, et al. Erythropoietin Protects the Kidney by Regulating the Effect of TNF- $\alpha$  in L-NAME-Induced Hypertensive Rats. *Kidney Blood Press Res*. 2018;43(3):807-19.
182. Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X, Weksler BB, Schechter AN, Noguchi CT. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood*. 2004;104(7):2073-80.
183. Ohigashi T, Brookins J, Fisher JW. Interaction of nitric oxide and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in erythropoietin production. *J Clin Invest*. 1993;92(3):1587-91.
184. Baderca F, Lighezan R, Dema A, Alexa A, Raica M. Immunohistochemical expression of VEGF in normal human renal parenchyma. *Rom J Morphol Embryol*. 2006;47(4):315-22.
185. Eardley KS, Kubal C, Zehnder D, Quinkler M, Lepenies J, Savage CO, et al. The role of capillary density, macrophage infiltration and interstitial scarring in the pathogenesis of human chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2008;74(4):495-504.

186. Cooper ME, Vranes D, Youssef S, Stacker SA, Cox AJ, Rizkalla B, et al. Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes. *Diabetes*. 1999;48(11):2229-39.
187. Masuda Y, Shimizu A, Mori T, Ishiwata T, Kitamura H, Ohashi R, et al. Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 2001;159(2):599-608.
188. Rudnicki M, Perco P, Enrich J, Eder S, Heining D, Bernthaler A, et al. Hypoxia response and VEGF-A expression in human proximal tubular epithelial cells in stable and progressive renal disease. *Lab Invest*. 2009;89(3):337-46.
189. Zhang B, Qiangba Y, Shang P, Lu Y, Yang Y, Wang Z, et al. Gene expression of vascular endothelial growth factor A and hypoxic adaptation in Tibetan pig. *J Anim Sci Biotechnol*. 2016;7:21.