

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO MICOFENOLATO DE
MOFETILA E DA APOCININA NA LESÃO RENAL AGUDA
INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM RATOS
WISTAR**

JÉSSICA SANTOS SCHIRATO ALBUQUERQUE

RECIFE

2020

JÉSSICA SANTOS SCHIRATO ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO MICOFENOLATO DE
MOFETILA E DA APOCININA NA LESÃO RENAL AGUDA
INDUZIDA POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM RATOS
WISTAR**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Leucio Duarte Vieira Filho

RECIFE

2020

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Albuquerque, Jéssica Santos Schirato

Avaliação dos efeitos do micofenolato de mofetila e da apocinina na lesão renal aguda induzida por isquemia e reperfusão em ratos Wistar / Jéssica Santos Schirato Albuquerque – 2020.

61 f. : il., fig., tab.

Orientador: Leucio Duarte Vieira Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Rins- doenças 2. Isquemia 3. Estresse oxidativo I. Vieira Filho, Leucio Duarte (orient.) II. Título

616.6107

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-271

JÉSSICA SANTOS SCHIRATO ALBUQUERQUE

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO MICOFENOLATO DE MOFETILA E
DA APOCININA NA LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA POR
ISQUEMIA E REPERFUSÃO EM RATOS WISTAR

Dissertação apresentada como um dos
requisitos para o cumprimento parcial
das exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica e Fisiologia
pela Universidade Federal de
Pernambuco.

Banca Examinadora

Gardenia Carmen Gadelha Militão (Titular 1)
Universidade Federal de Pernambuco

Dayane Aparecida Gomes (Titular 2)
Universidade Federal de Pernambuco

Valéria Nunes de Souza (Titular 3)
Universidade Federal de Pernambuco

Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa (Suplente 1)
Universidade Federal de Pernambuco

Juliane Silva de Farias (Suplente 2)
Universidade Federal de Pernambuco

Agradeço aos meus pais e meus irmãos pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis da minha trajetória acadêmica. Este trabalho é dedicado a eles.

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Federal da Pernambuco**, por possibilitar meu mestrado, e ao órgão de fomento **Cnpq** pela concessão da bolsa.

Ao **Departamento de Fisiologia e Farmacologia** pela disponibilidade do Biotério e equipamentos utilizados para a construção desse trabalho.

Ao meu orientador **Leucio Duarte Vieira Filho**, por todo apoio, dedicação e oportunidade dada a mim ao longo dos dois anos de mestrado.

Aos membros da banca **Profa Valéria Nunes-Souza, Profa Dayane Aparecida Gomes, Profa Gardênia Carmem Gadelha Militão, Profa Belmira Lara da Silveira Andrade Costa e Dra. Juliane Farias** em contribuir com esse trabalho.

A **Deus**, que sempre esteve presente durante essa caminhada, me dando força e discernimento para realizar os meus sonhos.

A **minha família** por toda confiança, dedicação e apoio em mim investidos para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Aos membros do **Laboratório de Fisiopatologia Renal** por todo companheirismo e por se disporem a me ajudar quando precisei.

A **Shirley Sousa** por dividir comigo a construção desse trabalho, pela parceria e amizade construída até aqui.

A **Jeoadã Karollyne, Natalia Kryzia e Gabriela Almeida** pela amizade e por se tornarem minha família em Recife nesses dois anos.

A **Cláudio Freire Madruga Filho**, por toda compreensão e apoio dados a mim para que alcançasse meus sonhos e objetivos.

A todos que pontualmente não citei, mas que de alguma maneira contribuíram com esta conquista.

Meu eterno agradecimento, **Jéssica Santos Schirato Albuquerque**.

“O que faz andar o barco
não é a vela enfundada,
mas o vento que não se
vê.” Platão

RESUMO

A isquemia/reperfusão (IR) renal está associada a lesão renal aguda (LRA) e ao aumento da susceptibilidade do paciente ao desenvolvimento de doença renal crônica e hipertensão. A reabsorção de Na^+ e água é prejudicada devido a danos nas células epiteliais dos túbulos renais e o estresse oxidativo e o sistema imune podem estar envolvidos no mecanismo de lesão. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi investigar o impacto do tratamento com imunossupressor micofenolato de mofetila (MMF) e com apocinina no surgimento das alterações do transporte de Na^+ no túbulo proximal observadas na lesão renal aguda induzida por IR em ratos. Aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE: nº 0061/2018. Ratos machos Wistar (280-300 g, n=24) foram submetidos à LRA induzida por IR renal bilateral (grupo IR). Previamente a indução da LRA (24 horas), parte desses animais (n=8) recebeu tratamento em dose única do imunossupressor micofenolato de mofetila (MMF; 30 mg/kg, via oral; grupo IRM), enquanto que outra parte recebeu tratamento com o inibidor da NADPH oxidase apocinina (Apo; 100 mg/kg, via oral; grupo IRA). O grupo sham foi submetido a um procedimento mimético da IR. Após 24 horas de reperfusão, os animais foram submetidos a avaliação dos níveis séricos de creatinina e ureia, níveis séricos de nitrato/nitrito, e proteinúria. Além disso foi avaliada a atividade da Na^+/K^+ -ATPase, atividade da Na^+ -ATPase, atividade da NADPH oxidase e produção de ânion superóxido no córtex renal e expressão renal do RNAm de componentes do sistema renina-angiotensina. O grupo IR apresentou elevação de 700% ($P<0,001$) dos níveis séricos de creatinina, elevação de 200% ($P<0,001$) da proteinúria e diminuição de 70% ($P<0,01$) dos níveis séricos de nitrato/nitrito em comparação com o Sham. Os grupos IRA e IRM apresentaram níveis séricos de creatinina e proteinúria menores do que o grupo IR (70%, $P<0,001$ e 40%, $P<0,001$, respectivamente). A IR também promoveu elevação dos níveis de superóxido, da atividade da NADPH oxidase e da Na^+/K^+ -ATPase no córtex renal, bem como diminuiu a atividade da Na^+ -ATPase. Adicionalmente, os ratos submetidos a IR apresentaram aumento (100-200%, $P<0,05$) da expressão do RNAm do angiotensinogênio, da isoforma 1 enzima conversora de angiotensina (ECA1) e do receptor AT1a, bem como diminuição de mais de 50% ($P<0,05$) da isoforma 2 da ECA (ECA2). As alterações na atividade das ATPases e na expressão do RNAm dos componentes do SRA foram prevenidas por ambos tratamentos. Dessa forma, concluímos que a IR renal induz alterações no transporte de Na^+ dependente de ATP e ativação do SRA através de mecanismos que envolvem ativação da NADPH oxidase e que são sensíveis ao imunossupressor MMF.

Palavras-chave: Isquemia/reperfusão, Lesão renal aguda; Transporte de sódio; Micofenolato de mofetila; Apocinina.

ABSTRACT

Renal ischemia/reperfusion (IR) is associated with acute kidney injury (AKI) and the patient's increased susceptibility to the development of chronic kidney disease and hypertension. The reabsorption of Na⁺ and water is impaired due to damage to the epithelial cells of the renal tubules and oxidative stress and the immune system may be involved in the injury mechanism. Thus, the objective of the study was to investigate the impact of treatment with mycophenolate mofetil (MMF) immunosuppressant and with apocinin on the appearance of changes in Na⁺ transport in the proximal tubule seen in acute IR injury induced in rats. Approval by the Animal Research Ethics Committee at UFPE: n° 0061/2018. Male Wistar rats (280-300 g, n = 24) were submitted to AKI induced by bilateral renal IR (IR group). Previously the AKI induction (24 hours), part of these animals (n=8) received treatment in a single dose of the mycophenolate mofetil immunosuppressant (MMF; 30 mg/kg, orally; MRI group), while another part received treatment with the NADPH oxidase inhibitor apocinin (Apo; 100 mg/kg, orally; ARI group). The sham group was submitted to an IR mimetic procedure. After 24 hours of reperfusion, the animals were submitted to serum creatinine and urea levels, serum nitrate/nitrite levels, and proteinuria. In addition, Na⁺+K⁺-ATPase activity, Na⁺-ATPase activity, NADPH oxidase activity and superoxide anion production in the renal cortex and renal RNAm expression of components of the renin-angiotensin system were evaluated. The IR group showed a 700% increase (P <0.001) in serum creatinine levels, a 200% increase (P <0.001) in proteinuria and a 70% decrease (P <0.01) in serum nitrate/nitrite levels in compared to Sham. The ARI and MRI groups had lower serum creatinine and proteinuria levels than the IR group (70%, P <0.001 and 40%, P <0.001, respectively). IR also increased the levels of superoxide, the activity of NADPH oxidase and Na⁺+K⁺-ATPase in the renal cortex, as well as decreased the activity of Na⁺-ATPase. In addition, the rats submitted to IR showed an increase (100-200%, P <0.05) in the expression of angiotensinogen mRNA, isoform 1 angiotensin-converting enzyme (ACE1) and AT1a receptor, as well as a decrease of more than 50 % (P <0.05) of ACE isoform 2 (ACE2). Changes in ATPase activity and in the expression of the RNAm of the components of the RAS were prevented by both treatments. Thus, we conclude that renal IR induces changes in ATP-dependent Na⁺ transport and activation of SARS through mechanisms that involve NADPH oxidase activation and that are sensitive to the MMF immunosuppressant..

Keywords: Ischemia/reperfusion; Acute kidney injury; Sodium transport; Mycophenolate Mofetil; Apocinin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lesão por isquemia-reperfusão renal	16
Figura 2 - Ativação do sistema Renina-angiotensina intra-renal	20
Figura 3 - Mecanismo de ativação do sistema imune na isquemia-reperfusão renal	27

LISTA DE ABREVIATURAS

AGT	Angiotensinogênio
AT1R	Receptor de angiotensina 1
AT2R	Receptor de angiotensina 2
CAT	Catalase
DC	Célula dendrítica
ECA	Enzima conversora de angiotensina
eNOS	NOS endotelial
DAMPs	Padrões moleculares pró-inflamatórios associados a danos
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
DRC	Doença renal crônica
GSH	Glutathiona reduzida
HIF	Fator induzível por hipóxia
IECA	Inibidores da enzima de conversão da angiotensina
iNOS	NOS indutível
IR	Isquemia/reperfusão renal
LRA	Lesão renal aguda
MDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase
NKCC2	Cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}$

nNOS	NOS neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	NADPH oxidase
O ₂	Superóxido
OH	Hidroxila
PGE ₁	Prostaglandina E ₁
PGI ₂	Prostaciclina
pO ₂	Pressão parcial do oxigênio
RFG	Ritmo de filtração glomerular
SOD	Superóxido dismutase
SRA	Sistema renina-angiotensina
TLRs	Receptores toll-like (TLRs)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TFG	Taxa de filtração glomerular
TxA ₂	Tromboxano A ₂
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 Lesão renal aguda	15
2.1.1 Isquemia/reperfusão	16
2.2 Função tubular	17
2.2.1 Aspectos da função tubular relacionados com fisiopatologia da LRA..	19
2.3 Sistema renina-angiotensina	20
2.4 Estresse oxidativo	23
2.5 Sistema imune e inflamação	27
JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 Geral	33
3.2 Específicos	33
4 REFERÊNCIAS	34
5 ARTIGO	44
6 CONCLUSÕES	61

1. INTRODUÇÃO

A doença renal, crônica ou aguda, possui incidência crescente, sendo considerado um problema de saúde pública mundial e de desfechos desfavoráveis e alto custo (LEVEI et al., 2003). A lesão renal aguda (LRA) é caracterizada pelo declínio abrupto da taxa de filtração glomerular, o que leva ao acúmulo de ureia e outras substâncias químicas no sangue, em contrapartida, a doença renal crônica (DRC) é um termo geral para distúrbios heterogêneos que afetam a estrutura e função do rim progressivamente (LEVEY e CORESH, 2012; KELLUM et al., 2011).

A LRA está associada à alta morbidade, mortalidade e custos de saúde. Além da diálise, nenhuma intervenção terapêutica melhora a sobrevida de forma confiável, limita a lesão ou acelera a recuperação (ZUK e BONVENTRE, 2016). Por muito tempo, a LRA foi considerada uma síndrome completamente reversível, entretanto, nos últimos anos, estudos demonstraram um aumento na indução de DRC e danos em órgãos não renais ocasionados pela LRA (STEVEN et al., 2012).

A isquemia/reperfusão renal (IR) é caracterizada pela restrição do suprimento sanguíneo para os rins, seguido pela restauração do fluxo sanguíneo e re-oxigenação (JANG, RABB; 2009). Dessa forma, a IR ocasiona uma lesão às células epiteliais tubulares podendo levar à morte por apoptose e necrose, com comprometimento funcional dos órgãos (LE DORZE et al., 2009). Os rins lesionados por isquemia manifestam uma variedade de deficiências funcionais, destacando-se o comprometimento da reabsorção tubular de solutos e água (HANLEY, 1980; JOHNSTON et al., 1984).

A reabsorção tubular proximal de sódio é uma função renal fundamental para manutenção do volume plasmático e da pressão arterial (ROOS et al., 1984). O transporte de sódio é dependente do gradiente de concentração gerado pelos transportadores basolaterais, sendo que a maioria dos gradientes químicos necessários para reabsorver e excretar solutos do filtrado glomerular bruto surgem da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ basolateral (EMMA et al; 2016) (JORGENSEN et al., 2003). A reabsorção tubular de sódio e água é alterada devido a lesão causada às células epiteliais dos túbulos renais, levando a danos estruturais e mudanças funcionais, sendo os túbulos proximais e o ramo ascendente medular externo os mais afetados por tais alterações (BONVENTRE e ZUK, 2014).

O transporte tubular de Na^+ apresenta um intenso controle pelo sistema renina-angiotensina (SRA). A diminuição na perfusão renal estimula o SRA, que leva à consequente retenção renal de sódio e aumento do volume intravascular (GOLDEBLAT et al., 1934). A angiotensina II é produzida pelo “SRA clássico” através da clivagem sequencial do angiotensinogênio por proteases específicas, incluindo a renina e a enzima conversora de angiotensina (ECA). Por outro lado, também são conhecidas atividades biológicas de outros peptídeos originados do angiotensinogênio, incluindo a Ang 1-7, que é gerada pela ação da isoforma 2 da enzima conversora de angiotensina (ECA2) (HAULICA et al., 2005; PENDERGRASS et al., 2006). A inibição do SRA limita a inflamação renal e o estresse oxidativo de forma independente de modulação da pressão arterial (CROWLEY ET AL., 2010).

O estresse oxidativo é um mecanismo fundamental da fisiopatologia da IR, sendo parcialmente dependente da produção excessiva de espécies reativas do oxigênio (EROs) pela NADPH oxidase (YAMAMOTO, 2017). A ativação da NADPH oxidase promove lesões teciduais diretamente pela produção de EROs, e ainda por mecanismos indiretos como ativação do SRA e produção de mediadores inflamatórios (CIFUENTES-PAGANO, 2014; JHA et al., 2016). Desse modo, a inibição da NOX torna-se um tratamento terapêutico promissor para diversas doenças (RASTOGI, 2017, BRITO, 2015, SUNIL JOSHI, 2019; HUNG-TE HSU, 2018).

Durante a IR renal a inflamação parece desempenhar um papel importante em sua fisiopatologia. As respostas imunes inatas e adaptativas estão presentes na lesão isquêmica. O componente inato é responsável pela resposta precoce à lesão de uma forma não específica do antígeno e compreendem neutrófilos, monócitos/macrófagos e células *natural killers*. O componente adaptativo, ativado por antígenos específicos, é iniciado em poucas horas e dura ao longo de vários dias após a lesão (BOVENTRE e YANG, 2011).

Diante de tais considerações, é possível estabelecermos a hipótese de que a intervenção com um imunossupressor ou com um inibidor da NADPH oxidase preveniriam alterações do sistema renina-angiotensina e do transporte tubular de Na^+ dependente de ATP no túbulo proximal induzida pela isquemia e reperfusão.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Lesão renal aguda

A lesão renal aguda é caracterizada por uma diminuição súbita da taxa de filtração glomerular, manifestada por um aumento na concentração de creatinina. Esse tipo de lesão ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes hospitalizados, com complicações graves, incluindo sobrecarga de volume, distúrbios eletrólitos, complicações urêmicas e toxicidade medicamentosa (REQUIÃO-MOURA et al., 2015). Alguns pacientes com LRA têm resolução completa de sua lesão, mas em um subconjunto de pacientes a doença renal crônica (DRC) se desenvolve (FATTAH e VALLON, 2018).

A lesão renal aguda está associada à alta morbidade, mortalidade e custos de saúde. Apesar dos avanços tecnológicos na terapia de substituição renal, a LRA continua associada a resultados ruins. Considera-se que 1,7 milhão morrem anualmente por conta de LRA, sendo diabetes, hipertensão, fatores comportamentais e estilo de vida importantes fatores de risco. A incidência varia de acordo com as diferentes populações de pacientes, diferenças nos parâmetros usados para os critérios e tempo dos desfechos. Em um estudo de base populacional de LRA usando os critérios RIFLE, a incidência anual de LRA foi de 2.147 por milhão de habitantes (SAWHNEY, 2017; ALI et al., 2007). No que diz respeito à faixa etária, à mortalidade e número de internações em unidades de terapia intensiva varia de 2,5% em com idade inferior a 65 anos e 33,3% com idade superior ou igual a 65 anos. Sendo essa última faixa etária responsável por 10 vezes mais do número de internações em unidades de terapia intensiva, quando comparado a pessoas com menos de 65 anos de idade (BARALDI et al., 1998).

Além da diálise, nenhuma intervenção terapêutica melhora a sobrevida de forma confiável, limita a lesão ou acelera a recuperação (ZUK e BONVENTRE, 2016). Por muito tempo, a LRA foi considerada uma síndrome completamente reversível, entretanto, nos últimos anos, estudos demonstraram um aumento na indução de DRC e danos em órgãos não renais ocasionados pela LRA (STEVEN et al.; 2012).

Uma característica que define a LRA é a diminuição sustentada da função renal, que a leva retenção de nitrogênio (uréia e creatinina) e produtos não nitrogenados. Esses acúmulos podem ser acompanhados de distúrbios metabólicos (como a acidose metabólica

e hipercalemia), alterações no equilíbrio de fluidos e efeitos em outros sistemas, que irão depender da gravidade e duração da disfunção renal (SINGRI, AHJA e LEVI, 2003).

As causas de LRA podem ser divididas em três classes: pré-renal, intrínseca renal e pós-renal. A LRA pós-renal ocorre devido a uma obstrução no sistema urinário. Consequências importantes são a diurese e a presença de acidose tubular renal hipercalêmica (YARGER, 1992).

Na forma pré-renal, ocorre um aumento reversível dos níveis de creatinina sérica e de ureia no sangue, isso resulta da diminuição da perfusão renal, levando a uma redução na taxa de filtração glomerular (TFG). A integridade do tecido renal é preservada, e uma resposta fisiológica adequada à hipoperfusão renal é a redução do volume circulante efetivo, como baixo débito cardíaco, vasodilatação sistêmica, ou vasoconstrição intrarrenal (BLANTZ, 1998). O rim responde a alterações na pressão de perfusão renal, auto regulando o fluxo sanguíneo renal e a TFG dentro de limites bastante estreitos (LAMEIRE, VAN BIESEN e VANHOLDE, 2005).

A principal causa de LRA intrínseca ao rim é a necrose tubular aguda. Esse distúrbio é causado por lesão isquêmica ou nefrotóxica no rim, que pode resultar de vários insultos renais distintos (LAMEIRE, VAN BIESEN e VANHOLDE, 2005). Nas unidades de terapia intensiva, 35-50% dos casos de podem ser atribuídos à sepse (HOSTE et al., 2003). Várias classes de agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirais e anti neoplásicos são nefrotóxicos. Além disso, alguns agentes ambientais e drogas recreativas podem causar insuficiência renal aguda (DILLON, 2001; EVENEPOEL, 2004; BACH, 2001; TURNEY, 2001).

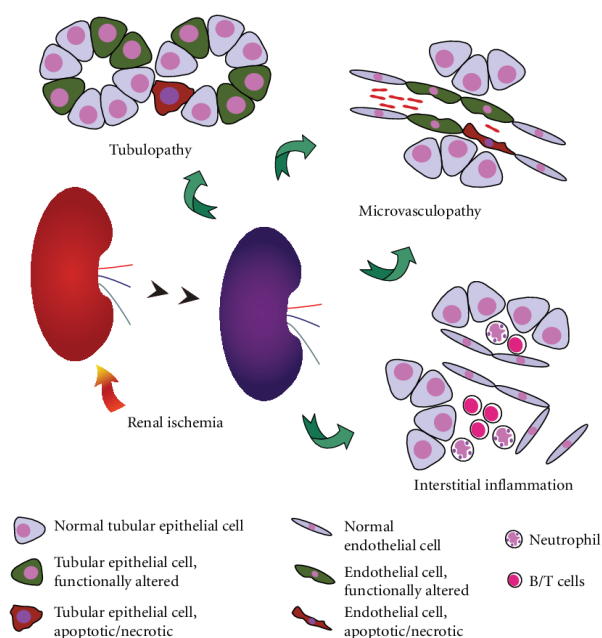
2.1.1. Isquemia/reperfusão

A lesão de isquemia/reperfusão (IR) é caracterizada pela restrição do suprimento sanguíneo para um órgão, seguida pela restauração do fluxo sanguíneo e re-oxigenação. As lesões podem ocorrer após o infarto, a sepse e o transplante de órgãos, e esse fenômeno agrava o dano tecidual ao iniciar uma cascata inflamatória, incluindo ativação de espécies reativas de oxigênio (ERO), citocinas, quimiocinas e leucócitos (JANG e RABB; 2009). Dessa forma, a IR ocasiona uma lesão às células epiteliais tubulares podendo levar à morte por apoptose e necrose, com comprometimento funcional dos órgãos (LE DORZE et al., 2009).

Em geral, 25% do débito cardíaco é direcionado para os rins. Por não possuir distribuição uniforme do fluxo sanguíneo, maior parte é direcionada para o córtex renal. Por outro lado, na medula externa, a troca de oxigênio em contracorrente leva a uma queda progressiva da pressão parcial do oxigênio (pO_2) do córtex para medula (BREZIS & ROSEN, 1995). Na isquemia renal, o fluxo sanguíneo renal diminui de 30-50%, com evidências de uma redução seletiva no suprimento sanguíneo para a medula externa (LAMEIRE, VAN BIESEN e VANHOLDE, 2005).

Os rins lesionados por isquemia manifestam uma variedade de deficiências funcionais, destacando-se o comprometimento da reabsorção tubular de solutos e água (HANLEY, 1980; JOHNSTON et al., 1984). Paralelamente às alterações funcionais, alterações estruturais distintas ocorrem predominantemente no túbulo proximal.

Figura 1. Lesão por isquemia-reperfusão renal



Fonte: Retirado de Patschan, Patschan & Müller, 2012.

2.2. Função tubular

A excreção urinária de cada substância é o resultado de três processos: sua filtração glomerular, sua reabsorção e secreção tubular. Os processos de reabsorção e secreção ocorrem ao longo dos segmentos dos túbulos. A formação de urina começa com a filtração de um volume próximo a 170 litros por 24 horas, cuja composição é muito próxima daquela

do plasma. A maioria das substâncias que devem a ser eliminados do corpo não são reabsorvidos (como a creatinina) ou mal reabsorvidas e secretadas (como algumas drogas) e, portanto, são excretado em grandes quantidades na urina. Por outro lado, eletrólitos, como sódio, cloro e íons bicarbonato são reabsorvidos fortemente (VANDER e SHERMAN, 1998; BLANCHARD et al., 2009).

Os rins representam o segundo maior consumo de oxigênio por peso seco de tecido, devido aos intensos processos de reabsorção e excreção que ocorrem nos túbulos renais. A homeostase dos fluidos é dependente da função renal, o que mantém constante mesmo com alterações de ingestão de solutos e água, devido aos mecanismos compensatórios de reabsorção e secreção (FERAILLE e EVA, 2016).

De maneira didática e esquemática, o túbulo se divide em três partes funcionais: o túbulo proximal, a alça de Henle e o néfron distal, que se estende desde o túbulo distal para o ducto coletor. O túbulo proximal renal é um epitélio de baixa resistência caracterizado por alta permeabilidade de íons e água, baixos gradientes osmóticos transepiteliais e transporte de fluido quase isotônico. As taxas de transporte ao longo do túbulo proximal diminuem a medida que se distanciam do glomérulo, e o mesmo se aplica às reduções no número de mitocôndrias e na extensão da membrana apical e basolateral (LIU e COGAN, 1986). Uma considerável parcela do filtrado glomerular é quase completamente reabsorvida (glicose e aminoácidos) ou predominantemente (fosfatos, 70%; bicarbonato, 85%) no túbulo proximal, sendo também o principal local de reabsorção de cálcio, reabsorção/secreção de ânions e cátions orgânicos, além de participar da reabsorção de magnésio. Finalmente, o tubo proximal é o local da atividade de endocitose de proteínas e intensa degradação lisossomal (CHRISTENSEN et al., 2003; BLANCHARD et al., 2009).

A reabsorção tubular proximal de sódio é uma função renal fundamental para manutenção do volume plasmático e da pressão arterial (ROOS et al., 1984). Cerca de 60%-70% da reabsorção total de Na^+ ocorre ao longo do túbulo convoluto proximal e túbulo reto proximal, e como a reabsorção é quase isotônica nesta parte do néfron, isso também é verdadeiro para a reabsorção de água (PALMER e SCHNERMANN, 2015).

O transporte ativo, a eletrodifusão e arrasto de solventes contribuem, cada um, com aproximadamente um terço para a reabsorção total de Na^+ no túbulo proximal. O trocador NHE3, responsável pelo transporte de Na^+ e H^+ , é um mecanismo reabsortivo de grande importância. Ele medeia a captação de NaHCO_3 , gerando um gradiente eletroquímico para

a absorção de NaCl paracelular (FRÖMTER et al., 1973). Contudo, esse transportador depende do gradiente de concentração gerado pelos transportadores de Na^+ basolaterais, sendo que a maioria dos gradientes químicos necessários para reabsorver e excretar solutos do filtrado glomerular bruto surgem da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ basolateral, que demandam dois terços ou mais da captação renal de oxigênio (EMMA et al; 2016; JORGENSEN et al., 2003; PALMER; SCHNERMANN, 2015).

Embora o transporte ativo primário de Na^+ tenha sido atribuído principalmente à bomba de Na^+ e K^+ , ele não é exclusivo. As bombas de Na^+ demonstraram ter dois mecanismos diferentes. A $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ que necessita de K^+ , sendo inibida por ouabaína e vanadato, e insensível à furosemida. Por outro lado, a $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$ que não requer K^+ , sendo insensível à ouabaína mas inibida por furosemida e vanadato, que demonstrou importância na regulação de volume isosmótico (del CASTILLO e ROBINSON, 1985; PROVERBIO e del CASTILLO, 1981; del CASTILLO e WHITTEMBURY, 1987).

Como característica comum, temos que ambas as enzimas podem ser fosforiladas de ATP ou Pi na presença de Mg^{2+} (del CASTILLO et al, 2005). Queiroz-Madeira e colaboradores (2010) demonstraram que, a atividade da $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$ insensível a ouabaína foi aumentada no túbulo proximal do rim de ratos espontaneamente hipertensos, sugerindo que essa enzima poderia estar envolvida no desenvolvimento de hipertensão arterial.

2.2.1. Aspectos da função tubular relacionados com fisiopatologia da LRA

No cenário clínico, a LRA e sua recuperação são definidas principalmente por alterações na taxa de filtração glomerular. Evidências crescentes sugerem que o sistema tubular, especificamente os túbulos proximais e o segmento espesso ascendente, pode desempenhar um papel importante não apenas no desenvolvimento de LRA, mas também na recuperação da função renal (FATTAH e VALLON, 2018).

A reabsorção tubular de sódio e água é alterada devido ao dano causado às células epiteliais dos túbulos renais, levando a danos estruturais e mudanças funcionais, sendo os túbulos proximais e o ramo ascendente medular externo os mais afetados por tais alterações. Como consequência de uma diminuição nos níveis de oxigênio durante a reperfusão, ocorre uma queda na produção de ATP. O córtex renal, por ser uma região que possui grande quantidade de proteínas dependentes de ATP, torna-se a região mais atingida do rim (GONG et al., 2004; BONVENTRE e ZUK, 2004).

Outras alterações podem ser percebidas nas células renais, como a perda de função celular, além de alterações na morfologia das células epiteliais. Adicionalmente, pode-se observar a perda de polaridade que é decorrente de alterações no citoesqueleto das células epiteliais, perda de complexos e moléculas de adesão nas junções laterais das células (BONVENTRE e ZUK, 2004). Com a perda de polaridade gerada por IR, ocorrem alterações importantes no transporte de íons. O principal transportador responsável pela reabsorção de Na^+ , a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, sofre mudança na função e localização. A $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, normalmente restrita às membranas basolaterais, é encontrada nas membranas apicais das células do túbulo proximal após breves períodos de isquemia. Além disso, foi demonstrado que o $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPase}$ pode ser detectada em compartimentos intracelulares após IR. Associada a esta redistribuição, durante a IR também ocorre uma redução da reabsorção transepitelial de Na^+ , que não é restaurada até que a polaridade celular normal seja restabelecida (MOLITORIS et al., 1992; SAMPAIO et al., 2018).

Após a lesão, a estrutura normal, altamente polarizada das células do túbulo proximal, é perdida (MOLITORIS et al., 1988). Dessa maneira, observa-se a localização incorreta de moléculas de adesão e outras proteínas de membrana, além de apoptose e necrose celular (BOVENTRE & WEINBERG, 2003). Com lesão grave, as células viáveis e não viáveis são descamadas, deixando regiões onde a membrana basal permanece a única barreira entre o filtrado e o interstício peritubular (ZUK, BONVENTRE e MATLIN, 2001).

Na lesão renal aguda, uma resposta inflamatória não controlada resulta numa disfunção epitelial tubular generalizada, que leva à uma redução na TFG. Esse processo pode ser explicado pela ativação do mecanismo de feedback tubuloglomerular. Uma diminuição da reabsorção de NaCl , devido à disfunção tubular, é detectada como um aumento no aporte de Na^+ e Cl^- nas células da mácula densa, localizadas no túbulo distal. A ativação do feedback tubuloglomerular culmina numa vasoconstrição generalizada da arteríola aferente e uma consequente queda da TFG, com diminuição da produção de urina e aumento de creatinina sérica (SINGH e OKUSA, 2011; FINK e DELUDE, 2005).

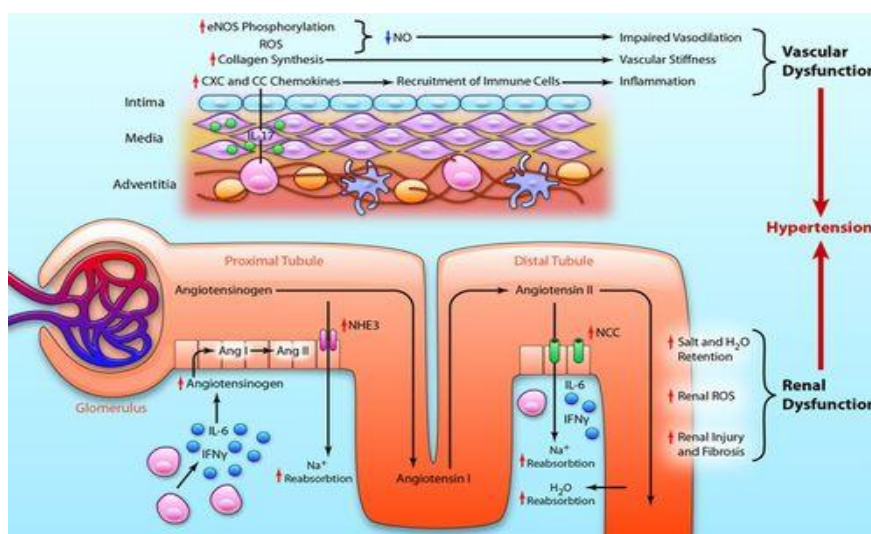
2.3. Sistema renina-angiotensina

A regulação do balanço corpóreo de Na^+ é fundamental para regulação do volume circulatório efetivo, definido pelo volume de sangue arterial. A diminuição da pressão

arterial efetiva resulta em estimulação fatores antinatriuréticos (sistema simpático e sistema renina-angiotensina-aldosterona) que estimulam a reabsorção tubular renal de NaCl e diminuem a excreção do Na^+ . O sistema renina-angiotensina (SRA) é uma cascata de sinalização hormonal que regula o fluido corporal e a homeostase da pressão arterial. Uma diminuição na perfusão renal estimula o SRA, que leva à consequente retenção renal de sódio e aumento do volume intravascular (GOLDEBLAT et al., 1934).

A angiotensina II é produzida pelo “SRA clássico” através da clivagem sequencial de substratos proteicos por proteases específicas. O fígado é a principal fonte de angiotensinogênio, o primeiro substrato do SRA, ele também é produzido em outros tecidos, como o rim. A renina é uma aspartil-protease que catalisa a clivagem do peptídeo de 10 aminoácidos, a angiotensina I, do terminal N da molécula de angiotensinogênio. Em uma reação sequencial, a enzima de conversão de angiotensina (ECA) dicarboxil-peptidase remove 2 aminoácidos do terminal C de angiotensina I para formar angiotensina II. As ações biológicas do SRA “clássico” são executadas através da ligação de alta afinidade da angiotensina II a receptores específicos. Esses receptores pertencem à grande família de receptores acoplados à proteína G e podem ser separados em duas classes farmacológicas, AT_1 e AT_2 , cada uma com funções distintas ligadas a vias de sinalização intracelulares específicas (SPARKS et al., 2014).

Figura 2. Ativação do sistema Renina-angiotensina intra-renal



Fonte: Retirado de Mc Master et al., 2015.

O mRNA de AT_1R é localizado em túbulos proximais convolutos e retos, ramos ascendentes espessos da alça de Henle, células do ducto coletor cortical e medular,

glomérulos, vasculatura arterial, vasos retos e células justaglomerulares. Estudos usando anticorpos policlonais e monoclonais para o AT₁R demonstraram que a proteína está presente nas células do músculo liso vascular em toda a vasculatura, incluindo as arteríolas aferentes e eferentes e células mesangiais. Além disso, AT₁R está presente na borda em escova do túbulo proximal e nas membranas basolaterais, epitélios de membros ascendentes espessos, túbulos distais, dutos coletores, podócitos glomerulares e células da mácula densa. Esses achados sugerem que o SRA intrarrenal funciona independentemente do SRA sistêmico. Os receptores AT₂R, por sua vez, são menos expressos em rins adultos. A análise de saturação da ligação específica de Ang II a diferentes células renais revelou predominância de AT₁R sobre AT₂R em células mesangiais, podócitos e células epiteliais tubulares proximais. Com a diferença funcional entre esses receptores, sua distribuição diferencial tem importante influência na fisiopatologia (LAI et al., 2004; WANG, FLANNERY e SPURNEY, 2003; CHAN et al., 2005).

O SRA exerce seu efeito na pressão arterial pela ação vasoconstritora de angiotensina II e pela estimulação do sistema nervoso simpático, que levam ao aumento da resistência vascular (IBRAHIM, 2006). Dessa forma, uma ativação inadequada do SRA leva à hipertensão e progressão da doença renal e cardiovascular. Nos rins, o AT₁R é o principal receptor que medeia a ação da angiotensina. Outros peptídeos, enzimas e receptores nesta cascata vêm recebendo maior visibilidade devido às contribuições independentes para a função renal, vascular e imunidade (CROWLEY; RUDEMILLER, 2017).

Os aumentos na Ang II plasmática exercem ações poderosas em todo o corpo por meio da ativação dos receptores AT₁, porém várias angiotensinases e peptidases são então capazes de metabolizar ainda mais a Ang II (REUDELHUBER, 2005). É reconhecido que vários dos peptídeos menores, incluindo Ang III, Ang IV e Ang-(1-7), têm atividade, mas seus níveis plasmáticos (exceto para Ang1-7) são muito mais baixos do que aqueles de Ang II (HAULICA et al., 2005; PENDERGRASS et al., 2006). Enquanto ECA gera Ang II a partir de Ang I, a ECA2 catalisa a conversão de Ang II em Ang 1-7 removendo o aminoácido C-terminal fenilalanina ácida. A ECA2 hidrolisa Ang II com alta eficiência catalítica, indicando que ECA e ECA2 possuem funções complementares. Ang 1-7 atua via receptor Mas acoplado à proteína G para induzir vasodilatação, efeitos antifibróticos, antiproliferativos e antiinflamatórios. Uma vez que a ECA2 contrabalança os efeitos vasoconstritores da Ang II, ela foi recentemente proposta como um biomarcador emergente

em pacientes com doença renal (ZHANG et al, 2001; COLUCCI et al., 2010; OKAZAK et al, 2007).

Estudos usando antagonistas do receptor AT1 e inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) indicaram que a ativação do SRA pode induzir a inflamação no rim e na vasculatura por meio de mecanismos independentes da pressão arterial. Experimentos usando camundongos com deleção genética da isoforma AT1 confirmaram amplamente que os efeitos pró-inflamatórios da ativação do SRA advêm da estimulação de receptores AT1 no órgão alvo (LEON e TANGRI, 2019). Os IECAs e os bloqueadores do receptor de angiotensina, mostraram reduzir a progressão de doença renal em vários estudos. Estes oferecem proteção cardiovascular e renal além daquelas resultantes após controle da pressão arterial, além de exercerem efeito renoprotetor e efeitos antiproteinúricos, sendo considerados agentes de primeira linha para DRC (ARORA et al., 2017; IBRAHIM, 2006).

Em pacientes humanos com DRC, a inibição do SRA limita a inflamação renal e o estresse oxidativo independentemente da pressão arterial. O bloqueio de linfócitos ou citocinas prolonga a sobrevivência e atenua o dano renal hipertensivo em modelos de ativação de SRA, por outro lado modelos de animais sem linfócitos parecem estar protegidos da hipertensão dependente de SRA e preservaram as respostas vasodilatadoras e natriurética (ARGAL, 2003; MULLER et al., 2002; GUZIK et al., 2007; CROWLEY ET AL., 2010).

2.4. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a taxa de produção e remoção de oxidantes. Dentre as espécies reativas de oxigênio mais importantes temos o ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. As espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são subprodutos do óxido nítrico (NO), que possui funções fisiológicas fundamentais, mas também podem contribuir para vários processos patológicos em níveis elevados, estas são compostas por nitrito, nitrato e peroxinitrito (PALIPOCH, 2013).

As substâncias oxidantes possuem átomos de oxigênio com elétrons desemparelhados, que são as espécies reativas de oxigênio. Nesse ciclo podem ser gerados

ânions superóxidos (O_2^-), radical hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroperoxila (O_2H) que são espécies reativas de oxigênio (ALZOGHAIBI, 2013).

O estresse oxidativo presente na fisiopatologia da IR (Chamorro, 2016), pode ser decorrente da produção excessiva de EROs, como também pela redução nas defesas antioxidantes ou até mesmo por uma elevação da produção de EROs e uma redução nas defesas antioxidantes simultaneamente (BARDAWEEL et al., 2018; ALZOGHAIBI, 2013). Esses fenômenos podem ocorrer nas células e nos tecidos sendo responsáveis pela regulação de atividades celulares fundamentais (Ranjbar, 2018; Rodríguez-Lara, 2016; Kovacic, 2015). O estresse oxidativo contribui para a apoptose e morte celular (Kurian G. A, 2016; BONVENTRE, 1993; (ADIBHATLA, 2006). Outras vias pelas quais o estresse oxidativo pode surgir é a via da xantina oxidase por deficiência de ATP, re-oxigenação, pela via da NADPH oxidase, como também por aumento de óxido nítrico que pode reagir com espécies reativas de oxigênio produzindo peroxinitrito causando assim lesão tecidual (Yamamoto, 2017).

O estresse oxidativo torna-se um fator comum de várias doenças como: isquemia, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e envelhecimento (SALMON et al., 2010). O estresse oxidativo, presente na fisiopatologia da IR, é decorrente da produção excessiva de ROS, que levam a diversas alterações, dentre elas: depleção de ATP, alteração da fosforilação oxidativa mitocondrial, aumento do cálcio intracelular e ativação das proteases de fosfolipídios da membrana (BONVENTRE, 1993). Durante a reperfusão, o restabelecimento do fluxo sanguíneo pode produzir radicais livres de oxigênio, dessa forma, torna a peroxidação lipídica a principal via de lesões, que contribui para a apoptose e morte celular (KEHRER, 1993).

Durante a reperfusão, o restabelecimento do fluxo sanguíneo inicia-se com uma série de alterações deletérias nas células, resultando em inflamação, morte celular e insuficiência orgânica a ativação da produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio alterando várias estruturas inclusive as mitocôndrias (BONVENTRE, 1993; RODRÍGUEZ-LARA, 2016), sendo a principal fonte de estresse oxidativo após um evento de isquemia e reperfusão (MALEK, 2015). Enfatizando o papel da mitocôndria Chouchani (2016) revelou que succinato, um ácido cítrico e molécula intermediária de ciclo na mitocôndria, apresentou-se elevado nos tecidos isquêmicos e o aumento desses níveis são responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial durante a

reperusão. Dessa forma, a peroxidação lipídica causa danos celulares por meio da sua ação em ácidos graxos insaturados que estão nas membranas, bem como quebra de DNA, danifica a estrutura e função das proteínas e dos ácidos nucléicos. Surgindo como uma das principais via de lesões (GUO, 2019; AYALA, 2014; ALZOGHAIBI, 2013; LI e JACKSON, 2002; BONVENTRE, 1993).

Para manter o equilíbrio entre a produção de EROs, as moléculas antioxidantes são as responsáveis pela doação de elétrons, com o intuito de combater a formação em demasia de EROs, para que haja um equilíbrio esse sistema de defesa, atuando na eliminação das EROs ou impedindo que se transformem em substâncias mais tóxicas para o organismo. As vias antioxidantes podem ser enzimáticas, que são as produzidas pelo organismo (SOD, catalase e GPx) e não enzimáticas, que pode ser de origem endógena ou proveniente da dieta (GSH, flavonóides, vitaminas, minerais, entre outros). A inibição do estresse oxidativo com o antioxidante melatonina atenuou a LRA causada pela isquemia em ratos diabéticos, melhorando a apoptose e o estresse oxidativo através da sinalização do SIRT1/Nrf2/HO-1 (SI SHI, 2019). Também no tecido renal a IR levou ao aumento dos níveis de malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, e o tratamento com células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo reduz esses níveis, o dano tecidual e o estresse oxidativo, aumentando a atividade antioxidante e melhorando a função renal (HAFAZEH, 2019). Recentemente Fatih Kar e colaboradores (2020) verificaram uma elevação de MDA, e redução das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione (GSH), sendo o ácido bórico capaz de reverter essas ações causadas pela IR renal.

Estudos anteriores também demonstraram que em outros tecidos também ocorrem alterações nos indicadores de estresse oxidativo e nas enzimas antioxidantes. Em dez minutos de isquemia cerebral seguidos por 24 horas de reperusão houve um aumento de peroxidação lipídica, ânion superóxido e redução da glutathione reduzida, onde a suplementação com vitamina D3 reverteu esses resultados (MILICA VELIMIROVIC, 2018). Resultados também encontrados em um modelo de IR do tecido cardíaco onde constatou-se um aumento da expressão de MDA, e redução das enzimas antioxidantes (SHENGZHONG LIU, 2019).

O mecanismo fundamental de estresse oxidativo dos túbulos renais na fase de isquemia ocorre inicialmente pela depleção de ATP que através da ativação das caspases,

fosfolipases e aumento do cálcio intracelular, causam a morte celular (RODRÍGUEZ-LARA, 2016; KOVACIC, 2015; KEZIC, 2016; PARADIS, 2016; DEVARAJAN P. 2006; BONVENTRE, 1993). A isquemia prolongada seguida de reperfusão reduz a ativação de apoptose celular por necrose, porém causa lesão oxidativa e modificações proteicas, principalmente pela via da hipoxantina. Já o superóxido reage com óxido nítrico formando peroxinitrito que através da nitrosilação e nitração de proteínas e sua capacidade de oxidação, causa danos nas células (DAVARAJAN, 2006).

Entre as funções fisiológicas do NADPH oxidase (NOX) estão a defesa contra microrganismos, sinalização celular, regulação da expressão gênica e diferenciação celular, regulação do fluxo sanguíneo (GRANGER, 2015; ASABA et al., 2005), entretanto podem ser mediadores críticos de estudos de doenças quando ocorre uma elevação na sua atividade (ASABA et al., 2005). A NOX exerce função na produção de espécies reativas de oxigênio, lesionando células e tecidos, iniciando assim uma cascata de sinalização danosa no organismo (RASTOGI, 2017; BRITO, 2015; SUNIL JOSHI, 2019; HUNG-TE HSU, 2018).

Alguns fatores influenciam a produção de ERO nos rins que pode ser aumentada por meio da ativação do complexo NADPH oxidase com a influência de alguns fatores, como a IR, a ativação do receptor AT1 pela angiotensina II, a hiperglicemia e o TGF- β (Cifuentes-Pagano, 2014; JHA et al., 2016). Desse modo, a inibição da NOX torna-se um tratamento terapêutico promissor para diversas doenças (RASTOGI, 2017, BRITO, 2015, SUNIL JOSHI, 2019; HUNG-TE HSU, 2018).

A ativação da NADPH oxidase está relacionada com disfunções vasculares e renais em um modelo de programação intra uterina (VIEIRA-FILHO et al., 2018). Lesões no sistema vascular podem ter início com alterações no equilíbrio oxidativo, estando a NOX como a principal fonte de espécies reativas de oxigênio na parede do vaso e possivelmente desempenha um papel fundamental na origem de doenças causadas pela aterosclerose (BRYK, 2017). É descrita uma regulação positiva da NOX2 e NOX4 em ratos hiperglicêmicos após IR cerebral, e o tratamento com o inibidor da NOX conseguiu prevenir os danos causados pela reperfusão (YONG-HUA TUO, 2017).

A apocinina é um inibidor da atividade da NADPH oxidase, capaz de reduzir o nível de superóxido e eficaz na prevenção da produção do superóxido em leucócitos

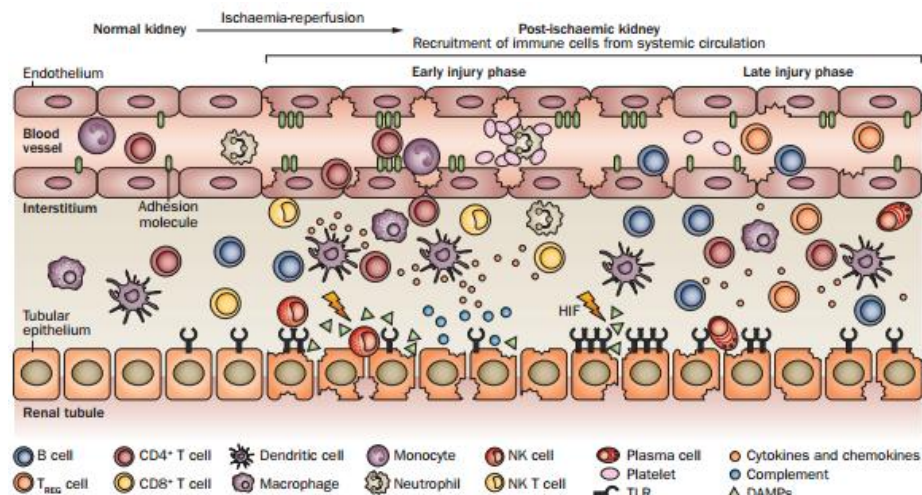
humanos em disfunção associada à hipóxia (SLEPCHENKO, 2016). Foi visto que a apocinina possui propriedades antioxidantes e citoprotetoras em vários modelos de lesão de IR, incluindo IR renal e cerebral (CHOI et al., 2015; ROMANINI et al., 2015). Recentemente foi demonstrado também que a apocinina é capaz de aumentar significativamente os níveis dos fatores anti-inflamatórios IL-4 e IL-10 e diminuir os níveis dos fatores inflamatórios IL-6 e TNF- α no tecido renal. Esse inibidor atua predominantemente como antioxidante nas células endoteliais e nas células do músculo liso vascular e exerce um efeito clínico significativo em asmáticos leves associado a uma ação anti-inflamatória. O mecanismo pelo qual isso ocorre não é totalmente conhecido (HU et al, 2017).

2.5. Sistema imune e inflamação

Estudos demonstram uma estreita ligação entre o sistema imune e o sistema renal. Os rins contribuem para a homeostase do sistema imunológico removendo citocinas e toxinas bacterianas circulantes (TECKLENBORG et al., 2018). Padrões moleculares pró-inflamatórios associados a danos (DAMPs), padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), receptores toll-like (TLRs), estresse oxidativo, fator induzível por hipóxia (HIF), sistema complemento, moléculas de adesão, morte celular, renal residente células dendríticas (DCs), neutrófilos, linfócitos T e B, macrófagos, células T natural killer (NKT), citocinas secretadas e quimiocinas participam da fisiopatologia da LRA. (RADI, 2018).

As lesões da isquemia e reperfusão são iniciadas pela produção de espécies reativas de oxigênio que ativam mecanismos adicionais de injúria através da ativação do sistema imune. As respostas imunes inatas e adaptativas estão presentes na lesão isquêmica. O componente inato é responsável pela resposta precoce à lesão de uma forma não específica do antígeno e compreendem neutrófilos, monócitos/macrófagos e células *natural-killers* (BOVENTRE e YANG, 2011). A ativação dos TLRs leva à ativação de vias de sinalização, incluindo NF- κ B, proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e vias de interferon tipo I, resultando na indução de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (CHEN e NUNEZ, 2010).

Figura 3. Mecanismo de ativação do sistema imune na isquemia-reperfusão renal



Fonte: Retirado de Jeong-Hyeok, 2014.

Os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) são normalmente “sequestrados” intracelularmente e após lesão tecidual, são liberados no compartimento extracelular, onde podem ativar uma resposta imune (MC DONALD et al., 2010). Citocinas pró-inflamatórias e citocinas como interleucina 6 (IL-6) e TNF- α desempenham papel importante na disfunção renal da IR (PATEL et al.; 2005; VOSS, BODE e KERKHOFF; 2012).

O componente adaptativo, ativado por antígenos específicos, é iniciado em poucas horas e dura ao longo de vários dias após a lesão. A resposta adaptativa inclui maturação das células dendríticas, apresentação de antígenos, proliferação e ativação de linfócitos T e interações de linfócitos T com B (BOVENTRE e YANG, 2011). Os mecanismos pelos quais as células T são ativadas durante a inflamação não são bem compreendidos, mas evidências indicam uma contribuição de mecanismos de ativação específicos e independentes do antígeno (STAPUT et al., 2009). Vários estudos mostraram que as células T CD4⁺ e CD8⁺ têm um papel prejudicial e que se acumulam durante isquemia e reperfusão (DAY et al., 2006).

Particularmente durante a fase inicial da reperfusão, as células imunes inatas dominam a composição celular dos filtrados. A proteção proporcionada pelas células dendríticas depende da produção da citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10), resultando em níveis atenuados do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-6 e espécies

reativas de oxigênio (ELTZSCHIG e ECKLE, 2011). Na reperfusão, as células endoteliais iniciadas por isquemia são propensas à adesão de leucócitos e plaquetas, aumentando ainda mais a permeabilidade das células endoteliais e a ativação celular. Os leucócitos aderentes também liberam espécies reativas de oxigênio e uma variedade de citocinas, aumentando a reação inflamatória. Subsequentemente, os leucócitos transmigram e entram no espaço subendotelial. Essa cascata inicial de eventos tem um efeito profundo na função inicial do enxerto (BOROS e BROMBERG, 2006). Praticamente todas as células do sistema imunológico têm sido implicadas nesses processos fisiopatológicos de LRA, podendo ter papel deletério (como, neutrófilos, monócitos e células dendríticas), ou protetor (como as células T reguladoras) (KINSEY e OKUSA, 2012). Existem também algumas células circulantes cujo papel varia dependendo da fase do processo da doença, como os macrófagos (MOLITORIS, 2014).

Alguns mediadores inflamatórios, também parecem estar envolvidos na patogênese da IR. Uma interação entre os eicosanóides e a geração de óxido nítrico foi recentemente sugerida (WEIGHT et al., 2001). Um relação direta foi demonstrada entre um alto índice de prostaciclina (PGI₂) e tromboxano A₂ (TxA₂) e a preservação da função renal após isquemia. Seguindo o mesmo raciocínio, foi observado que o precursor do NO (L-arginina) e a prostaglandina E₁ (PGE₁) demonstram um efeito nefroprotetor na lesão por IR (LELCUK et al., 1985; MAHMOUD et al., 2007).

Chatterjee e colaboradores demonstraram que a IR renal resulta na ativação da NF- κ B e na subsequente expressão de genes pró-inflamatórios, especificamente, expressão renal do iNOS e ICAM-1, que dependem da ativação do NF- κ B, e pela primeira vez in vivo, que 15-Deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂ atenua a ativação do NF- κ B e a subsequente expressão de genes alvos.

O óxido nítrico exerce um duplo papel fisiológico na insuficiência renal aguda isquêmica (GOLIGORSKY e NOIRI, 1999). O NO em baixas concentrações é considerado renoprotetor contra a isquemia renal devido a suas propriedades vasodilatadoras, antioxidantes e anti-inflamatórias, além de seus efeitos benéficos na sinalização celular e inibição de proteínas nucleares (PHILIPS et al., 2009). A IR renal ativa o óxido nítrico sintase (NOS) e aumenta a expressão das proteínas NOS (VINÃS et al., 2006). Existem três isoformas diferentes da NOS: a NOS endotelial (eNOS) e a NOS neuronal (nNOS), que produzem NO em baixas concentrações para fins fisiológicos, enquanto a forma indutível

de NOS (iNOS) produz NO em altas concentrações. Foi sugerido que o NO produzido pelo iNOS é um agente tóxico, enquanto o eNOS é visto como uma enzima protetora (CHANG et al., 2002). O NO produzido nos túbulos renais proximais em resposta à lesão isquêmica é mediado pela iNOS (PERESLENI et al., 1996). A eliminação do óxido nítrico produz peroxinitrito, o que causa dano tubular durante a isquemia (VINÃS et al., 2001). Além disso, a própria isquemia pode fornecer disfunção endotelial e perturbar a formação da forma endotelial de NO da eNOS (MILSON et al., 2010).

A fase de melhora da LRA é caracterizada pela recuperação da função renal e substituição dos túbulos danificados (FERENBACH et al 2016). Os monócitos substituem os neutrófilos como o principal leucócito infiltrante e concomitantemente passam por uma mudança fenotípica de M1 (pró-inflamatório) para M2 (pró-reparo) (LEE et al 2011).

O ânion nitrito, um produto final do metabolismo do NO, nas condições de hipóxia e isquemia, é convertido em NO pelas enzimas NOS e xantina oxidase (MILLAR et al., 1998). Assim, o nitrito armazenado durante a normóxia e convertido em NO em condições de hipóxia pode ser considerado um tampão de NO. Vários relatórios recentes demonstraram citoproteção mediada por NO e nitrito em modelos de IR. Além da citoproteção dependente de NO, o nitrito pode atuar por via independente (TRIPATARA et al., 2007).

Um importante mecanismo para as lesões nas células tubulares é através da exposição direta com substâncias no filtrado. O parênquima renal torna-se vulnerável à resposta pró-inflamatória subsequente dano ao tecido renal, pois o sangue rico em toxinas, PAMPs, DAMPs e mediadores pró-inflamatórios ganham acesso ao parênquima renal e seus vários compartimentos por meio de filtração glomerular ou pela microcirculação do capilar peritubular (GOMEZ et al., 2014; MARTENSON E BELLOMO, 2016) A partir daí, a lesão de células tubulares se manifestará em mudanças estruturais incluindo: bolha de membrana apical, abertura de *tight junctions*, perda de polaridade, descolamento de células da membrana basal e inchaço celular (OSTERMAN e LIU, 2017).

Em seu extremo, a lesão celular tubular resultará em morte celular por meio de uma série de mecanismos, incluindo necrose e apoptose, que podem levar à morte celular. Thurman e colaboradores (2013) demonstraram, em camundongos com lesão de IR, que a

deposição C3 do sistema complemento foi observada no tecido tubulointersticial, além de infiltração de neutrófilos na medula externa.

O micofenolato de moefetila (MMF), um pró-medicação do agente ativo ácido micofenólico, inibe reversivelmente a atividade da inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), uma enzima que promove a conversão do inosina monofosfato (IMP) em guanina monofosfato (GMP), o principal precursor do DNA nucleotídeo guanina (ALLISON, EUGUI e SOLLINGER, 1993). Dessa forma, inibindo a síntese de DNA, limita a produção de novo de nucleotídeos de purina, impedindo finalmente que as células T proliferem através da divisão celular. Quando combinado com outros agentes direcionados à ativação do receptor de células T, como inibidores da calcineurina, isso pode levar à supressão generalizada de células T, auxiliando na prevenção de rejeição aguda no transplante de órgãos sólidos (MARIPURI e KASISKE, 2014).

A IR renal desencadeia uma cascata inflamatória envolvida em mais danos renais, dessa forma a inibição das respostas inflamatórias é uma abordagem terapêutica para proteger o tecido renal (JANG et al.; 2009). Estudos demonstraram que o MMF, administrado durante a fase de reparo da IR renal, modifica lesão tubular, proliferação e tráfico de linfócitos e produção de citocinas. Esses efeitos devem-se em grande parte à modulação das células T por MMF, e Foxp3 + Tregs (GANDOLFO et al., 2010).

JUSTIFICATIVA

As elevadas taxas de doenças não comunicáveis, dentre elas as cardiovasculares e renais, são um fator preocupante e de suma importância para saúde pública. Um dos principais fatores de risco para hipertensão arterial é a doença renal crônica, que pode ser estabelecida após eventos agudos que promovam a injúria do tecido renal. A isquemia e reperfusão tem sido amplamente reconhecida como uma fonte importante de danos e consequências deletérias para diversos órgãos, sendo descrita na literatura em várias condições clínicas tais como o infarto do miocárdio e isquemia cerebral. No rim, a isquemia-reperfusão está atrelada a lesão renal aguda e ao aumento da susceptibilidade do paciente ao desenvolvimento de doença renal crônica. A LRA está correlacionada com disfunção das ATPases transportadoras de Na⁺ do túbulo proximal, através de vias que envolvem a ativação da NADPH oxidase e da xantina oxidase. Além disso, já é bem

descrito essas vias oxidativas são moduladas pelo sistema imune, que também apresenta uma importante modulação sobre a função renal em condições patológicas.

Dessa forma, é possível que as alterações no transporte de sódio, e nas vias oxidativas dependentes da NADPH oxidase, sejam, pelo menos parcialmente, dependentes da ativação do sistema imune. Diante do exposto, torna-se necessário avaliar a contribuição do sistema imune para o surgimento das alterações do transporte de Na^+ no túbulo proximal presentes na lesão renal aguda induzida por isquemia e reperfusão. O conhecimento dessas vias fisiopatológicas pode colaborar com o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais precisas e eficazes na recuperação da lesão renal aguda e na prevenção do desenvolvimento da doença renal crônica.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar em ratos Wistar a contribuição do sistema imune e do estresse oxidativo para o surgimento das alterações do transporte de Na^+ no túbulo proximal observadas na lesão renal aguda induzida por isquemia-reperfusão.

3.2. Específicos

Investigar em ratos Wistar após 24 horas de indução de lesão renal aguda por isquemia e reperfusão, na presença e na ausência de tratamento prévio com micofenolato de mofetila (imunossupressor) e apocinina (inibidor da NADPH oxidase):

- Marcadores de função renal (depuração de creatinina, concentração sérica de ureia e proteinúria);
- Atividade da Na^+/K^+ -ATPase sensível à ouabaína em frações de membrana do córtex renal;
- Atividade da Na^+ -ATPase sensível à furosemida em frações de membrana do córtex renal;
- Expressão renal de RNAm para angiotensinogênio, ECA, ECA2, AT1aR e AT2R;
- Produção basal de superóxido e atividade da NADPH oxidase no córtex renal;
- Níveis de nitrato/nitrito no plasma.

4. REFERÊNCIAS

- ADIBHATLA, Rao Muralikrishna; HATCHER, J. F. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 3, p. 376-387, 2006.
- AGARWAL, R. Proinflammatory effects of oxidative stress in chronic kidney disease: Role of additional angiotensin II blockade. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 284, p. F863–F869, 2003.
- ALI, T. et al. Incidência e resultados em lesão renal aguda: um estudo abrangente de base populacional. **J Am Soc Nephrol**, v.18, n. 4, p.1292–8, 2007.
- ALLISON, A.C. et al. Mycophenolate mofetil (RS-61443): Mechanisms of action and effects in transplantation. **Transplant Rev**, v.7, p. 129-39, 1993.
- ALZOGHAIBI, Mohammed A. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, v. 19, n. 39, p. 6540, 2013.
- ARORA, P. et al. Prevalence estimates of chronic kidney disease in Canada: results of a nationally representative survey. **CMAJ**; v. 185, p. E417-23, 2013.
- ASABA, Kensuke et al. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. **Kidney international**, v. 67, n. 5, p. 1890-1898, 2005.
- AYALA, Antonio; MUÑOZ, Mario F.; ARGÜELLES, Sandro. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.
- BACH, P. H. Acute renal failure associated with occupational and environmental settings. **Acute renal failure: a companion to Brenner and Rector's the kidney, 1st edn. Philadelphia: WB Saunders**, p. 414-24, 2001.
- BARDAWEEL, Sanaa K. et al. Reactive oxygen species: the dual role in physiological and pathological conditions of the human body. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 50, n. 3, p. 193, 2018.
- BLANCHARD, A.; POUSSOU, R.; HOUILLIER, P. Exploration des fonctions tubulaires rénales. **Néphrologie & Thérapeutique**, v.5, n. 1, p. 68–83, 2009.
- BLANTZ, R.C. Pathophysiology of pre-renal azotemia. **Kidney Int**, v. 53, p. 512–23, 1998.
- BOROS, P.; BROMBERG J.S. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. **Am J Transplant**, v. 6, n. 4, p. 652- 658, 2006.
- BONVENTRE, J.V. Mechanisms of ischemic acute renal failure. **Kidney Int**, v. 43, p. 1160–78, 1993.
- BONVENTRE, J.V.; ZUK, A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease?. **Kidney international**, v. 66, n. 2, p. 480-5, 2004.

BONVENTRE, J.V.; WEINBERG J.M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, p. 2199–210, 2003.

BONVENTRE J.V.; YANG L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **J Clin Invest**, 2 v. 121, n. 11, p. 4210- 4221, 2011.

BOVEE, K.C. Renal Function and Laboratory Evaluation. **Toxicologic Pathology**, v.14, n.1, p. 26–36. 1986.

BREZIS M.; ROSEN, S. Hypoxia of the renal medulla—its implications for disease. **N Engl J Med**, v. 332, p.647–55, 1995.

BRITO R, CASTILLO G, GONZALEZ J, VALLS N, RODRIGO R. Oxidative stress in hypertension: mechanisms and therapeutic opportunities. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes** 123(6), 325–335 (2015).

BRYK, Dorota; OLEJARZ, Wioletta; ZAPOLSKA-DOWNAR, Danuta. Rola stresu oksydacyjnego i oksydazy NADPH w patogenezie miażdżycy. **Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej**, v. 71, 2017.

CHATTERJEE, Prabal Kumar et al. The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 ameliorates ischemic acute renal failure. **Cardiovascular Research**, v. 61, n. 3, p. 630-643, 2004.

CASTILLO J.R. et al. Phosphorylated intermediate of the Na⁺-ATPase associated with the second sodium pump. **FEBS J**, v. 272, p. S1–S188, 2005.

CHAN, Loretta YY et al. Tubular expression of angiotensin II receptors and their regulation in IgA nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 8, p. 2306-2317, 2005.

CHANG, B. et al. Nitric oxide in obstructive uropathy: role of endothelial nitric oxide synthase. **J Urol**, v. 168, p. 1801-4, 2002.

CHATTERJEE, Prabal Kumar et al. The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 ameliorates ischemic acute renal failure. **Cardiovascular Research**, v. 61, n. 3, p. 630-643, 2004.

CHEN, G.Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat. Rev. Immunol**, v. 10, p. 826–837, 2010.

CHOI, E.K. et al. Effects of allopurinol and apocynin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Transplant Proc**, v. 47, n.6, p. 1633–1638, 2015.

CHRISTENSEN, E. et al. Loss of chloride channel ClC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 8472-7, 2003.

CHOUCHANI ET, PELL VR, JAMES AM, WORK LM, SAEB-PARSY K, FREZZA C, KRIEG T, MURPHY MP. A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury. **Cell Metab**, v.23, n.2, p.254–263, 2016.

COLUCCI, Juliana Almada et al. Renin-angiotensin system may trigger kidney damage in NOD mice. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 12, n. 1, p. 15-22, 2011.

CROWLEY S.D.; RUDEMILLER, N.P. Immunologic Effects of the Renin-Angiotensin System. **J Am Soc Nephrol**, v. 28, n. 5, p. 1350-1361, 2017.

CROWLEY, S.D. et al. Lymphocyte responses exacerbate angiotensin II-dependent hypertension. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, p. R1089–R1097, 2010.

CIFUENTES-PAGANO E, MEIJLES DN, PAGANO PJ. The quest for selective Nox inhibitors and therapeutics: challenges, triumphs and pitfalls. **Antioxid. Redox. Signal.** v.20, n.17, p.2741–2754, 2014.

DAY, Y. J. et al. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: the role of CD4⁺ T cells and IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 3108-3114, 2006.

DILLON, J.J. Nephrotoxicity from antibacterial, antifungal, and antiviral drugs. In: Molitoris BA, Finn WF, eds. Acute renal failure: a companion to Brenner and Rector's the kidney, **WB Saunders**, v.1, p. 349–64, 2001.

ELTZSCHIG, H.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. **Nat Med**, v. 17, p. 1391–1401, 2011.

EMMA, F. Disfunção mitocondrial na doença renal herdada e lesão renal aguda. **Nat Rev Nephrol**, v. 12, p.267-280, 2016.

EVENEPOEL, P. Acute toxic renal failure. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, p. 37–52, 2004.

FERAILLE, E.; DIZIN, E. Coordinated Control of ENaC and Na⁺,K⁺-ATPase in Renal Collecting DuctJ. **Am Soc Nephrol**, v. 27, p. 2554–2563, 2016.

FATTAH, H.; VALLON, V. Tubular Recovery após Acute Kidney Injury. **Nephron**, v. 140, n. 2, p. 140-143, 2018.

FERENBACH, D.A.; BONVENTRE, J.V. Acute kidney injury and chronic kidney disease: From the laboratory to the clinic. **Nephrol. Ther**, v.12, p.S41-S48, 2016.

FINK, M.P.; DELUDE, R.L. Epithelial barriers dysfunction: a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at a cellular level. **Crit Care Clin**, v. 21, p. 177–196, 2005.

FRÖMTER, E.; RUMRICH, G.; ULLRICH, K.J. Phenomenologic description of Na⁺, Cl⁻ and HCO₃⁻ absorption from proximal tubules of rat kidney. **Pflugers Arch**, p.343, v. 189–220, 1973.

FURUICHI, K. et al. Role of cytokines and chemokines in renal ischemia-reperfusion injury. **Drug News Perspect**, v. 15, p. 477–82, 2002.

GANDOLFO, M.T. et al. Mycophenolate mofetil modifies kidney tubular injury and Foxp3⁺ regulatory T cell trafficking during recovery from experimental ischemia–reperfusion. **Transplant Immunology**, v. 23, n. 1-2, p. 45–52, 2010.

GOLDBLATT, H. et al. Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **Journal of experimental**, v. 59, p. 347–379, 1934.

GOMEZ, H., et al. UA unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics and adaptation of tubular cells to the injury. **Shock**, v. 41, p. 3-11, 2004.

GOLIGORSKY, M.S.; NOIRI, E. Duality of nitric oxide in acute renal injury. **Semin Nephrol**, v. 19, p. 263–71, 1999.

GONG, Hong et al. EPO and α -MSH prevent ischemia/reperfusion-induced down-regulation of AQPs and sodium transporters in rat kidney. **Kidney international**, v. 66, n. 2, p. 683-695, 2004.

GRANGER, D. Neil; KVIETYS, Peter R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. **Redox biology**, v. 6, p. 524-551, 2015.

GUZIK, T.J. et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. **J Exp Med**, v. 204, p. 2449–2460, 2007.

GUO, Minmin et al. Biochanin A provides neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by Nrf2-mediated inhibition of oxidative stress and inflammation signaling pathway in rats. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 25, p. 8975, 2019.

HAULICA, Ion; BILD, Walther; SERBAN, Dragomir N. Angiotensin peptides and their pleiotropic actions. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 6, n. 3, p. 121-131, 2005.

HOSTE, E.A. et al. Acute renal failure in patients with sepsis in a surgical ICU: predictive factors, incidence, comorbidity, and outcome. **J Am Soc Nephrol**, 2v. 14, p. 1022–30, 2003.

HU, B. et al. Apocynin alleviates renal ischemia/reperfusion injury through regulating the level of zinc and metallothionein. **Biol Trace Elem Res**, v. 178, p. 71-78, 2017.

HSU, Hung-Te et al. Resveratrol prevents nanoparticles-induced inflammation and oxidative stress via downregulation of PKC- α and NADPH oxidase in lung epithelial A549 cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-13, 2018.

IBRAHIM, M.M. RAS inhibition in hypertension. **J Hum Hypertens**, v. 20, p. 101-8, 2006.

IM, Jeong-Hyeok et al. Growth of CH₃NH₃PbI₃ cuboids with controlled size for high-efficiency perovskite solar cells. **Nature nanotechnology**, v. 9, n. 11, p. 927-932, 2014.

JANG, H.R.; RABB, H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. **Clin Immunol**, v. 130, n. 1, p.41-50, 2009.

JANG, H.R. et al. The interaction between ischemia–reperfusion and immune responses in the kidney. **J Mol Med**, v. 87, p. 859–64, 2009.

JHA, Aashish R. et al. Shared genetic signals of hypoxia adaptation in *Drosophila* and in high-altitude human populations. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 2, p. 501-517, 2016.

JOSHI, Sunil; KHAN, Saeed R. NADPH oxidase: a therapeutic target for hyperoxaluria-induced oxidative stress—an update. **Future Science**. 2019.

KEHRER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Crit Rev Toxicol**, v. 23, p. 21–48, 1993.

KOVACIC, Peter; SOMANATHAN, Ratnasamy; Z ABADJIAN, Marie-Caline. Natural monophenols as therapeutics, antioxidants and toxins; electron transfer, radicals and oxidative stress. **The Natural Products Journal**, v. 5, n. 3, p. 142-151, 2015.

KOZA, Y. Acute kidney injury: current concepts and new insights. **J Inj Violence Res**, v. 8, n. 1, p. 58-62, 2016.

KURIAN, Gino A. et al. The role of oxidative stress in myocardial ischemia and reperfusion injury and remodeling: revisited. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

KOVACIC, Peter; SOMANATHAN, Ratnasamy; Z ABADJIAN, Marie-Caline. Natural monophenols as therapeutics, antioxidants and toxins; electron transfer, radicals and oxidative stress. **The Natural Products Journal**, v. 5, n. 3, p. 142-151, 2015.

KEZIC, Aleksandra et al. Mitochondria-targeted antioxidants: future perspectives in kidney ischemia reperfusion injury. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

KURIAN, Gino A. et al. The role of oxidative stress in myocardial ischemia and reperfusion injury and remodeling: revisited. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

LAI, Kar Neng et al. Mesangial expression of angiotensin II receptor in IgA nephropathy and its regulation by polymeric IgA1. **Kidney international**, v. 66, n. 4, p. 1403-1416, 2004.

LAMIERE, N.; VAN BIESEN, W.; VANHOLDER, R. Acute renal failure. **The Lancet**, v. 365, n. 9457, p. 417–430, 2005.

LEE, S. et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 22, n. 2, p. 317-326, 2011.

LE DORZE, Matthieu et al. The role of the microcirculation in acute kidney injury. **Current opinion in critical care**, v. 15, n. 6, p. 503-508, 2009.

LELCUK, S. et al. Prostacyclin and thromboxane A2 moderate postischemic renal failure. **Surgery**, v. 98, p. 207, 1985.

LEON, S.J.; TANGRI, N. The use of renin–angiotensin–inhibitors in patients with chronic kidney disease. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 35, n. 9, p. 1220-1227, 2019.

LI, Chuanyu; JACKSON, Robert M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 2002.

LIU, F.Y.; COGAN, M.G. Axial heterogeneity of bicarbonate, chloride, and water transport in the rat proximal convoluted tubule. Effects of change in luminal flow rate and of alkalemia. **J Clin Invest**, v. 78, n. 6, p. 1547-57, 1986.

LIU, Shengzhong et al. Allicin Attenuates Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Rats by Inhibition of Inflammation and Oxidative Stress. In: **Transplantation proceedings**. Elsevier, 2019. p. 2060-2065.

MAHMOUD, I.M. et al. Role of combined L-arginine and prostaglandin E1 in renal ischemia-reperfusion injury. **Nephron physiology**, v. 105, n. 4, p. p57-p65, 2007.

MALEK, M.; MEHDI, N. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. **Journal of renal injury prevention**, vol. 4, n. 2, p. 20-7, 2015.

BASTONE, Patrizia; BRAVO, Ignacio G.; LÖCHELT, Martin. Feline foamy virus-mediated marker gene transfer: identification of essential genetic elements and influence of truncated and chimeric proteins. **Virology**, v. 348, n. 1, p. 190-199, 2006.

MÅRTENSSON, J.; BELLOMO, R. The rationale for permissive hyperglycemia in critically ill patients with diabetes. In: **Annual update in intensive care and emergency medicine**. p. 365-372, 2016.

MARIPURI, S.; KASISKE, B.L. (2014). The role of mycophenolate mofetil in kidney transplantation revisited. **Transplantation Reviews**, v. 28, n. 1, p. 26–31, 2014.

MOLITORIS, B. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis. **J Clin Invest**, v. 124, p. 2355-63, 2014.

MC DONALD, B. et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 362-366, 2010.

MCMMASTER, William G. et al. Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. *Circulation research*, v. 116, n. 6, p. 1022-1033, 2015.

MILSOM, A. et al. Role for endothelial nitric oxide synthase in nitrite-induced protection against renal ischemia–reperfusion injury in mice. **Nitric Oxide**, v. 22, p. 141-8, 2010.

MULLER, D.N. et al. Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage. **Am J Pathol**, v. 161, p. 1679–1693, 2002.

OKAZAKI, Yuko et al. Enhanced TGF- β /Smad signaling in the early stage of diabetic nephropathy is independent of the AT1a receptor. **Clinical and experimental nephrology**, v. 11, n. 1, p. 77-87, 2007.

OSTERMANN, M.; LIU, K. Pathophysiology of AKI. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 31, n. 3, p. 305–314, 2017.

PALIPOCH, Sarawoot. A review of oxidative stress in acute kidney injury: protective role of medicinal plants-derived antioxidants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 10, n. 4, p. 88-93, 2013.

PALMER, L.G.; SCHNERMANN, J. Integrated control of Na transport along the nephron. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 10, n. 4, p. 676-687, 2015.

PATSCHAN, D; PATSCHAN, S.; MÜLLER, G. A. Inflammation and microvasculopathy in renal ischemia reperfusion injury. **Journal of transplantation**, v. 2012, 2012.

PENDERGRASS, Karl D. et al. Differential expression of nuclear AT1 receptors and angiotensin II within the kidney of the male congenic mRen2. Lewis rat. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 290, n. 6, p. F1497-F1506, 2006.

PERESLENI, T. et al. Antisense oligodeoxynucleotides to inducible NO synthase rescue epithelial cells from oxidative stress injury. **American Journal of Physiology-Renal Fluid and Electrolyte Physiology**, v. 39, p. 971, 1996.

PHILLIPS, L. et al. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. **Investigative Surgery**, v.22, p. 46-55, 2009.

PARADIS, Stéphanie et al. Chronology of mitochondrial and cellular events during skeletal muscle ischemia-reperfusion. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 310, n. 11, p. C968-C982, 2016.

QUEIROZ-MADEIRA, Eugênio P. et al. Na⁺-ATPase in spontaneous hypertensive rats: possible AT1 receptor target in the development of hypertension. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1798, n. 3, p. 360-366, 2010..

RADI, Z.A. Immunopathogenesis of Acute Kidney Injury. **Toxicologic Pathology**, v. 46, n. 8, p. 930-943, 2018.

REQUIÃO-MOURA, L.R. et al. Ischemia and reperfusion injury in renal transplantation: hemodynamic and immunological paradigms. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 13, n. 1, p. 129-135, 2015.

REUDELHUBER, Timothy L. The renin–angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 14, n. 2, p. 155-159, 2005.

ROOS, J. C. et al. Differential effect of salt loading on sodium and lithium excretion in Dahl salt-resistant and-sensitive rats. **Hypertension**, v. 6, n. 3, p. 420-424, 1984.

ROMANINI, C.V. et al. 4-hydroxy-3-methoxy-acetophenone-mediated long-lasting memory recovery, hippocampal neuroprotection, and reduction of glial cell activation after transient global cerebral ischemia in rats. **J Neurosci Res**, v. 93, n. 8, p. 1240–1249, 2015.

RANJBAR, K. et al. Cardioprotective effect of resistance training and Crataegus oxyacantha extract on ischemia reperfusion-induced oxidative stress in diabetic rats. **Biomed Pharmacother**, v. 100, p.455-460, 2018.

RASTOGI, Radhika et al. NOX activation by subunit interaction and underlying mechanisms in disease. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 10, p. 301, 2017.

RODRÍGUEZ-LARA, Simón Quetzalcoatl et al. Alternative interventions to prevent oxidative damage following ischemia/reperfusion. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

SAMPAIO, L.S. et al. Experimental ischemia/reperfusion model impairs endocannabinoid signaling and Na⁺/K⁺ ATPase expression and activity in kidney proximal tubule cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 154, p. 482–491, 2018.

SATPUTE, S. R. et al. The role for T cell repertoire/antigen-specific interactions in experimental kidney ischemia reperfusion injury. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 984-992, 2009.

SCHULTZ, S.G.; GIEBISCH, G.; TOSTESON, D.C. Transport across small intestine, in: Ussing (Eds.), *Membrane Transport in Biology*. **Springer-Verlag Press**, p. 749–780, 1979.

SETEVEN, G. et al. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. **Kidney International**, v. 81, n. 5, p. 442-448, 2012.

SPARKS MA, CROWLEY SD, GURLEY SB, MIROTSOU M, COFFMAN TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. **Compr Physiol.**; v.4, n.3, p.1201-1228, 2014.

SHARFUDDIN, A.A.; MOLITORIS, B.A. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **Nat Rev Nephrol**, v.7, p.189-200, 2011.

SHI, Si et al. Melatonin attenuates acute kidney ischemia/reperfusion injury in diabetic rats by activation of the SIRT1/Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Bioscience reports**, v. 39, n. 1, 2019.

SINGH, P.; OKUSA, M.D. The role of tubuloglomerular feedback in the pathogenesis of acute kidney injury. **Contrib Nephrol**, v. 174, p. 12–21, 2011.

SINGRI, N.; AHJA, S.N.; LEVIN, M.L. Acute renal failure. **JAMA**, v. 289, p. 747–51, 2003.

SLEPCHENKO, K.G.; LU, Q.; LI, Y.V. Zinc wave during the treatment of hypoxia is required for initial reactive oxygen species activation in mitochondria. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**, v. 8, n. 1, p. 44–51, 2016.

TECKLENBORG, J. et al. The role of the immune system in kidney disease. **Clin Exp Immunol**, v. 192, p. 142–50, 2018.

THURMAN, J.M. et al. Lack of a functional alternative complement pathway ameliorates ischemic acute renal failure in mice. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 3, p. 1517–1523, 2003.

TRIPATARA, P. et al. Nitrite-derived nitric oxide protects the rat kidney against ischemia/reperfusion injury in vivo: role for xanthine oxidoreductase. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, p. 570–80, 2007.

TURNEY, J. H. Acute renal failure associated with recreational drug use. **Acute renal failure: a companion to Brenner and Rector's the kidney**, 1st edn. Philadelphia: WB Saunders, p. 397–405, 2001.

TUO, Yong-Hua et al. NADPH oxidase inhibitor improves outcome of mechanical reperfusion by suppressing hemorrhagic transformation. **Journal of neurointerventional surgery**, v. 9, n. 5, p. 492–498, 2017.

SHERMAN, James H.; LUCIANO, Dorothy S.; VANDER, Arthur J. **Human physiology: the mechanisms of body function**. McGraw-Hill, 1985.

VANDE VOORDE, R. G. Serum NGAL and cystatin C as predictive biomarkers for acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, p. 404A, 2006.

VIÑAS, J.L. et al. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. **Free Radic Biol Med**, v. 40, p. 992–1003, 2006.

VIEIRA, Leucio D. et al. Oxidative stress induced by prenatal LPS leads to endothelial dysfunction and renal haemodynamic changes through angiotensin II/NADPH oxidase pathway: Prevention by early treatment with α -tocopherol. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 12, p. 3577–3587, 2018.

VOSS, A.; BODE, G.; KERKHOFF, C. Double-Stranded RNA Induces IL-8 and MCP-1 Gene Expression via TLR3 in HaCaT-Keratinocytes. **Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation Allergy)**, v. 11, p. 397–405, 2012.

VELIMIROVIĆ, Milica et al. Effects of vitamin D3 on the NADPH oxidase and matrix metalloproteinase 9 in an animal model of global cerebral ischemia. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

WANG, Liming; FLANNERY, Patrick J.; SPURNEY, Robert F. Characterization of angiotensin II-receptor subtypes in podocytes. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 142, n. 5, p. 313-321, 2003.

WEIGHT, SC. et al. Interaction of eicosanoids and nitric oxide in renal reperfusion injury. **Transplantation**, v. 72, p.614–619, 2001.

YARGER, W. E. Obstructive urinary tract disease in the elderly. **Hypertension and renal disease in the elderly. Boston: Blackwell Scientific Publications**, p. 272-308, 1992.

ZAPATA-SUDO, R.T. et al. Na(+)-ATPase in spontaneous hypertensive rats: possible AT(1) receptor target in the development of hypertension, **Biochim. Biophys. Acta** **1978**, p. 360–366, 2010.

ZHANG, Shao-Ling et al. Effect of renin-angiotensin system blockade on the expression of the angiotensinogen gene and induction of hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells. **Nephron Experimental Nephrology**, v. 9, n. 2, p. 109-117, 2001.

ZUK, A.; BONVENTRE, J.V.; MATLIN, K.S. Expression of fibronectin splice variants in the postischemic rat kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 280, p. F1037–53, 2001.

5. ARTIGO

O micofenolato de mofetila e a apocinina previnem as alterações induzidas pela isquemia-reperfusão no sistema renina-angiotensina e nas ATPases transportadoras de Na⁺ no túbulo proximal em ratos

Jéssica S. S. Albuquerque¹, Shirley M. Sousa¹, Leiliandry A. Melo¹, Natália K. S. Lima¹, Jeadã L. Silva¹, Gabriella R. Almeida¹, Luydson Richardson Silva Vasconcelos²; Leucio D. Vieira¹

¹ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

² Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, Brasil

Autor correspondente:

Leucio D. Vieira

Fax +55 81 2126 8976

Email leucio.vieirafo@ufpe.br

RESUMO

A isquemia/reperfusão (IR) renal está associada a lesão renal aguda (LRA) e ao aumento da susceptibilidade do paciente ao desenvolvimento de doença renal crônica e hipertensão. A reabsorção de Na^+ e água é prejudicada devido à danos nas células epiteliais dos túbulos renais e o estresse oxidativo e o sistema imune podem estar envolvidos no mecanismo de lesão. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi investigar o impacto do tratamento com imunossupressor micofenolato de mofetila (MMF) e com apocinina no surgimento das alterações do transporte de Na^+ no túbulo proximal observadas na lesão renal aguda induzida por IR em ratos. Aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE: nº 0061/2018. Ratos machos Wistar (280-300 g, n=24) foram submetidos à LRA induzida por IR renal bilateral (grupo IR). Previamente a indução da LRA (24 horas), parte desses animais (n=8) recebeu tratamento em dose única do imunossupressor micofenolato de mofetila (MMF; 30 mg/kg, via oral; grupo IRM), enquanto que outra parte recebeu tratamento com o inibidor da NADPH oxidase apocinina (Apo; 100 mg/kg, via oral; grupo IRA). O grupo sham foi submetido a um procedimento mimético da IR. Após 24 horas de reperfusão, os animais foram submetidos a avaliação dos níveis séricos de creatinina e ureia, níveis séricos de nitrato/nitrito, e proteinúria. Além disso foi avaliada a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, atividade da $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$ e atividade da NADPH oxidase no córtex renal e expressão renal do RNAm de componentes do sistema renina-angiotensina. O grupo IR apresentou elevação de 700% ($P < 0,001$) dos níveis séricos de creatinina, elevação de 200% ($P < 0,001$) da proteinúria e diminuição de 70% ($P < 0,01$) dos níveis séricos de nitrato/nitrito em comparação com o Sham. Os grupos IRA e IRM apresentaram níveis séricos de creatinina e proteinúria menores do que o grupo IR (70%, $P < 0,001$ e 40%, $P < 0,001$). A IR também promoveu elevação dos níveis de superóxido, da atividade da NADPH oxidase e da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ no córtex renal, bem como diminuiu a atividade da $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$. Adicionalmente, os ratos submetidos a IR apresentaram aumento (100-200%, $P < 0,05$) da expressão do RNAm do angiotensinogênio, da isoforma 1 enzima conversora de angiotensina (ECA1) e do receptor AT1a, bem como diminuição de mais de 50% ($P < 0,05$) da isoforma 2 da ECA (ECA2). As alterações na atividade das ATPases e na expressão do RNAm dos componentes do SRA foram prevenidas por ambos tratamentos. Dessa forma, concluímos que a IR renal induz alterações no transporte de Na^+ dependente de ATP e ativação do SRA através de mecanismos que envolvem ativação da NADPH oxidase e que são sensíveis ao imunossupressor MMF.

Palavras-chave: Isquemia/reperfusão, Lesão renal aguda, Transporte de sódio, Micofenolato de mofetila, Apocinina.

INTRODUÇÃO

A lesão renal aguda (LRA) é caracterizada pelo declínio abrupto da taxa de filtração glomerular, e está associada à alta morbidade, mortalidade e custos de saúde. Por muito tempo, a LRA foi considerada uma síndrome completamente reversível, entretanto, nos últimos anos, estudos apontam essa doença como um grande fator de risco para doença renal crônica e danos em órgãos não-renais (STEVEN et al.; 2012). A isquemia/reperfusão renal (IR) é um dos processos fisiopatológicos mais frequentes observados na LRA (JANG, RABB; 2009).

Os rins submetidos a IR manifestam uma variedade de deficiências funcionais, destacando-se o comprometimento da reabsorção tubular de solutos e água (HANLEY, 1980; JOHNSTON et al., 1984). A IR ocasiona uma lesão às células epiteliais tubulares podendo levar à morte por apoptose e necrose, com comprometimento funcional dos órgãos (LE DORZE et al., 2009). A reabsorção tubular proximal de sódio depende do gradiente de concentração de sódio gerado pelos transportadores basolaterais, principalmente a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ (JORGENSEN et al., 2003; EMMA et al; 2016). O transporte tubular de sódio apresenta um intenso controle pelo sistema renina-angiotensina (SRA). A diminuição na perfusão renal estimula o SRA, que leva à consequente retenção renal de sódio e aumento do volume intravascular (GOLDEBLAT et al., 1934). A inibição do SRA limita a inflamação renal e o estresse oxidativo de forma independente de modulação da pressão arterial (CROWLEY ET AL., 2010).

O estresse oxidativo é um mecanismo fundamental da fisiopatologia da IR, sendo parcialmente dependente da produção excessiva de espécies reativas do oxigênio (EROs) pela NADPH oxidase (YAMAMOTO, 2017). A ativação da NADPH oxidase promove lesões teciduais diretamente pela produção de EROs, e ainda por mecanismos indiretos como ativação do SRA e produção de mediadores inflamatórios (CIFUENTES-PAGANO, 2014; JHA et al., 2016). Por outro lado, a inflamação também parece desempenhar um papel importante na fisiopatologia da LRA. O componente inato do sistema imune é responsável pela resposta precoce à lesão de uma forma não específica do antígeno, enquanto que o componente adaptativo, ativado por antígenos específicos, é iniciado em poucas horas e dura ao longo de vários dias após a lesão (BOVENTRE; YANG, 2011).

Diante de tais considerações, é possível estabelecermos a hipótese de que o sistema imune e a NADPH oxidase estão envolvidos nas alterações do SRA e do transporte tubular de Na^+ dependente de ATP no túbulo proximal induzida pela isquemia e reperfusão. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar, em ratos, o efeito da IR renal na atividade das

ATPases transportadoras de Na^+ e na expressão do SRA no túbulo proximal, bem como se essas alterações são prevenidas pelo imunossupressor micofenolato de mofetila e pelo inibidor da NADPH oxidase apocininaos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco e aprovado com nº 0061/2018. Foram utilizados ratos Wistar, mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, em ciclo 12h/12h – claro/escuro, e temperatura em torno de 22°C.

Protocolos experimentais

Ratos adultos Wistar (300–350 g, n=24) foram submetidos à LRA induzida por isquemia renal bilateral seguida de 24h de reperfusão (isquemia-reperfusão; IR). Os animais foram anestesiados com combinação de cetamina/xilazina (80/10 mg/kg de peso corpóreo, via intraperitoneal) e laparotomia foi realizada para ter acesso aos pedículos renais onde ambas artérias renais tiveram o fluxo sanguíneo obstruído por um período de 30 minutos através do posicionamento de pinças em ambos pedículos renais. Após esse período, os animais tiveram a perfusão renal restabelecida. Parte desses animais (n=8) recebeu tratamento em dose única do imunossupressor micofenolato de mofetila (grupo IR+MMF; 30 mg/kg de peso corpóreo, via oral) 24 horas antes da indução do procedimento de IR, enquanto que outra parte (n=8) recebeu tratamento em dose única com o inibidor da NADPH oxidase apocinina (100 mg/kg de peso corpóreo, via oral). O grupo controle foi submetido à processo cirúrgico semelhante a IR, excetuando a isquemia/reperfusão renal (grupo SHAM, n=8). Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados (cetamina e xilazina, 80 e 10 mg/kg de peso corpóreo, respectivamente) e em seguida realizada coleta de amostra sanguínea (veia cava inferior), urina (bexiga) e do tecido renal. Após fracionados, foram congelados imediatamente por imersão em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

Avaliação de parâmetros metabólicos

Os níveis plasmáticos de ureia e creatinina foram mensurados através de ensaios comerciais colorimétricos de acordo com as instruções do fabricante. A concentração

urinária de proteína foi mensurada utilizando o método do fenol de Folin de acordo com Lowry et al. (1951).

Isolamento do *cortex corticis*

Os ensaios foram realizados utilizando homogenatos membranas do córtex externo (*cortex corticis*) dos rins dos animais (Vieira-Filho et al., 2009). Os rins foram coletados e mantidos em tampão isotônico frio contendo 250 mmol/L de sacarose, 10 mmol/L HEPES-Tris (pH 7,4), EDTA 2 mmol/L e inibidor de tripsina 0,15 mg/mL (Tipo II-S; SigmaAldrich). Realizamos cortes transversais finos do córtex corticis (0,5 mm) utilizando um micrótomo Stadie-Riggs (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA) e dissecados cuidadosamente com tesoura de iridectomia para evitar contaminação com o resto do tecido. A suspensão dos fragmentos foi homogeneizada na mesma solução fria (4 mL / g) utilizando um homogeneizador de Teflon/vidro.

Atividade das ATPases transportadoras de Na^+

A medição da ATPase sensível à ouabaína (Na^+K^+)-ATPase e Na^+ -ATPase sensível à furosemida foi realizada no córtex cortical, que representa a porção mais externa do córtex renal que corresponde à maior parte das células do túbulo proximal (Proverbio e Del Castillo, 1981). A atividade da (Na^+K^+)-ATPase e a atividade da Na^+ -ATPase foram avaliadas por medição da hidrólise de ATP sensível a inibidores específicos, ouabaína e furosemida, respectivamente, de acordo com o método descrito anteriormente (Grubmeyer e Penefsky, 1981; Vieira-Filho et al. , 2014). O fosfato inorgânico (Pi) liberado pela hidrólise do ATP foi medido a 620 nm após a reação com molibdênio.

Atividade da NADPH oxidase

O corte corticis foi homogeneizado em tampão de radioimunoprecipitação contendo NaCl 150 mM, Triton X-100 a 1%, Triton X-100 a 1%, desoxicolato de sódio a 0,5%, desoxicolato de sódio a 0,5%, SDS a 0,1% e 50 mM Tris, pH 8,0; contendo 2 mM de AEBSF, 1 mM de EDTA, 130 μM de bestatina, 14 μM de E-64, 1 μM de leupeptina e 0,3 μM de aprotinina. Para a atividade da NADPH oxidase foi realizada a quantificação de superóxido produzido na presença de NADPH por meio da quimioluminescência derivada da lucigenina. Os homogenatos foram adicionados a um meio de reação contendo lucigenina 10 μM e NADPH 100 μM . A luminescência foi mensurada por meio de um leitor multimodular (Varioskan Flash, ThermoScientific). O resultado foi expresso em unidade relativa de luz por minuto e corrigido pela quantidade de proteína da amostra. A liberação

de superóxido também foi avaliada na ausência de NADPH, representando a produção basal.

Determinação do óxido nítrico (NO)

A produção de nitrito/nitrato foi determinada através da reação de Griess com o plasma. O reagente de Griess (0,1% de N- [1-naftil] etilenodiamina-HCl e 1% de sulfanilamida e 5% de H_3PO_4) foi adicionado ao soro (sem diluição) e sobrenadante dos homogenatos corticais (diluídos 5 x em PBS) na proporção de 1:1. Em seguida foi incubado por 10 minutos para obter uma leitura em espectrofotômetro (540 nm). O resultado foi corrigido pela concentração de proteína das amostras.

Ensaio de expressão gênica dos componentes do SRA

O córtex corticis foi usado para extração de RNA usando Trizol de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA foi quantificado por espectrofotometria com o equipamento NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Após a quantificação, o cDNA foi obtido usando kits de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi quantificado por espectrofotometria com equipamento NanoDrop 2000 (ThermoScientific) e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O ensaio de expressão gênica de componentes do RAS foi realizado a partir do cDNA usando sondas específicas para angiotensina I (ANG), Enzima conversora de angiotensina 1 (ACE 1), enzima conversora de angiotensina II (ACE 2), receptor de angiotensina (AGT1Ra) e receptor de angiotensina II (AGT2R). O gene endógeno usado para normalização foi o GAPDH. A quantificação relativa dos mRNAs foi realizada pela técnica de RT-PCR com TAQMAN® Gene Expression Assays utilizando o equipamento Quantstudio 5 (Thermo Scientific, CA, EUA). O software expressionSuite v3.3 (Life Technologies, CA, EUA) foi aplicado para obtenção de Rq (quantificação relativa) por meio do método $\Delta\Delta\text{Ct}$. Todas as reações foram realizadas no Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ-PE.

Análise estatística

Os resultados são expressos pela média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Os dados foram submetidos a avaliação da normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. Considerando a inexistência de grandes variações da distribuição Gaussiana, as médias dos grupos foram comparadas usando análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Tukey. As análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5 (versão 5.01, GraphPad Software, Inc.). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas com $P < 0,05$.

RESULTADOS

Níveis de séricos de creatinina, ureia e nitrato/nitrito e proteinúria

Os marcadores gerais de função renal e os níveis séricos de nitrato/nitrito são apresentados na Tabela 1. Observamos um aumento na creatinina sérica do grupo IR (~700%, $P < 0,001$) em comparação ao grupo Sham. Os animais tratados com MMF e Apocinina também apresentaram níveis elevados de creatinina sérica (~500% $P < 0,001$ e 400% $P < 0,001$), contudo os seus níveis eram inferiores ao do grupo IR (~26%, $P < 0,01$ e ~35%, $P < 0,001$).

A razão da concentração urinária de proteína:creatinina foi utilizada como estimativa da proteinúria. O grupo IR demonstrou aumento significativo comparado ao grupo Sham (~200%, $P < 0,001$). O tratamento com Apocinina e MMF conseguiu reduzir significativamente a proteinúria quando relacionado aos animais IR (~70%, $P < 0,001$ e ~40%, $P < 0,001$).

Conforme visto na Tabela 1, houve uma diminuição dos níveis séricos de nitrato/nitrito no grupo IR (~73%, $P < 0,01$) comparados com o Sham. Observamos que o tratamento com a apocinina não influenciou o efeito da IR, enquanto que os animais tratados com MMF obtiveram um aumento (~330%, $P < 0,001$) em comparação ao grupo IR.

Atividade da $(Na^+ + K^+)ATPase$ e $Na^+ - ATPase$

A reabsorção tubular de sódio e água é alterada devido ao dano causado às células epiteliais dos túbulos renais, levando a danos estruturais e mudanças funcionais. Por tal razão foi avaliada a atividade da $(Na^+ + K^+)ATPase$ e da $Na^+ - ATPase$ (Figura 1). Foi observado um aumento da atividade da $(Na^+ + K^+)ATPase$ no grupo IR comparado ao controle (~59%, $P < 0,01$). O tratamento com MMF e apocinina foi capaz de diminuir a atividade da $(Na^+ + K^+)ATPase$ (~40%, $P < 0,001$ e ~30%, $P < 0,05$). Por outro lado, constatamos na Fig. 1B uma diminuição da atividade da $Na^+ - ATPase$ do grupo IR (~44%, $P < 0,05$) em relação ao grupo Sham, o tratamento com Apocinina e MMF conseguiram reverter esse efeito (~98% e ~77%, $P < 0,05$).

Expressão renal de RNAm para angiotensinogênio, ECA, ECA2, AT1aR e AT2R

A IR induziu uma ampla alteração na expressão do RNAm para os componentes do SRA (Figura 2). Os ratos submetidos a IR apresentaram maior expressão de RNAm do AGT (150%, $P < 0,05$), da ECA (200%, $P < 0,05$) e do AT_{1a}R (200%, $P < 0,01$) do que o grupo Sham. Por outro lado, a expressão da ECA2 foi cerca de 70% menor ($P < 0,05$) no grupo

IR em relação ao grupo Sham. Os tratamentos com MMF e Apocinina preveniram as alterações induzidas pela IR na expressão do RNAm desses componentes do SRA. A IR não afetou a expressão do RNAm do AT₂R, contudo o tratamento com a Apocinina aumentou sua expressão.

Produção basal de superóxido e atividade da NADPH oxidase

Observamos que a atividade da NADPH oxidase foi elevada no grupo IR, enquanto que ambos os grupos de animais tratados foram diminuídos quando comparado com IR (~62%, $P<0,05$ e ~65%, $P<0,05$) (Figura 3). Foi possível observar também um aumento na produção de ânion superóxido nos animais do grupo IR, quando comparado ao Sham (~112%, $P<0,05$). Os tratamentos com MMF e Apocinina foram capazes de reverter esse aumento (~59%, $P<0,01$ e ~65%, $P<0,05$).

Tabela 1. Efeitos do micofenolato mofetil e apocinina nos níveis de séricos de creatinina, nitrato/nitrito e proteinúria de ratos submetidos a IR renal

	Sham	IR	IRM	IRA
Creatinina sérica (mg/dL)	0,53 ± 0,01	4,42 ± 0,13***	3,27 ± 0,40***††	2,86 ± 0,08 ***††
Nitrato/nitrito sérico (nmol/mL)	42±4	11 ± 1*	45 ± 10 [†]	18 ± 2*
Razão proteína:creatinina na urina	11 ± 1	33 ± 4***	9 ± 2 ^{†††}	18 ± 2 ^{†††}

Dados expressos como média ± EPM. Sham = ratos submetidos a simulação da cirurgia (n=8); IR = ratos submetidos a isquemia/reperfusão (IR) renal (n=8); IRM = ratos submetidos a isquemia/reperfusão (IR) renal tratados com micofenolato de mofetila (n=8); IRA = ratos submetidos a isquemia/reperfusão (IR) renal tratados com apocinina. A comparação entre as medias dos grupos foi realizada pela ANOVA seguida do teste de Tukey: * $P<0,05$; e *** $P<0,001$ vs. Sham; [†] $P<0,05$; ^{††} $P<0,01$; e ^{†††} $P<0,001$ Vs. IR.

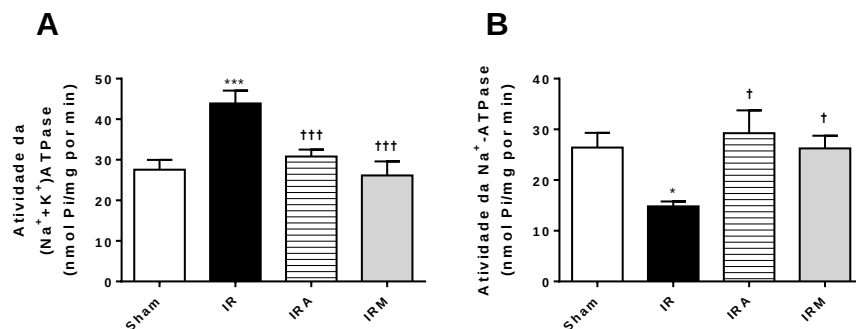


Figura 1. Atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase (A) e Na⁺-ATPase (B) no *cortex corticis*. Dados expressos como média ± EPM. Sham = ratos submetidos a simulação da cirurgia (n=8); IR = ratos submetidos a isquemia/reperfusão (IR) renal (n=8); IRM = ratos submetidos a isquemia/reperfusão (IR) renal tratados com micofenolato de moefetila (n=8); IRA = ratos submetidos a isquemia/reperfusão (IR) renal tratados com apocinina. A comparação entre as medias dos grupos foi realizada pela ANOVA seguida do teste de Tukey: *P<0,05; e ***P<0,001 vs. Sham; †P <0,05; e †††P<0,001 Vs. IR.

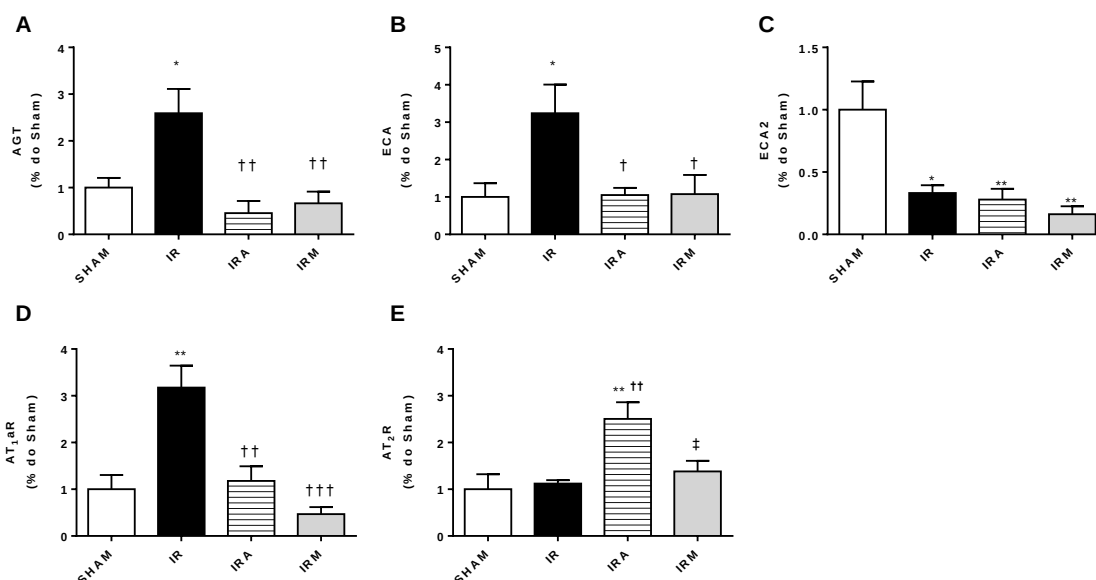


Figura 2. Expressão renal de RNAm dos componentes do sistema renina-angiotensina no *cortex corticis*: angiotensinogênio (A), ECA (B), ECA2 (C), AT_{1aR} (D) e AT_{2R} (E). Dados expressos como média ± EPM. Sham = ratos submetidos a simulação da cirurgia (n=8); IR = ratos submetidos a isquemia/reperfusão (IR) renal (n=8); IRM = ratos submetidos a isquemia/reperfusão (IR) renal tratados com micofenolato de moefetila (n=8); IRA = ratos submetidos a isquemia/reperfusão (IR) renal tratados com apocinina. A comparação entre as medias dos grupos foi realizada pela ANOVA seguida do teste de Tukey: *P<0,05; e **P<0,01 vs. Sham; ††P<0,01; e †††P<0,001 Vs. IR; †P<0,05 vs. IRA.

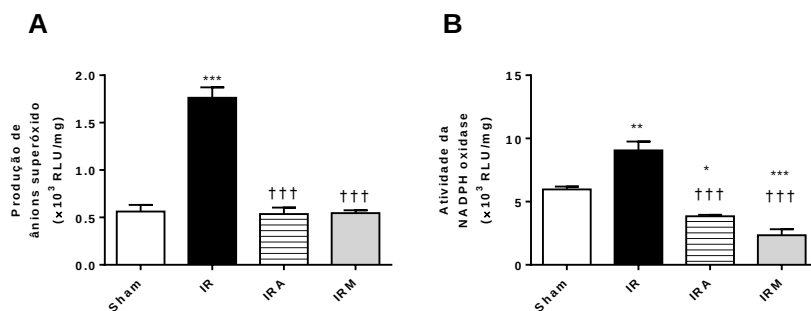


Figura 3. Produção basal de superóxido e atividade da NADPH oxidase no *cortex corticis*. Dados expressos como média $\pm$ EPM. Sham = ratos submetidos a simulação da cirurgia (n=8); IR = ratos submetidos a isquemia/reperfusão (IR) renal (n=8); IRM = ratos submetidos a isquemia/reperfusão (IR) renal tratados com micofenolato de moefetila (n=8); IRA = ratos submetidos a isquemia/reperfusão (IR) renal tratados com apocinina. A comparação entre as medias dos grupos foi realizada pela ANOVA seguida do teste de Tukey: *P<0,05; **P<0,01 e ***P<0,001 vs. Sham; †P <0,05; ††P<0,01; e †††P<0,001 Vs. IR.

DISCUSSÃO

A IR renal é uma situação associada a disfunção tubular e comprometimento da reabsorção de Na^+ . Apesar de ser conhecida importância do SRA, da NADPH oxidase e do sistema imune para o mecanismo de lesão renal, a interrelação entre esses fatores não é completamente conhecida na IR renal. O presente estudo demonstrou que a IR induz alterações no transporte de Na^+ dependente de ATP, com efeito opostos na atividade da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, superexpressão de diversos componentes do pró-hipertensivos do SRA. Essas alterações ocorreram paralelamente a elevação da NADPH oxidase e foram inibidos pela administração prévia de Apocinina. Além disso, foi demonstrado que o imunossupressor MMF foi capaz de reverter esse quadro, indicando um papel importante para o sistema imune nessas alterações.

Os níveis de proteinúria, creatinina e ureia sérica foram aumentadas pela IR, indicam dano renal (HU et al., 2016). Foi observada uma diminuição nos níveis de nitrato/nitrito sérico no grupo IR, essa redução pode resultar o dano às células endoteliais induzido pela geração de EROs, o que corrobora com os indicativos de dano renal (HAGAR e EL TAWAB, 2012). Os tratamentos com MMF e Apo levaram a uma melhora no dano renal. Estudos demonstraram que o MMF pode levar à proteção do dano renal pela inibição da expressão de $\text{TGF-}\beta 1$ e MCP-1, além da inibição da infiltração de macrófagos (JIANG et al., 2012).

Com a perda de polaridade tubular gerada pela IR, ocorrem alterações importantes no transporte de íons. O principal transportador responsável pela reabsorção de Na^+ , a $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$, sofre mudança na função e localização após breves períodos de isquemia. Além disso, foi demonstrado que a $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ pode ser detectada em compartimentos intracelulares após IR (MOLITORIS et al., 1992; SAMPAIO et al., 2018). Diante do exposto, investigamos o efeito da IR na atividade da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$. Foi observado que a lesão por IR levou ao aumento da atividade da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$, resultado semelhante ao encontrado por Cortes e colaboradores (2018). Na literatura, as respostas obtidas a respeito da atividade da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ após períodos de isquemia/reperfusão renal são bastante controversas. Estudos demonstram que eventos de isquemia por si só são capazes de diminuir a atividade da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$, e após período de reperfusão uma recuperação completa da atividade e uma abundância aumentada da subunidade $\alpha 1$ de $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ em homogenatos corticais seriam encontrados (MOLINAS et al., 2006). Em nosso estudo, verificamos apenas a atividade da ATPase, porém sua localização não foi elucidada, sendo considerada uma limitação. A atividade da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ também parece divergir à depender do tecido renal. Fares

e colaboradores (2014) constataram que a atividade do transportador no córtex aumentou após a isquemia em comparação com o grupo controle, enquanto na medula, houve apenas uma tendência de ativação da atividade da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase após a isquemia.

A Na^+ / K^+ -ATPase é responsável pela reabsorção maciça de Na^+ através do epitélio, enquanto a Na^+ -ATPase permite o ajuste fino, agindo como um contrabalanço para manter a homeostase de Na^+ e água (CORTE et al., 2018). A atividade da Na^+ -ATPase foi diminuída em oposição à ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase, compensando sua super ativação. Em longo prazo, a IR mantém o aumento da atividade da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase observada no córtex de ratos submetidos a IR, sendo apoiada pela hipótese de que o aumento da reabsorção de Na^+ proximal é responsável por aumento dos níveis de pressão arterial, acompanhada por danos renais, pressão de natriurese prejudicada e hipertensão (Dados prévios do laboratório - LIMA et al., 2020; PECHMAN et al., 2009). Ambos os tratamentos com Apocinina e MMF tiveram potencial de proteção contra a lesão e alterações nas ATPases transportadoras de Na^+ , sendo estatisticamente semelhantes ao grupo controle.

O estresse oxidativo é um mecanismo patogênico chave na lesão tecidual induzida por isquemia/reperfusão. Outros estudos, em diferentes modelos de isquemia/reperfusão tecidual, observaram uma explosão de metabólitos reativos de oxigênio após o restabelecimento do fluxo sanguíneo para uma zona previamente isquêmica. Em nosso estudo, os animais submetidos à IR renal apresentaram um aumento na atividade da NADPH oxidase, o que corresponde aos dados encontrados na literatura. Há informações disponíveis sobre a ativação da NADPH oxidase na lesão renal induzida por isquemia/reperfusão, porém seu mecanismo de ação na patologia ainda não é bem estabelecido (SIMONE et al., 2014; KAPOOR et al., 2018).

Conforme demonstrado, os tratamentos com Apo e MMF foram capazes de reverter a ativação da NADPH oxidase significativamente. Em modelo de isquemia/reperfusão cerebral, o tratamento com Apocinina não demonstrou nenhuma alteração na atividade da NADPH oxidase comparada ao Sham, revertendo o efeito deletério promovido pela IR. Um mecanismo proposto, seria uma sinalização cruzada entre a NADPH oxidase e a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, que representaria um ciclo vicioso de produção de EROs, podendo ser farmacologicamente direcionado com o inibidor de NOX sob condições de estresse oxidativo. Estudos demonstraram que o MMF, administrado durante a fase de reparo da IR renal, modifica lesão tubular, proliferação e tráfico de linfócitos e produção de citocinas. Em modelo animal de doença renal crônica o MMF mostrou diminuir a atividade da NADPH oxidase (GANDOLFO et al., 2010; TAPIA et al., 2016).

Vários mecanismos podem ser responsáveis pelo agravamento da LRA e sua progressão para doença renal crônica (DRC), incluindo EROs, inflamação e angiotensina II (FRANCO et al., 2006). O sistema renina-angiotensina (SRA) é uma cascata de sinalização hormonal que regula o fluido corporal e a homeostase da pressão arterial. O nível de angiotensinogênio renal (AGT) é determinante para a produção de Ang II, sendo considerado um marcador da atividade do SRA (CROWLEY e COFFMAN, 2012; KOBORI et al., 2006). Foi observado em animais submetidos à isquemia/reperfusão o aumento na expressão renal de mRNA para angiotensinogênio, ECA1 e AT1a. Shai e colaboradores (2012) evidenciaram um aumento na concentração sistêmica e intra-renal de angiotensina II circulante logo após a isquemia. Essa ativação do SRA exacerba a progressão da inflamação desencadeada pela hipóxia. Como demonstrado, a intervenção com imunossupressor MMF e inibidor da NOX após IR levou à diminuição da expressão de mRNA para AGT, ECA1 e AT1a, sugerindo efeito renoprotetor com drogas imunorreguladoras e antioxidantes.

As lesões por IR podem ocorrer após o infarto, a sepse e o transplante de órgãos. Esse fenômeno agrava o dano tecidual ao iniciar uma cascata inflamatória, incluindo ativação de espécies reativas de oxigênio (ERO), citocinas, quimiocinas e leucócitos (JANG e RABB; 2009). Dessa forma, a IR ocasiona uma lesão às células epiteliais tubulares podendo levar à morte por apoptose e necrose, com comprometimento funcional dos órgãos (LE DORZE et al., 2009). No presente trabalho, investigamos a participação desses mecanismos patológicos chaves através da inibição da atividade da NOX e por meio da imunossupressão do sistema imune. Foi observada uma íntima relação entre esses sistemas, o que gera um feedback positivo através da liberação de espécies reativas de oxigênio após a IR, que ativam mecanismos adicionais de injúria através da ativação do sistema imune. Subsequente ao dano ao tecido renal, o sangue rico em toxinas, PAMPs, DAMPs e mediadores pró-inflamatórios ganham acesso ao parênquima renal e seus vários compartimentos por meio de filtração glomerular ou pela microcirculação do capilar peritubular (GOMEZ et al., 2014; MARTENSON E BELLOMO, 2016). A partir daí, a lesão de células tubulares se manifestará em mudanças estruturais incluindo: bolha de membrana apical, abertura de *tight junctions*, perda de polaridade, descolamento de células da membrana basal, inchaço celular e, em seu extremo, resultará em morte celular. (OSTERMAN e LIU, 2017).

Em conclusão, os presentes dados mostram que LRA induzida por isquemia-reperfusão leva a alterações no transporte de Na^+ dependente de ATP e ativação SRA. Além disso, concluímos que os mecanismos envolvidos nessas alterações são dependentes, pelo menos em parte, do aumento do estresse oxidativo mediado pela NADPH oxidase e pela ativação do sistema imune, sendo potenciais alvos terapêuticos

para prevenção das alterações induzidas pela LRA. A LRA foi considerada uma síndrome completamente reversível, entretanto, nos últimos anos, estudos demonstraram um aumento na indução de DRC e danos em órgãos não renais ocasionados pela LRA (STEVEN et al.; 2012). Nossos achados contribuem para a elucidação da fisiopatologia da LRA induzida por isquemia/reperfusão, o que pode colaborar com o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais precisas e eficazes na recuperação da lesão renal aguda e na prevenção do desenvolvimento da doença renal crônica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Profa. Dayane Aparecida Gomes pelo acesso aos equipamentos localizados em seu laboratório (Plataforma Multiusuários em Biologia Celular e Molecular - FACEPE 16/2012; processo número 1133-2.07/2012). Os autores também agradecem a Nielson T. Mello e Danielle Dutra pelo suporte técnico. Este trabalho foi financiado por bolsas de pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (474004/2013-9 e 432468/2016-1); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) (APQ-1072-2.07/15). As fontes de financiamento não tiveram envolvimento na condução da pesquisa e elaboração do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4210- 4221.
- Boros P, Bromberg JS. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant*. 2006;6(4):652- 658.
- Chen, G.Y. & Nunez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol*. 2010;10, 826–837.
- Cortes, A. L., Gonsalez, S. R., Rioja, L. S., Oliveira, S. S. C., Santos, A. L. S., Prieto, M. C., Lara, L. S. Protective outcomes of low-dose doxycycline on renal function of Wistar rats subjected to acute ischemia/reperfusion injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2018;1864(1), 102.
- Crowley SD. and Coffman TM. Recent advances involving the renin-angiotensin system. *Exp Cell Res* 2012;318: 1049–1056,
- Eltzschig, H., Eckle, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med* 2011; 17, 1391–1401.

Franco M, Martinez F, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ, Santamaria J, Montoya A, Nepomuceno T, Bautista R, Tapia E, and Herrera-Acosta J. Angiotensin II, interstitial inflammation, and the pathogenesis of salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006; 291: F1281–F1287.

Gandolfo, M.T. et al. Mycophenolate mofetil modifies kidney tubular injury and Foxp3⁺ regulatory T cell trafficking during recovery from experimental ischemia–reperfusion. *Transplant Immunology*, 2010; 23,1-2, 45–52.

Goldblatt, H. et al. Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *Journal of experimental*, 1934; 59, 347–379.

Gomez, Hernando, et al. "A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics and the tubular cell adaptation to injury." *Shock*, 2014; 41,1, 3.

Grubmeyer; Penefsky. The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem*, 1981;25,3718-27.

Hanley, M. J. Isolated nephron segments in a rabbit model of ischemic acute renal failure. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 1980;239, 17-23.

Hagar, H. H., & El Tawab, R. A. Cysteinyl leukotriene receptor antagonism alleviates renal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Journal of Surgical Research*, 2012;178(1), e25–e34.

Hu, B., Wu, Y., Tong, F., Liu, J., Shen, X., Shen, R., & Xu, G. Apocynin Alleviates Renal Ischemia/Reperfusion Injury Through Regulating the Level of Zinc and Metallothionein. *Biological Trace Element Research*, 2016;178(1), 71–78.

Johnston, P. A.; Rennke, H.; Levinsky, N.G. Recovery of proximal tubular function from ischemic injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 1984;246, 159-166.

Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia–reperfusion and immune responses in the kidney. *J Mol Med (Berl)* 2009;87:859–64

Jang, H.R.; Rabb, H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol*, 2009;130, 1, 41-50.

Kapoor, Monika et al. Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia-reperfusion hippocampus injury in rat brain. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018;97, 458-472.

Kobori H, Ozawa Y, Suzaki Y, Prieto-Carrasquero MC, Nishiyama A, Shoji T, Cohen EP, and Navar LG. Young scholars award lecture: intratubular angiotensinogen in hypertension and kidney diseases. *Am J Hypertens*, 2006;19: 541–550.

Le Dorze, Matthieu et al. The role of the microcirculation in acute kidney injury. *Current opinion in critical care*, 2009; 15, 6, 503-508.

Le Dorze M, Legrand M, Payen D, Ince C. The role of the microcirculation in acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care*, 2009;15, 503–508.

Levey, A.S., Josef, C. Chronic kidney disease. *The lancet*, 2012;379.9811, 165-180.

Levey, A. S., Coresh, J., Balk, E., Kausz, A. T., Levin, A., Steffes, M., W., Eknoyan, G. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Annals of internal medicine*, 2003;139, 137-147.

Mårtensson, J., and R. Bellomo. "The rationale for permissive hyperglycemia in critically ill patients with diabetes." *Annual update in intensive care and emergency medicine*, 2016. 365-372.

Molinas, S. M., Trumper, L., Serra, E., & Elías, M. M. Evolution of renal function and Na⁺, K⁺-ATPase expression during ischaemia-reperfusion injury in rat kidney. *Molecular and cellular biochemistry*, 2006; 287(1-2), 33-42.

Ostermann, Marlies, and Kathleen Liu. "Pathophysiology of AKI." *Best practice & research Clinical anaesthesiology*, 2017, 31.3,305-314.

Pechman et al. Recovery from renal ischemia-reperfusion injury is associated with altered renal hemodynamics, blunted pressure natriuresis, and sodium-sensitive hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009; 297, R1358–R1363.

Shai Efrati, Sylvia Berman, Ramzia Abu Hamad, Yariv Siman-Tov, Eduard Ilgiyaev, Ilia Maslyakov, Joshua Weissgarten, Efeito do tratamento com captopril na recuperação de lesão renal aguda induzida por isquemia/reperfusão, *Transplante de Diálise em Nefrologia* , 2012;27,1,136–145.

Simone, S., Rascio, F., Castellano, G., Divella, C., Chieti, A., Ditunno, P., ... Grandaliano, G. Complement-dependent NADPH oxidase enzyme activation in renal ischemia/reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014; 74, 263–273.

Tapia, E., García-Arroyo, F., Silverio, O., Rodríguez-Alcocer, A. N., Jiménez-Flores, A. B., Cristobal, M., ... Sanchez-Lozada, L. G. Mycophenolate mofetil and curcumin provide comparable therapeutic benefit in experimental chronic kidney disease: role of Nrf2-Keap1 and renal dopamine pathways. *Free Radical Research*, 2016; 50(7), 781–792.

Steven G. Coca, Swathi Singanamala, Chirag R. Parikh, Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney International*, 2012;81,5, 442-448.

Vieira-Filho, L.D. et al. Renal molecular mechanisms underlying altered Na handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. *Br J Nutr*, 2014;111, 1932–1944.

Zuk A, Bonventre JV, Matlin KS. Expression of fibronectin splice variants in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F1037–53.

6. CONCLUSÕES

Os presentes dados demonstram que a lesão renal aguda induzida por isquemia-reperfusão leva a alterações no transporte de Na^+ dependente de ATP e ativação SRA. Além disso, concluímos que os mecanismos envolvidos nessas alterações são dependentes, pelo menos em parte, do aumento do estresse oxidativo mediado pela NADPH oxidase e pela ativação do sistema imune, sendo potenciais alvos terapêuticos para prevenção das alterações induzidas pela LRA.