

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

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO SISTEMA IMUNE NA LESÃO  
RENAL AGUDA INDUZIDA PELA SEPSE EM RATOS**

**LUCAS CRISTIANO DA SILVA SIQUEIRA**

**RECIFE  
2019**

**LUCAS CRISTIANO DA SILVA SIQUEIRA**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO SISTEMA IMUNE NA LESÃO  
RENAL AGUDA INDUZIDA PELA SEPSE EM RATOS**

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: Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho

**RECIFE  
2019**

Catálogo na fonte  
Elaine C Barroso  
(CRB4 1728)

Siqueira, Lucas Cristiano da Silva

Avaliação do papel do sistema imune na lesão renal aguda induzida pela sepse em ratos /  
Lucas Cristiano da Silva Siqueira – 2019.

65 f.: il., fig., tab.

Orientador: Leucio Duarte Vieira Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de  
Biotecnologias. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2019.  
Inclui referências.

1. Sistema imunológico 2. Septicemia 3. Hipertensão I. Vieira Filho, Leucio Duarte  
(orient.) II. Título

616.079

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-181

LUCAS CRISTIANO DA SILVA SIQUEIRA

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO SISTEMA IMUNE NA LESÃO RENAL  
AGUDA INDUZIDA PELA SEPSE EM RATOS

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:

---

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho - Orientador

---

Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa – Membro interno

---

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – Membro externo

---

Prof. Dr. Edjair Vicente Cabral – Membro externo

---

Profa. Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão – Suplente interno

---

Profa. Dra. Dayane Aparecida Gomes – Suplente externo

Data: 30/07/2019

Dedico esta, assim como todas as minhas conquistas aos meus pais, José Luciano de Siqueira e Adriana Maria da Silva Siqueira, que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter permitido e me dado forças nos momentos que me senti desanimado ao longo do mestrado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por toda ajuda, ensinamento e paciência na orientação deste trabalho.

Agradeço a toda equipe do LFPR e LFFR por toda ajuda na realização do neste trabalho, como também pela amizade e convivência diária.

Agradeço aos meus pais, Adriana e Luciano, por toda a educação dada, todo amor e por me apoiar e me ajudar a alcançar meus sonhos.

Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco, aos funcionários técnicos administrativos, técnicos de laboratório e do biotério do departamento de fisiologia farmacologia da UFPE, como também do departamento de bioquímica.

Agradeço a Professora Dr<sup>a</sup> Dayane Gomes pela disponibilidade do uso do seu laboratório e dos equipamentos que foram de grande importância no desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos aos integrantes da banca examinadora, por disponibilizar seu tempo para contribuir na moldagem deste trabalho.

Agradeço aos órgãos de fomento de pesquisa CAPES, CNPQ e FACEPE pelo suporte financeiro.

“A inteligência é a capacidade  
de se adaptar a mudança”.  
Stephen Hawking

## RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) induzida por sepse é uma situação clínica que apresenta elevada morbidade/mortalidade. Além disso, a LRA por si é um fator de risco para o desenvolvimento de lesões renais tardias e hipertensão, mesmo quando há recuperação dos marcadores clínicos de função renal após o evento agudo. Essa relação pode ocorrer através de modificações no transporte tubular de  $\text{Na}^+$ , elevação do estresse oxidativo e ativação do sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA). Adicionalmente, tem sido descrito que o sistema imune apresenta um papel-chave nos mecanismos de lesão renal. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto tardio da LRA induzida por sepse no SRA, estresse oxidativo e na atividade das ATPases transportadoras de  $\text{Na}^+$  do túbulo proximal, bem como investigar se a imunossupressão pela administração de micofenolato de mofetil (MMF) é capaz de atenuar a indução dessas alterações em longo prazo. Para isso ratos Wistars (300-350 g, n=16) foram submetidos a indução de lesão renal aguda através da administração de LPS (10 mg/kg, sc). alguns destes animais (n=8) receberam dose única do MMF (30 mg/kg, via oral) 24h antes da administração do LPS (grupo LM) ou solução de NaCl 0,9% (1 ml/kg, sc) (grupo L). O grupo controle foi constituído por ratos submetidos a administração de NaCl 0,9% (1 ml/kg, sc) na ausência (grupo C) e na presença (grupo CM) da administração prévia de MMF (n=8). Os ratos foram submetidos a avaliação da função renal e da pressão arterial sistólica (PAS), bem como que no córtex renal foram avaliados marcadores de estresse oxidativo, atividade das ATPases transportadoras de  $\text{Na}^+$  e conteúdo proteico do receptor AT1 para angiotensina II (AT1R), da subunidade p65 do NFkB e das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6. As diferenças entre os grupos experimentais foram analisadas utilizando-se a análise de variância de 2-vias seguida pelo teste de Tukey. Nas primeiras 24 horas após administração do LPS, em relação ao grupo C, observou-se um pronunciado aumento do fluxo urinário e dos níveis séricos de ureia e creatinina. Após 2 semanas, os animais tratados com LPS apresentaram marcadores séricos de função renal semelhantes ao grupo C, enquanto que, na quarta semana pós-LRA, o clearance de creatinina apresentou-se diminuído. No período tardio a LRA induzida pelo LPS, também foi observada elevação da PAS, bem como elevação da peroxidação lipídica renal em paralelo a um aumento da atividade da NADPH oxidase. Além disso, foi observado que o grupo tratado com LPS apresentou alterações opostas na atividade das ATPases transportadoras de  $\text{Na}^+$  no cortex corticis renal: maior a atividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sensível a ouabaína e menor atividade da  $(\text{Na}^+)\text{ATPase}$  sensível a furosemida. Essas alterações não foram acompanhadas de mudanças no conteúdo proteico cortical renal do AT1R, do NFkB ou das citocinas inflamatórias. O tratamento prévio com MMF preveniu a elevação aguda dos níveis séricos de creatinina e ureia em resposta ao LPS, bem como as alterações tardias no clearance de creatinina, na PAS, no aumento do estresse oxidativo renal e atividade da NADPH oxidase. Por outro lado, o MMF aumentou a atividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  adicionalmente ao efeito já induzido pelo LPS, enquanto que ele preveniu a diminuição da atividade da  $(\text{Na}^+)\text{ATPase}$ . Em conjunto, os dados do presente trabalho mostram que a LRA induzida por sepse promove alterações tardias do estresse oxidativo renal e do transporte tubular proximal de  $\text{Na}^+$  que podem favorecer o surgimento de lesões crônicas no tecido renal e hipertensão, bem como que essas alterações devem ser parcialmente dependentes de ativação do sistema imune.

**Palavras-chave:** ATPases Tubulares, Estresse Oxidativo, Hipertensão, Lesão Renal aguda, LPS, Micofenolato de mofetila, Sistema imune.

## ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) induced by sepsis is a clinical condition with high morbidity/mortality. In addition, AKI per se is a risk factor for the development of late kidney damage and hypertension, even when clinical markers of renal function recover after the acute event. This relationship can occur through changes in the tubular transport of Na<sup>+</sup>, elevation of oxidative stress and activation of the renin-angiotensin system (RAAS). In addition, it has been reported that the immune system plays a key role in the mechanisms of kidney injury. Thus, the objective of this work was to evaluate the late impact of sepsis-induced AKI on the SARS, oxidative stress and the activity of the ATPases transporting Na<sup>+</sup> of the proximal tubule, as well as investigating whether immunosuppression by the administration of mycophenolate mofetil (MMF) is able to mitigate the induction of these changes in the long term. For this, Wistar rats (300-350 g, n=16) were subjected to acute kidney injury induction through the administration of LPS (10 mg / kg, sc). Some of these animals (n=8) received a single dose of MMF (30 mg / kg, orally) 24h before the administration of LPS (group LM) or 0.9% NaCl solution (1 ml / kg, sc) (group L). The control group consisted of rats submitted to the administration of 0.9% NaCl (1 ml / kg, sc) in the absence (group C) and in the presence (group CM) of previous MMF administration (n=8). The rats were submitted to an evaluation of renal function and systolic blood pressure (PAS), as well as that in the renal cortex, markers of oxidative stress, activity of Na<sup>+</sup> transporting ATPases and protein content of the AT1 receptor for angiotensin II (AT1R) were evaluated, the NFκB p65 subunit and the inflammatory cytokines TNF-α and IL-6. The differences between the experimental groups were analyzed using the 2-way analysis of variance followed by the Tukey test. In the first 24 hours after LPS administration, in relation to group C, a marked increase in urinary flow and serum levels of urea and creatinine was observed. After 2 weeks, the animals treated with LPS showed serum markers of renal function similar to group C, whereas, in the 4th week after AKI, creatinine clearance was reduced. In the late period, LPS-induced AKI, an increase in SBP was also observed, as well as an increase in renal lipid peroxidation in parallel with an increase in NADPH oxidase activity. In addition, it was observed that the LPS-treated group showed opposite changes in the activity of Na<sup>+</sup> transporting ATPases in the renal cortex: greater the activity of ouabaine-sensitive (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) ATPase and less activity of furosemide-sensitive (Na<sup>+</sup>) ATPase. These changes were not accompanied by changes in the renal cortical protein content of AT1R, NFκB or inflammatory cytokines. Previous MMF treatment prevented acute elevation of serum creatinine and urea levels in response to LPS, as well as late changes in creatinine clearance, SBP, increased renal oxidative stress and NADPH oxidase activity. On the other hand, MMF increased the activity of (Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup>) ATPase in addition to the effect already induced by LPS, while it prevented the decrease in (Na<sup>+</sup>) ATPase activity. Taken together, the data from the present study show that sepsis-induced AKI promotes late changes in renal oxidative stress and proximal Na<sup>+</sup> tubular transport that may favor the onset of chronic kidney tissue damage and hypertension, as well as that these changes must be partially dependent on activation of the immune system.

**Keywords:** Tubular ATPases, Oxidative Stress, Hypertension, Acute Kidney Injury, LPS, Mycophenolate mofetil, Immune system.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Resumo esquemático das principais alterações pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que ocorre na sepse. Fonte: Angus & Van Der Poll et al. 2013 ..... | 20 |
| Figura 2: Representação esquemática da (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ) ATPase. Fonte: Aires, 2008.....                                                        | 24 |
| Figura 3: Resumo esquemático dos componentes do sistema renina angiotensina. Fonte: CORRÊA; TAKALA; JAKOB. (2015).....                                           | 26 |
| Figura 4: representação da estrutura da NADPH oxidase e suas subunidades. fonte: Assari, 2006. ....                                                              | 28 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADH – Hormônio antidiurético

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida, do inglês acquired immunodeficiency syndrome

ANG 1-7 – Angiotensina 1-7

ANG I – Angiotensina I

ANG II – Angiotensina II

AP I – Proteína ativadora I

AT<sub>1</sub>R- Receptor do tipo AT<sub>1</sub>

AT<sub>2</sub>R – Receptor do tipo AT<sub>2</sub>

ATP – Adenosina trifosfato

(Ca<sup>2+</sup>)ATPase – Calcio ATPase

CAT – Catalase

Células NK – Células Natural Killers

CIVD – Coagulação intravascular disseminada

Co-transportador (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>) – Co-transportador Sódio potássio 2 cloros

DAMPS – Padrões moleculares associados ao dano, do inglês damage associated molecular patterns

DNA- do inglês deoxyribonucleic acid

DRC – Doença renal crônica

ECA 1 – Isoforma 1 da enzima conversora de angiotensina

ECA 2 – Isoforma 2 da enzima conversora de angiotensina

GPx – glutathione peroxidase

(H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) ATPase – Hidrogênio potássio ATPase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peroxido de hidrogênio

HA – Hipertensão arterial

ICAM 1- molécula de adesão intercelular 1 do inglês: *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IL-1 – Interleucina 1

IL 1 $\beta$  – Interleucina 1 beta

IL 6 – Interleucina 6

IFN- $\gamma$  -Interferon  $\gamma$

IRC- Insuficiência renal crônica

K<sup>+</sup> – Potássio

LPS – Lipopolissacarídeo

LRA – Lesão renal aguda

MMF – micofenolato de mofetil

Na<sup>+</sup> - Sódio

(Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) ATPase – Sódio potássio ATPase

(Na<sup>+</sup>) ATPase – Sódio ATPase

NADPH oxidase - Nicotinamida adenina/ dinucleotídeo fosfato, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NF $\kappa$ B – Fator nuclear kappa B, do inglês: *Nuclear factor kappa B*

NOX 1 – NADPH oxidase 1

NOX 2 – NADPH oxidase 2

NOX 4 – NADPH oxidase 4

NOX 5 – NADPH oxidase 5

NTA – Necrose tubular aguda

O<sub>2</sub>• – Radical superóxido

OH• – Radical hidroxila

PA – Pressão arterial

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos, do inglês: *Pathogen-associated molecular pattern*

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês: *ribonucleic acid*

ROS – Espécies reativas do oxigênio, do inglês: *Reactive oxygen species*

SOD – superóxido desmutase

SRA – Sistema renina-Angiotensina-Aldosterona

TLRS – Receptores Semelhantes a Toll, do inglês: *toll-like receptors*

TNF  $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa, do inglês: *tumoral necrosis factor alpha*

Trocador ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) – Trocador sódio hidrogênio

UTI – Unidade de terapia intensiva

VCAM 1 – molécula de adesão celular vascular 1, do inglês: *Vascular cell adhesion protein 1*

## SUMÁRIO

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                       | 15 |
| 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....                                            | 18 |
| 2.1    SEPSE .....                                                        | 18 |
| 2.2    LESÃO RENAL INDUZIDA POR SEPSE.....                                | 20 |
| 2.3    LESÃO RENAL AGUDA E HIPERTENSÃO.....                               | 22 |
| 2.4    TRANSPORTE TUBULAR DE SÓDIO.....                                   | 22 |
| 2.5    SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.....                                   | 24 |
| 2.6    ESTRESSE OXIDATIVO .....                                           | 26 |
| 2.6.1    Estresse oxidativo pela NADPH oxidase .....                      | 27 |
| 2.7    SISTEMA IMUNE NA HIPERTENSÃO E LESÃO RENAL .....                   | 28 |
| 3. OBJETIVOS .....                                                        | 30 |
| 3.1 Geral.....                                                            | 30 |
| 3.2 Específicos .....                                                     | 30 |
| 4.REFERÊNCIAS .....                                                       | 31 |
| 5. CONCLUSÕES.....                                                        | 37 |
| 6. ANEXO I – ARTIGO .....                                                 | 38 |
| 7. ANEXO II – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal – UFPE..... | 66 |

## 1. INTRODUÇÃO

A sepse é considerada uma síndrome clínica com elevado nível de mortalidade e alta prevalência em pacientes hospitalizados. Sua fisiopatologia é complexa, multifatorial, e não está completamente elucidada, entretanto, sabe-se que a sua principal característica é o aumento da resposta inflamatória que acarreta em disfunção múltipla de órgãos, principalmente por hipoperfusão (KEMPKER; MARTIN 2016; FLEISCHMANN *et al.* 2016; MACHADO *et al.* 2017;). O rim é um dos principais órgãos acometidos pela sepse, e a lesão renal aguda (LRA) nesses pacientes apresenta elevada frequência (DAHER *et al.* 2008). A lesão ocorre devido alterações na microcirculação renal, como o vasorelaxamento, além do dano causado pelo estresse oxidativo, citocinas e pelos leucócitos ativados. Apesar de em muitos casos haver recuperação da função tubular, o dano endotelial permanece, e em longo prazo pode ocorrer disfunção renal progressiva, consequentemente, levando a doença renal crônica (DRC) (ASKENAZI *et al.* 2018). Além disso, subjacente a esse quadro, a LRA aumenta o risco do desenvolvimento da hipertensão arterial (BORTOLOTTI. 2008).

Durante a evolução da LRA para a DRC, um dos principais segmentos do néfron impactados é o túbulo proximal (SOI; YEE, 2017). Este segmento é de fundamental importância para a manutenção da homeostase hidroeletrolítica, reabsorvendo cerca de 60% do sódio presente no ultrafiltrado glomerular. Para ocorrer o transporte tubular de sódio, é necessário o gradiente de sódio proveniente do transporte ativo primário, gerado pela ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) ATPase sensível a ouabaína, presente na membrana basolateral das células do túbulo proximal (AIRES, 2008). Além disso, também há participação da ( $\text{Na}^+$ ) ATPase sensível a furosemida que tem sua função associada ao ajuste fino do gradiente do  $\text{Na}^+$  (ROCAFULL; THOMAS; DEL CASTILLO, 2012).

O sistema renina angiotensina (SRA) também possui um papel importante na fisiopatologia da lesão renal induzida por sepse (DOERSCHUG *et al.* 2010). A angiotensina II além de sua ação clássica onde promove vaso constrição das arteríolas glomerulares, através da estimulação do seu receptor  $\text{AT}_1$ , também contribui com a maior reabsorção de sódio via ativação da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase (JAITOVICH & BERTORELLO. 2010), como também promove o estresse oxidativo, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês reactive oxygen species) (BENIGNI, CASSIS & REMUZZI. 2010).

O estresse oxidativo, por sua vez, interfere na reabsorção de sódio através da modulação das ATPases transportadoras de  $\text{Na}^+$ . Os grupamentos sulfidrilas da

(Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase são sensíveis a oxidação (Boldyrev & Kurella, 1996). A formação de ROS pode ser proveniente de diversas fontes, contudo, a NADPH oxidase se destaca no tecido renal, principalmente em situações relacionadas a LRA e DRC (BEDARD & KRAUSE. 2007). Dados do nosso grupo de pesquisa demonstram que em modelo de hipertensão programada no ambiente intrauterino, o estresse oxidativo renal é responsável pelo aumento da atividade da (Na<sup>+</sup>) ATPase, alteração que deve ser importante na etiologia do aumento dos níveis pressóricos (Vieira-Filho *et al.* 2014). No modelo de lesão renal pela administração de LPS, é demonstrado aumento da expressão de NOX 1 e 5 (HOLTERMAN *et al.* 2019), e o sistema imune contribui para o aumento da ativação destas enzimas (AL-HARBI *et al.* 2019).

O sistema imune é capaz combater patógenos, como também promover cicatrização e restauração da função de tecidos lesionados. Essas funções são auxiliadas pelo sistema imune inato, que é a primeira linha de defesa do organismo, ocorrendo imediatamente após lesão ou infecção, e envolve células como macrófagos, e neutrófilos. (TOMAR; DE. 2014) Essas células possuem receptores do tipo toll, e reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS), o resultado desse reconhecimento, resulta numa cascata de eventos que promove liberação de citocinas como interleucina 1 (IL 1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que promovem uma série de reações, que resultam na migração de leucócitos para o local da lesão. (TOMAR; DE. 2014) Paralelamente, o sistema imune adaptativo também age para potencializar as respostas inatas, onde o papel predominantemente é de linfócitos, que respondem a células apresentadoras de antígenos, como também são responsáveis pela memória imunológica mediada por anticorpos (NATOLI; OSTUNI. 2019)

O sistema imune também tem um importante papel na etiologia da lesão renal e da hipertensão (Bagatini *et al.* 2017). O sistema imune inato é ativado por moléculas associadas ao dano celular (DAMPs) gerando citocinas que podem contribuir positivamente para inflamação (Strober *et al.* 2011). O ciclo de ativação imune está relacionado com o aumento da produção de ROS e o aumento do risco cardiovascular e renal (Betjes *et al.* 2013, Yatim *et al.* 2015). Um estudo realizado por Al-Harbi *et al.* (2019) mostra que a inibição de citocinas inflamatórias atenua a lesão renal por sepse em paralelo a inibição da NOX2, mostrando a importância dessa via na lesão renal induzida pela sepse.

O micofenolato de mofetila (MMF) é um fármaco imunossupressor que atua inibindo a enzima inosina monofosfato desidrogenase, necessária na biossíntese *denovo* de purinas. Este efeito está associado com a inibição da proliferação de linfócitos T e B e seu principal uso clínico é em pacientes transplantados, para impedir a rejeição do órgão (RANG *et al.* 2015). Seu efeito anti-inflamatório é benéfico na lesão orgânica causada pela sepse, pois

diminuiu a infiltração leucocitária, e inibição de citocinas pro-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (DUREZ *et al.* 1999; GARGAH, GOUCHA-LOUZIR & LAKHOUA. 2010; BEDUSCHI *et al.* 2013).

Com base nestas informações, é plausível sugerir a LRA induzida pela sepse, juntamente com participação do sistema imune, leva a alterações oxidativas que afetam o transporte tubular de Na<sup>+</sup> no túbulo proximal, fatores que aumentam o risco do desenvolvimento tardio de lesão renal e hipertensão. Dessa forma, investigamos se a LRA induzida por sepse promove alterações tardias na atividade da NADPH oxidase e nas ATPases transportadoras de Na<sup>+</sup> do túbulo proximal que podem contribuir para o aumento dos níveis pressóricos. Adicionalmente, investigamos se a imunossupressão prévia a LRA poderia atenuar essas alterações e assim demonstrar o papel-chave do sistema imune nesse processo.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 SEPSE

A Sepsé pode ser definida por uma resposta exacerbada do sistema imunológico a agentes infecciosos, como bactérias, fungos, vírus e protozoários, sendo considerada uma das principais causas de morte em unidades de tratamento intensivo (UTI) (ILAS. 2015). Nos Estados Unidos, um estudo feito por Kempker & Martin (2016) mostrou que ocorre aproximadamente 300 a 1000 casos de sepsé a cada 100.000 pessoas. No Brasil, um estudo realizado por Machado *et al.* (2017) mostrou que 72% dos pacientes que ocupavam leitos de UTI apresentavam sepsé, que apresenta uma incidência de 420.000 casos por ano, sendo que destes, 230.000 morrem no hospital. Em uma perspectiva mundial, estima-se que ocorra 31,5 milhões de casos de sepsé anualmente, ocorrendo aproximadamente 5,3 milhões de mortes por ano (FLEISCHMANN *et al.* 2016).

Os fatores de risco para sepsé estão ligados a predisposição do paciente para infecção e a disfunção orgânica se for acometido ao processo infeccioso. Idade, sexo, presença de doenças crônicas (como doença pulmonar obstrutiva crônica), câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e o uso de imunossupressores são fatores de risco conhecidos (ANGUS & VAN DER POLL, 2013). A prevalência de sepsé é maior em crianças e idosos do que em outras faixas etárias, é maior em homens em relação às mulheres e maior em negros em relação à caucasianos (ANGUS & VAN DER POLL, 2013).

A fisiopatologia da sepsé é complexa, multifatorial e não está totalmente elucidada, entretanto, são conhecidas alterações imunológicas no hospedeiro, como ativação de vias pró e anti-inflamatórias, além de alterações neuroendócrinas e nos fatores da coagulação que levam a hipoperfusão tecidual e disfunção orgânica (ARWYN-JONES & BRENT. 2019). A fisiopatologia da sepsé envolve o reconhecimento de estruturas microbianas por células do sistema imune inato, como os macrófagos e mastócitos, através de receptores de reconhecimento padrão como os receptores do tipo Toll (TLRs). Esses receptores são capazes de reconhecer e se ligar a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) como o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias gram-negativas, bem como podem reconhecer padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMPs), que são estruturas celulares do hospedeiro que podem surgir no ambiente extracelular, como DNA, RNA, e proteínas histonas, que são liberadas durante o dano tecidual (TAKEUCHI & AKIRA. 2010; CHAN *et al.* 2012). A ligação dessas estruturas com o receptor, inicia uma cascata de sinalização intracelular, resultando na ativação de fatores de transcrição como o

NF $\kappa$ B, e proteína ativadora 1 (AP-1), ativando genes envolvidos na resposta inflamatória, resultando na formação de citocinas pró inflamatórias, como interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  TNF- $\alpha$ , fatores de coagulação, e substâncias vasoativas como óxido nítrico (ARWYN-JONES & BRENT. 2019). Adicionalmente, ocorre a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), e a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), que contribuem para que leucócitos polimorfonucleares, tais como neutrófilo ou eosinófilo migrem para o foco de infecção, que juntamente com outros tipos de célula, como macrófagos, realizam fagocitose de patógenos no tecido infectado (ARWYN-JONES & BRENT. 2019). Concomitante ao status inflamatório exacerbado, também é recorrente a alterações no sistema de coagulação, onde prevalece o papel pró-coagulante, em detrimento da atenuação de proteínas anticoagulantes, podendo levar ao quadro de coagulação intravascular disseminada (CIVD) (ANGUS & VAN DER POLL. 2013).

Na sepse, também é conhecido o papel da resposta anti-inflamatória, que ocorre como um mecanismo compensatório a resposta inflamatória exacerbada (ANGUS & VAN DER POLL. 2013). Nessa situação, os fagócitos, mudam para um fenótipo anti-inflamatório e a modulação da inflamação ocorre por mecanismos neuroendócrinos, onde neurônios sensoriais aferentes que possuem receptores do tipo TLRs e receptores para interleucina 1 (IL1) enviam sinais para o tronco cerebral, que por sua vez, ativam vias eferentes que culminam com supressão das células imunes na produção de moléculas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL6 (ANDERSSON & TRACEY *et al* 2012). O status anti-inflamatória pode se tornar um problema, pois, pode levar ao quadro de imunossupressão, levando o indivíduo a infecções secundárias, que causa maiores danos em vários órgãos (ANDERSSON & TRACEY 2012).

A disfunção orgânica que ocorre em vários órgãos, é decorrente de múltiplos fatores. A lesão endotelial ocorre por mecanismos que envolvem espécies reativas de oxigênio, e enzimas líticas liberadas por leucócitos polimorfonucleares aderidos as células endoteliais, além disso, ocorre lesão por ação direta do LPS no endotélio, que leva ao aumento da permeabilidade vascular, e edema (GOLDENBERG *et al* 2011). O estresse oxidativo também leva a dano mitocondrial, e consequente liberação de macromoléculas, como DNA mitocondrial, que no ambiente extracelular pode ativar neutrófilos, e aumentar ainda mais a lesão (ZHANG *et al* 2010). E em paralelo a esses eventos, os órgãos também sofrem por hipoperfusão devido a hipotensão e formação de trombos (ANGUS & VAN DER POLL. 2013).

O tratamento da sepse é evidente a importância de se promover ressuscitação cardiorrespiratória, como o uso de reposição volêmica e administração de drogas vasoativas, controlar a infecção, com antibiótico terapia (CECCONI *et al.* 2018), como também a terapia imunomodulatória (ANGUS & VAN DER POLL. 2013). Entretanto, o desenvolvimento de novas terapias é estritamente necessário, tendo em vista que ainda há alta mortalidade nos pacientes com sepse, principalmente devido a lesão renal que ocorre nesses pacientes. (CECCONI *et al.* 2018).

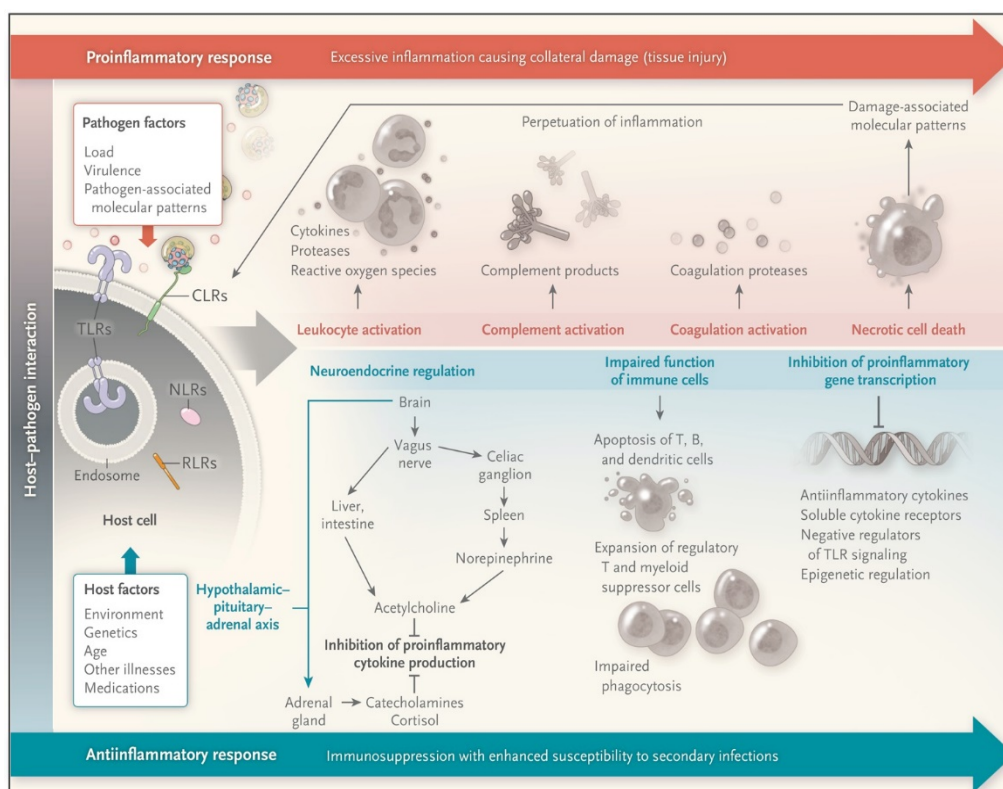


Figura 1: Resumo esquemático das principais alterações pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que ocorre na sepse. Fonte: Angus & Van Der Poll *et al.* 2013

## 2.2 LESÃO RENAL INDUZIDA POR SEPSE.

O rim é um dos principais órgãos que são vulneráveis aos efeitos da sepse, podendo levar ao quadro de lesão renal aguda (LRA). Os rins são os órgãos responsáveis pela manutenção de volume, da filtração do líquido extracelular, também como produção de hormônios como eritropoetina e renina. (AIRES, 2008). A LRA é um quadro clínico de retenção de resíduos metabólicos nitrogenados na corrente sanguínea que ocorre por uma redução na capacidade funcional renal em um curto espaço de tempo. A disfunção renal que ocorre na sepse, é responsável pela alta mortalidade em pacientes, e ocorre por diversos

fatores, incluindo estresse oxidativo e alteração no fluxo sanguíneo (GOMEZ *et al.* 2014). Daher *et al.* (2008) mostraram que de 722 pacientes internados em UTI para doenças infecciosas, 17,7% apresentavam LRA, enquanto que em outro estudo realizado por Bagshaw *et al.* (2009) foi mostrado que mais de 60% de pacientes adultos com sepse desenvolveram LRA.

Devido as alterações na microcirculação renal, por conta do vasorelaxamento que ocorre na sepse, os capilares peritubulares renais, apresentam fluxo sanguíneo lento, além das células endoteliais expressarem maior quantidade de ICAM-1 e VCAM-1 (WU *et al.* 2007). A consequência disso é a maior exposição das células endoteliais e tubulares renais, a citocinas secretadas por leucócitos ativados, como também a PAMPs e DAMPs. Tais marcadores inflamatórios, também podem ser filtrados pelos glomérulos e reconhecidos por células tubulares renais através de um mecanismo dependente de receptores TLR-4, que tem sua expressão aumentada na sepse (EL-ACHKAR *et al.* 2008), e que estão presentes na membrana apical e basolateral, como também no citoplasma das células tubulares renais (GOOD, GEORGE & WATTS *et al.* 2009). O reconhecimento do LPS, se inicia nas células do segmento S1 do túbulo proximal, levando a um aumento do estresse oxidativo em células adjacentes (seguimentos S2 e S3) (KALAKECHE *et al.* 2011). Além disso, também há evidências que mostram que o LPS destrói as zônulas de oclusão entre as células tubulares renais, fazendo com que haja perda da integridade e polaridade do epitélio tubular (ZHENG *et al.* 2018).

Durante a sepse, devido a disfunção microvascular, as células epiteliais tubulares acionam mecanismos adaptativos com o objetivo de minimizar o gasto energético da célula e manter a sobrevivência celular. Porém, mesmo com a viabilidade celular preservada, há prejuízo na sua função (GOMEZ *et al.* 2014). Um estudo realizado por Good, George & Watts (2009) mostrou que o LPS pode inibir a absorção de  $\text{HCO}_3^-$ , e que esse efeito é mediado pela ativação de receptores TLR4. Em um modelo de sepse grave, foi observado a diminuição da expressão do trocador ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) em células tubulares renais (SCHMIDT *et al.* 2007), bem como em células epiteliais intestinais, através de um mecanismo dependente da ativação de receptores TLR2 (CHE *et al.* 2018). A sepse também já foi correlacionada com aumento da excreção fracionada de sódio por diminuição da expressão do co-transportador ( $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ ) e ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) ATPase (SCHMIDT *et al.* 2007).

As alterações renais observadas na LRA induzida pela sepse podem culminar em hipercalcemia, acidose metabólica e depleção de volume (FARRAR. 2018; ASKENAZI *et al.* 2018). Além disso, a LRA pode progredir para doença renal crônica (DRC) e insuficiência

renal crônica, pois mesmo que ocorra a recuperação da função tubular, o dano endotelial pode permanecer e induzir fibrose intersticial, disfunção renal progressiva e perda completa da função renal (ASKENAZI *et al.* 2018). Nesse caso, pode ser necessário o uso de terapias de substituição renal, como a hemodiálise e a necessidade de transplante renal (FARRAR. 2018).

### 2.3 LESÃO RENAL AGUDA E HIPERTENSÃO

Durante a sepse, ocorre a necrose tubular aguda (NTA) causada por lesão direta do LPS ou do sistema imune, como também lesão isquêmica das células tubulares devido a hipoperfusão tecidual, neste momento ocorre intensa reabsorção de sódio, com o intuito de restaurar o volume intravascular (NUNES *et al.* 2010), Caso não ocorra recuperação da perfusão tecidual, o dano celular se torna irreversível, levando a insuficiência renal, e concomitante a esse processo, falha no mecanismo de excreção de sódio (NUNES *et al.* 2010). No desbalanço do sódio que ocorre na lesão renal, podemos destacar o papel do hormônio antidiurético (ADH) e angiotensina II (ANG II) que podem atuar no aumento da pressão arterial, através do aumento da reabsorção de sódio e água, respectivamente, e dessa forma promovem o aumento do volume plasmático. ( SANTOS *et al.* 2012; QIAN *et al.* 2018).

O desbalanço na homeostase do sódio leva ao quadro de hipertensão arterial (HA), que possui importante papel na fisiopatologia renal de curso crônico. A hipertensão está diretamente relacionada com as disfunções renais, podendo ser a causa ou a consequência (BORTOLOTTI. 2008). A hipertensão arterial é causada pelo aumento do débito cardíaco, e da resistência vascular periférica, também é caracterizada por pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mmHg, e a diastólica 90 mmHg (7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016). Sua patogênese é multifatorial, e durante a insuficiência renal crônica (IRC), está associada com a perda progressiva da capacidade do rim de excretar sódio, e consequentemente sobrecarga de volume plasmático, aumento de substâncias vasoconstrictoras, e diminuição de substâncias vasodilatadoras, como as prostaglandinas e óxido nítrico (BORTOLOTTI. 2008; MONHART. 2013; HAWKINS-VAN DER CINGEL 2019).

### 2.4 TRANSPORTE TUBULAR DE SÓDIO

O túbulo proximal é um dos principais segmentos do néfron responsável pela homeostase hidroeletrólito (AIRES, 2008). O túbulo proximal reabsorve cerca de 60% do

sódio presente no ultrafiltrado glomerular, sendo realizado principalmente pelo trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , mas também através do co-transporte com solutos orgânicos, como glicose e aminoácidos, e ânions orgânicos (AIRES, 2008). A energia utilizada para o transporte do sódio na membrana luminal, é proveniente do gradiente de sódio entre o lumem do túbulo e o interior da célula, gerado pela enzima  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , presente na membrana basolateral das células do túbulo proximal (AIRES, 2008).

A  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  é uma proteína heterodimérica composta de duas subunidades ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Na subunidade  $\alpha$ , que é formada por cerca de 1000 aminoácidos e tem peso molecular de aproximadamente 110 kDa. Nessa estrutura são encontrados os sítios de fosforilação, e os aminoácidos essenciais para ligação dos cátions. A subunidade  $\beta$ , que possui cerca de 300 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 50 kDa, possui um único domínio transmembrana, e sua associação com a subunidade  $\alpha$  facilita a sua inserção na membrana (LIU *et al.* 2012). É uma enzima da família das ATPases do tipo P, como a  $(\text{H}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  e a  $(\text{Ca}^{2+})\text{ATPase}$ , que possuem características em comum, como a presença de um resíduo aspartil no sítio catalítico que é fosforilado pelo ATP, bem como a existência de dois estados conformacionais distintos o E1 e E2, durante o ciclo catalítico (LIU *et al.* 2012).

Uma outra ATPase também responsável pela formação do gradiente iônico necessário para a reabsorção de sódio é a  $(\text{Na}^+)\text{ATPase}$ . Sabe-se a atividade desse transportador é cerca de 10 vezes menor do que a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , e sua ação está associada ao ajuste fino do gradiente de  $\text{Na}^+$  transmembrana. A  $(\text{Na}^+)\text{ATPase}$  é formada por duas subunidades, a  $\alpha$  que tem o peso molecular de aproximadamente 90 kDa, e a  $\beta$ , com cerca de 50 kDa. Sua atividade pode ser inibida pela furosemida, porém, é insensível a ouabaína (ROCAFULL, THOMAS & DEL CASTILLO, 2012).

Sabe-se que o transporte tubular de sódio é um fator importante para a regulação da pressão arterial e vários estudos demonstram a correlação entre transportadores de sódio e a fisiopatogenia da hipertensão. Um estudo realizado por IWAMOTO *et al.* (2006), mostrou que polimorfismos no gene da  $\alpha$ -aducina, uma proteína do citoesqueleto que regula a atividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ , em indivíduos hipertensos. Além disso, situações como lesão renal persistente, na doença renal crônica, é observado alteração no balanço de sódio acompanhado de redução do ritmo de filtração glomerular, aumento do estresse oxidativo e ativação do sistema renina angiotensina (SRA) (SOI & YEE, 2017). Dessa forma, há o estabelecimento de um ciclo vicioso, onde a progressão da DRC leva a hipertensão, que por sua vez, causa mais dano renal (BASTOS *et al.* 2010; SOI & YEE, 2017). Outro fator envolvido no desbalanço de sódio é o SRA e o estresse oxidativo (SOI & YEE, 2017). A

ANG II, promove vasoconstrição das arteríolas glomerulares, diminuindo o fluxo sanguíneo renal, além de apresentar ações direta no aumento da reabsorção de sódio (JAITOVICH & BERTORELLO. 2010).

O estresse oxidativo por sua vez, pode atuar estimulando ou atenuando a reabsorção de sódio. Um estudo feito por Boldyrev e Kurella (1996), mostrou que a modificação oxidativa causa diminuição da atividade da  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ , devido as alterações nos grupos sulfidrilas da enzima. Em outro estudo, a diminuição causada pelo estresse oxidativo, foi observada na  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$  de cerebelo (PETRUSHANKO *et al.* 2006). Por outro lado, dados do nosso grupo de pesquisa demonstram que o estresse oxidativo é responsável pelo aumento da atividade da  $(\text{Na}^+)\text{ATPase}$  em ratos submetidos ao estresse oxidativo placentário, e que tal situação pode predispor a hipertensão arterial (Vieira-Filho *et al.* 2014).

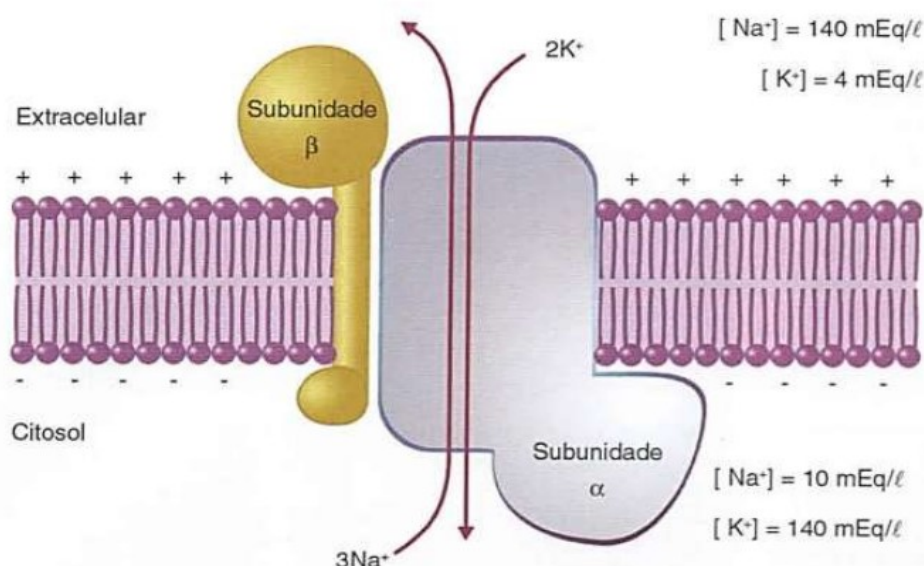


Figura 2: Representação esquemática da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$ . Fonte: Aires, 2008.

## 2.5 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

O sistema renina angiotensina (SRA), classicamente atua na manutenção da pressão arterial (PA) e no balanço hidroeletrólítico (AIRES, 2008). Sua ação clássica tem como primeiro componente a renina, que é formada nas células justa glomerulares, e secretada na circulação sistêmica. Sua síntese é estimulada pela queda da pressão arterial, ativação do nervo simpático renal, e com a redução da concentração de NaCl na macula densa (AIRES, 2008). A renina atua no seu substrato angiotensinogênio, que é produzido nos hepatócitos,

onde é clivado em um decapeptídeo angiotensina I (ANG I), que por sua vez é convertida a angiotensina II (ANG II). A conversão de ANG I ocorre de forma sistêmica através da presença da enzima conversora de angiotensina I (ECA I) nas células endoteliais, como o pulmão é um tecido altamente capilarizado, a maior parte da conversão ocorre nos capilares pulmonares. A ECA I também age clivando a bradicinina em fragmentos inativos, reduzindo sua ação vasodilatadora. Sua ação principal consiste em vaso constrição, e na estimulação da reabsorção de sódio, como também na liberação de vasopressina (AIRES, 2008). Por outro lado, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2), cliva a angiotensina II, formando a angiotensina 1-7 (ANG 1-7), que possui papel antagônico a angiotensina II (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI. 2010).

A angiotensina II age por meio de dois receptores acoplados a proteína G, porém, com ações antagônicas. Os receptores de angiotensina do tipo I (AT<sub>1</sub>R) e receptores de angiotensina do tipo II (AT<sub>2</sub>R) (AIRES, 2008). A ativação do receptor AT<sub>1</sub>R promove a maioria das ações clássicas da angiotensina II, como aumento da pressão arterial, liberação de aldosterona, e reabsorção de sódio no túbulo proximal. Efeitos contrários são produzidos com a ligação da angiotensina II ao receptor AT<sub>2</sub>R, que induz vasorelaxamento e natriurese (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI. 2010).

Além de suas ações clássicas, a angiotensina II possui ação parácrina em vários órgãos, como o rim, coração, e tecido adiposo. Sua ação exacerbada nesses órgãos, pode exercer ação pró-inflamatória, estimulando a produção de citocinas e quimiocinas, além de possui ação proliferativa, fibrótica e pró-oxidativa (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI. 2010).

Durante a sepse, devido as alterações vasculares que levam o intenso vasorelaxamento, há um aumento da secreção de renina pelas células justaglomerulares com objetivo de reverter a hipotensão ajustando a pressão arterial, levando ao aumento dos níveis plasmáticos de ANG I e ANG II, que, por sua vez, quando elevados estão associados com a piora do prognóstico da sepse (CORRÊA, TAKALA, e JAKOB. 2015). Um estudo realizado por Doerschug *et al.* (2010) mostrou que a disfunção microvascular em pacientes com sepse, estava associada com a ativação do SRA. Sua ativação excessiva contribui para o aumento do estresse oxidativo e da disfunção endotelial, que aumenta a lesão em órgãos como o rim e o pulmão.

Além disso, na sepse também ocorre modulação negativa dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> devido a resposta exacerbada do sistema imune. Um estudo realizado por Bucher *et al.* (2001), mostrou essa regulação negativa em órgãos de ratos com choque séptico, e tais alterações podem ocorrer devido a ação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ ,

interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) levando a hipotensão sistêmica, apesar do aumento da renina plasmática e da angiotensina II.

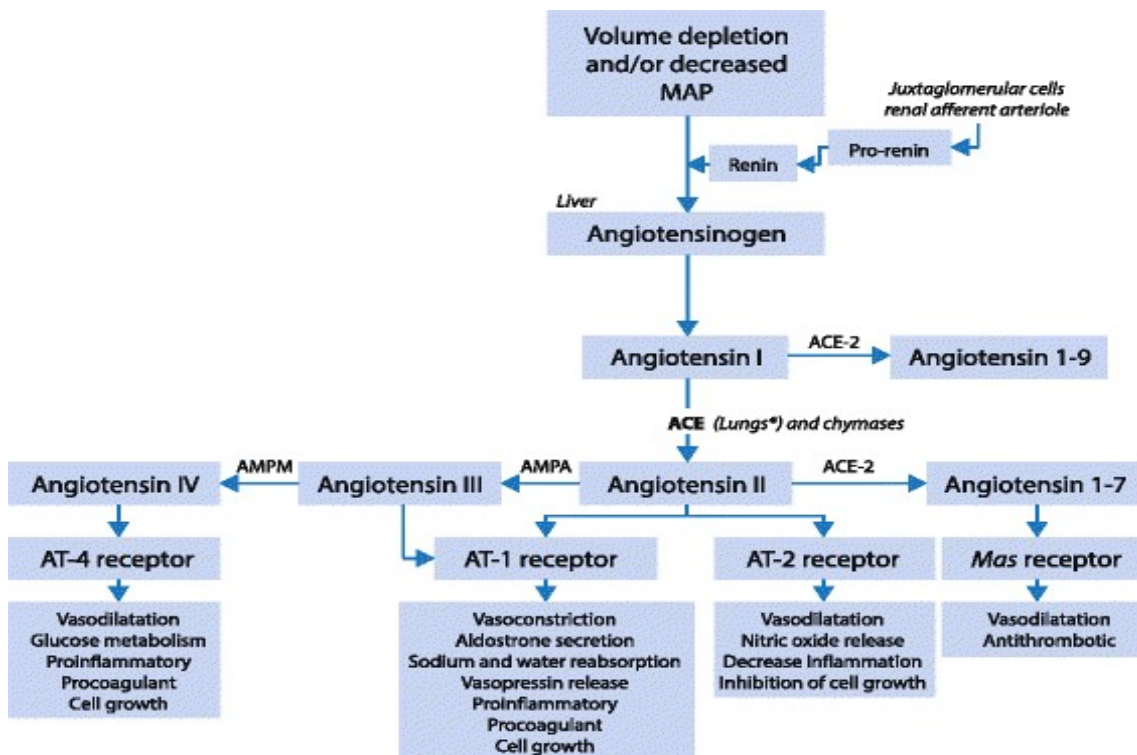


Figura 3: Resumo esquemático dos componentes do sistema renina angiotensina. Fonte: CORRÊA; TAKALA; JAKOB. (2015)

## 2.6 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é uma condição celular, onde ocorre um desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês reactive oxygen species), e sua remoção, que ocorre mediante a ação de enzimas antioxidantes (BARBOSA *et al.* 2010). Esse fenômeno ocorre subjacente ao desenvolvimento de diversas patologias, e seu papel na está relacionado com a sua interação com várias biomoléculas, como os lipídios da membrana celular, polissacarídeos, proteínas e o próprio DNA, resultado em dano celular e tecidual (BARBOSA *et al.* 2010).

A principal via metabólica do oxigênio, ocorre nas mitocôndrias durante síntese de ATP, mediante a enzima citocromo oxidase, que oxida 4 moléculas de citocromo c, e remove um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são destinados ao oxigênio, que sofre redução tetravalente, formando 2 moléculas de água. No entanto, o oxigênio pode sofrer redução

univalente e originar ROS, onde os principais são os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (BEDARD & KRAUSE. 2007).

Além da via mitocondrial, a formação de ROS pode ser proveniente de outras fontes, como a ação da enzima citocromo P450, peroxissomos, e pela enzima NADPH oxidase, tendo esta última um importante papel no desenvolvimento de diversas doenças, inclusive nos processos de lesão renal aguda e crônica (BEDARD & KRAUSE. 2007).

Para reduzir os danos causados pelos ROS, a célula dispõe de mecanismos antioxidante, que tem como papel, impedir ou atenuar a oxidação. Esses mecanismos podem acontecer através de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), que agem impedindo a ação deletéria dos ROS sobre as células (BARBOSA *et al.* 2010). O sistema antioxidante também envolve proteção mediada por compostos não-enzimáticos, que podem ser provenientes da dieta, como o ácido ascórbico, o  $\alpha$ -tocoferol e o  $\beta$ -caroteno, bem como podem ser produzidos endogenamente, como a glutathione reduzida (GSH) (BARBOSA *et al.* 2010).

As ROS formadas podem desempenhar importantes papéis na fisiologia e desenvolvimento, como na formação de matriz extracelular (JIANG *et al.* 2014), nefrogênese (VIEIRA-FILHO *et al.* 2011), e na modulação do sistema renina angiotensina (ZHONG *et al.* 2011), como também em diversas patologias, como nas lesões renais agudas e crônicas (RATLIFF *et al.* 2016) e doença cardíaca (SPADARI *et al.* 2018).

#### 2.6.1 Estresse oxidativo pela NADPH oxidase

A NADPH oxidase (NOX) é representada por uma classe de enzimas multiprotéicas transmembrana, cujo protótipo é formado pelo citocromo b558 (composto de 2 subunidades, a glicoproteína gp91phox/NOX2 e a proteína p22phox) presente na membrana plasmática, e que quando ativada, se liga à 3 proteínas presentes no citoplasma (p40phox, p47phox, p67phox) e uma pequena GTPase Rac2 (nos neutrófilos) ou Rac1 (nos monócitos) (BEDARD & KRAUSE. 2007). A família possui 7 diferentes constituições que variam de acordo com a subunidade catalítica: NOX1-5 e DUOX1-2 (BEDARD & KRAUSE., 2007). Sua atividade produz superóxido ou peróxido de hidrogênio de um modo dependente de NADPH (MAGNANI *et al.* 2019).

Sabe-se que a NADPH oxidase é expressa no tecido renal. As isoformas NOX 1, NOX2, NOX4 e NOX5 foram observadas em células epiteliais tubulares, de túbulo proximal distal e ducto coletor (WOLF *et al.* 2001; SHIOSE *et al.* 2001; FUJII, ZHANG & KOSAKA. 2007), como também em endotélio (ARAUJO *et al.* 2014). Sua atividade em níveis basais é de

extrema importância na homeostase renal, pois o superóxido formado, age como sinalizador de diversas vias, tendo papel na proliferação e crescimento celular, como também na formação de matriz extracelular (JIANG *et al* 2014). O dano celular é proveniente quando há maior formação de ROS e a defesa antioxidante não consegue suprir a demanda, resultando no aumento do estresse oxidativo (RATLIFF *et al.* 2016). No modelo de lesão renal pela administração de LPS, foi demonstrado que podócitos de camundongos e de humanos, aumentaram a expressão de receptores TLR, como também de NOX 1 e 5, levando ao surgimento de estresse oxidativo (HOLTERMAN *et al.* 2019). Além disso, um estudo realizado por Al-Harbi *et al.* (2019) mostrou que a inibição de citocinas inflamatórias atenua a lesão renal por sepse em paralela a inibição da NOX2, mostrando a importância dessa via na lesão renal induzida pela sepse.

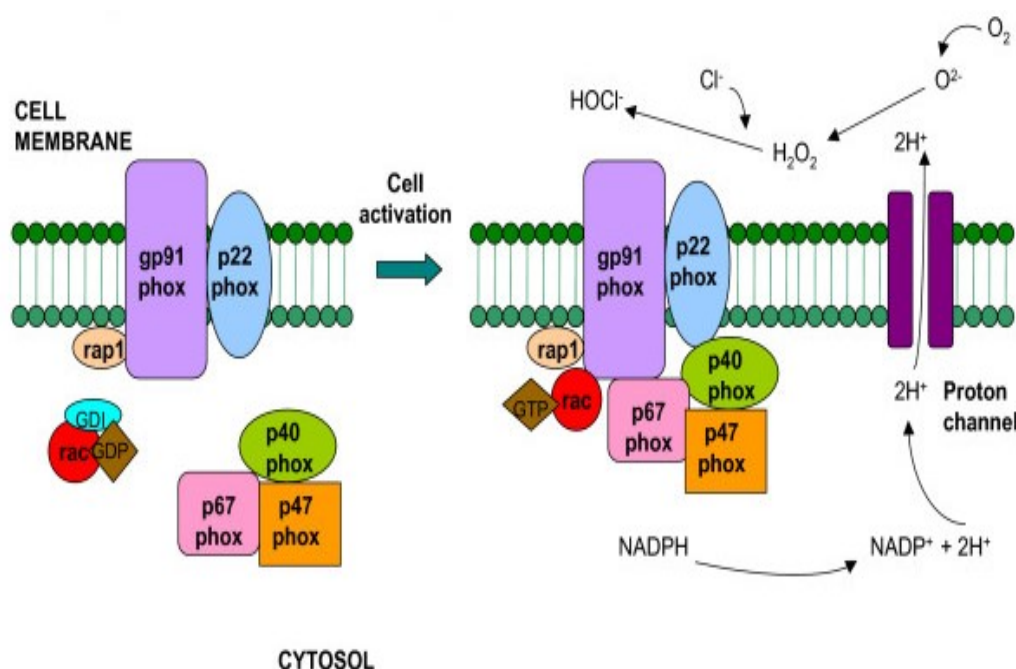


Figura 4: representação da estrutura da NADPH oxidase e suas subunidades. fonte: Assari, 2006.

## 2.7 SISTEMA IMUNE NA HIPERTENSÃO E LESÃO RENAL

Sabe-se que o sistema imune está envolvido na homeostase e no desenvolvimento da lesão renal, bem como na hipertensão arterial. Estudos mostram que existe uma grande população leucocitária no rim, composta de células natural killer (NK), linfócitos T CD4+ e T CD8+, e tais células estão presentes mesmo no estado saudável do rim, podendo agir no combate a patógenos circulantes (TURNER *et al.* 2018). Entretanto, durante a lesão renal, se observa a liberação de DAMPs pelas células tubulares que sofrem apoptose, sendo observado maior infiltração de células T e monócitos (TURNER *et al.* 2018).

Estudos mostram que durante a lesão renal terminal, é evidente a infiltração de monócitos pró-inflamatórios do tipo CD14+ e CD16+, também como células T CD4+ e CD28+. Tais células também estão associadas ao maior risco cardiovascular, pois estão envolvidas na desestabilização de placas ateroscleróticas (BETJES. 2013). Adicionalmente, essas células podem participar do desenvolvimento da hipertensão. Estudos em ratos espontaneamente hipertensos mostram que a diminuição de células T no timo está associada com o aumento da pressão arterial, e que a restauração da função deste órgão é acompanhada de melhora dos níveis pressóricos (RODRÍGUEZ-ITURBE et al. 2002). Em outro trabalho usando a mesma linhagem de ratos, foi relatada elevada infiltração de células T CD4+ e CD8+, e que a redução do número dessas células também reduz pressão arterial (RODRÍGUEZ-ITURBE et al. 2004).

O micofenolato de mofetila (MMF) é um fármaco derivado de um antifúngico, que após ser metabolizado, é convertido no ácido micofenólico, que inibe a enzima inosina monofosfato desidrogenase, enzima necessária na biossíntese (*de novo*) de purinas. A consequência desta inibição, é a redução da proliferação de linfócitos T e B, também como a produção de linfócitos T citotóxicos. Seu uso terapêutico ocorre em pacientes recém transplantados, com o objetivo de impedir a rejeição de órgão recebido (RANG *et al.* 2015). Diversos estudos mostram o efeito protetor do MMF por mecanismos anti-inflamatórios, por diminuição da infiltração leucocitária, inibição dos níveis de TNF- $\alpha$ , óxido nítrico e IL-1 $\beta$ , bem como aumento da produção de interleucina 10 (IL-10) (DUREZ *et al.* 1999; GARGAH, GOUCHA-LOUZIR & LAKHOUA. 2010; BEDUSCHI *et al.* 2013). O uso do MMF também foi associado a redução da hipertensão: a administração de MMF é acompanhada de atenuação da hipertensão sistêmica bem como de redução da infiltração de macrófagos, linfócitos, do número de células positivas para angiotensina II, e do estresse oxidativo (RODRÍGUEZ-ITURBE et al. 2002). Em outro estudo do mesmo autor, o MMF foi capaz de impedir a hipertensão em ratos da linhagem *sprague dawley* sensíveis ao sal juntamente com diminuição da infiltração de células T (RODRÍGUEZ-ITURBE et al. 2001).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Investigar em ratos Wistar a contribuição do sistema imune para o surgimento das alterações do transporte de  $\text{Na}^+$  e estresse oxidativo no túbulo proximal observadas tardiamente a lesão renal aguda induzida por sepse.

#### 3.2. Específicos

Investigar em ratos Wistar tardiamente a lesão renal aguda induzida pela administração de LPS, na presença e na ausência de tratamento prévio com micofenolato de mofetila (imunossupressor):

- i. Pressão arterial sistólica;
- ii. Marcadores de função renal (depuração de creatinina, concentração sérica de ureia, e proteinúria);
- iv. Peroxidação lipídica e níveis de glutathione reduzida no rim e no fígado;
- v. Atividade da NADPH oxidase no córtex renal;
- v. Atividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sensível à ouabaína no córtex renal;
- vi. Atividade da  $(\text{Na}^+)\text{ATPase}$  sensível à furosemida no córtex renal;
- vii. Expressão do AT1R da angiotensina II, do NF- $\kappa$ B, da IL-6 e do TNF- $\alpha$  no córtex renal.

## 4 REFERÊNCIAS

7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**. v.107, nº 3, Supl. 3, 2016.

AIRES, Margarida de Mello. **Fisiologia**. 2008.

AL-HARBI, Naif O. *et al.* Amelioration of sepsis-induced acute kidney injury through inhibition of inflammatory cytokines and oxidative stress in dendritic cells and neutrophils respectively in mice: Role of spleen tyrosine kinase signaling. **Biochimie**, v. 158, p. 102-110, 2019.

ANDERSSON, Ulf; TRACEY, Kevin J. Reflex principles of immunological homeostasis. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 313-335, 2012.

ANGUS, Derek C.; VAN DER POLL, Tom. Severe sepsis and septic shock. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 9, p. 840-851, 2013.

ARAUJO M, Wilcox CS. Oxidative stress in hypertension: role of the kidney. **Antioxid Redox Signal** v.20: p.74-101, 2014

ARWYN-JONES, James; BRENT, Andrew J. Sepsis. **Surgery (Oxford)**, 2019.

ASKENAZI, David *et al.* Acute kidney injury and chronic kidney disease. In: Avery's Diseases of the Newborn. **Content Repository Only**. p. 1280-1300. e5. 2018

ASSARI, Tracy. Chronic granulomatous disease; fundamental stages in our understanding of CGD. **Medical immunology**, v. 5, n. 1, p. 4, 2006.

BAGATINI, Margarete Dulce *et al.* Immune system and chronic diseases. **Journal of immunology research**, v. 2017, 2017.

BAGSHAW, Sean M. *et al.* Acute kidney injury in septic shock: clinical outcomes and impact of duration of hypotension prior to initiation of antimicrobial therapy. **Intensive care medicine**, v. 35, n. 5, p. 871-881, 2009./

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, 2010.

BASTOS, Marcus Gomes; BREGMAN, Rachel; MASTROIANNI KIRSZTAJN, Gianna. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 2010.

BEDARD, Karen; KRAUSE, Karl-Heinz. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.

BEDUSCHI, M. G. *et al.* Mycophenolate mofetil has potent anti-inflammatory actions in a mouse model of acute lung injury. **Inflammation**, v. 36, n. 3, p. 729-737, 2013.

BENIGNI, Ariela; CASSIS, Paola; REMUZZI, Giuseppe. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. **EMBO molecular medicine**, v. 2, n. 7, p. 247-257, 2010.

BETJES, Michiel GH. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 9, n. 5, p. 255, 2013.

BOLDYREV, Alexander; KURELLA, Ekaterina. Mechanism of oxidative damage of dog kidney Na/K-ATPase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 222, n. 2, p. 483-487, 1996.

BORTOLOTTI, Luiz Aparecido. Hipertensão arterial e insuficiência renal crônica. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 15, n. 3, p. 152-5, 2008.

BUCHER, Michael *et al.* Downregulation of angiotensin II type 1 receptors during sepsis. **Hypertension**, v. 38, n. 2, p. 177-182, 2001.

CECCONI, Maurizio *et al.* Sepsis and septic shock. **The Lancet**, v. 392, n. 10141, p. 75-87, 2018.

Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, *et al.* Alarmins: awaiting a clinical response. **Journal of Clinical Investigation**; v. 122 p.2711-2719.2012

CHE, Hao *et al.* The regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers by Toll-like receptors under inflammation. **Sheng li xue bao:[Acta physiologica Sinica]**, v. 70, n. 5, p. 521-530, 2018.

CORRÊA, Thiago D.; TAKALA, Jukka; JAKOB, Stephan M. Angiotensin II in septic shock. **Critical care**, v. 19, n. 1, p. 98, 2015.

DAHER, Elizabeth F. *et al.* Acute kidney injury in an infectious disease intensive care unit-an assessment of prognostic factors. **Swiss medical weekly**, v. 138, n. 0910, 2008.

DOERSCHUG, Kevin C. *et al.* Renin-angiotensin system activation correlates with microvascular dysfunction in a prospective cohort study of clinical sepsis. **Critical Care**, v. 14, n. 1, p. R24, 2010.

DUREZ, Patrick *et al.* Antiinflammatory properties of mycophenolate mofetil in murine endotoxemia: inhibition of TNF- $\alpha$  and upregulation of IL-10 release. **International journal of immunopharmacology**, v. 21, n. 9, p. 581-587, 1999.

EL-ACHKAR, T. M.; HOSEIN, M.; DAGHER, P. C. Pathways of renal injury in systemic gram-negative sepsis. **European journal of clinical investigation**, v. 38, p. 39-44, 2008.

FARRAR, Ashley. Acute Kidney Injury. **Nursing Clinics**, v. 53, n. 4, p. 499-510, 2018.

FLEISCHMANN, Carolin *et al.* Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 193, n. 3, p. 259-272, 2016.

FUJII, Shigemoto; ZHANG, Ling; KOSAKA, Hiroaki. Albuminuria, expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and monocyte chemoattractant protein-1 in the renal tubules of hypertensive Dahl salt-sensitive rats. **Hypertension Research**, v. 30, n. 10, p. 991, 2007.

GARGAH, Tahar; GOUCHA-LOUZIR, Rim; LAKHOUA, Mohamed Rachid. Place du mycophénolate mofétil dans la néphropathie lupique proliférative de l'enfant. **Néphrologie & Thérapeutique**, v. 6, n. 7, p. 564-568, 2010.

GOLDENBERG, Neil M. *et al.* Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. **Science translational medicine**, v. 3, n. 88, p. 88ps25-88ps25, 2011.

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 (Augusta, Ga.)**, v. 41, n. 1, p. 3, 2014.

GOOD, David W.; GEORGE, Thampi; WATTS III, Bruns A. Lipopolysaccharide directly alters renal tubule transport through distinct TLR4-dependent pathways in basolateral and apical membranes. 2009.

HAWKINS-VAN DER CINGEL, Gerlineke; THURAISINGHAM, Raj. Management of hypertension in renal disease. **Medicine**, 2019.

HOLTERMAN, Chet E. *et al.* Podocyte NADPH oxidase 5 promotes renal inflammation regulated by the Toll-like receptor pathway. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 30, n. 15, p. 1817-1830, 2019.

INSTITUTO LATINO AMERICANO PARA ESTUDOS DA SEPSE (ILAS). Sepsis: um problema de saúde pública. 2015.

IWAMOTO, T.; KITA, S. Hypertension,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. **Kidney Int**, v.69, p.2148–2154, 2006.

JAITOVICH, Ariel; BERTORELLO, Alejandro M. Salt,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and hypertension. **Life sciences**, v. 86, n. 3-4, p. 73-78, 2010.

JIANG, Fan *et al.* NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- $\beta$ -mediated fibrotic responses. **Redox biology**, v. 2, p. 267-272, 2014.

KALAKECHE, Rabih *et al.* Endotoxin uptake by S1 proximal tubular segment causes oxidative stress in the downstream S2 segment. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 8, p. 1505-1516, 2011.

KEMPKER, Jordan A.; MARTIN, Greg S. The changing epidemiology and definitions of sepsis. **Clinics in chest medicine**, v. 37, n. 2, p. 165-179, 2016.

LIU, Jiang *et al.* Reactive oxygen species modulation of Na/K-ATPase regulates fibrosis and renal proximal tubular sodium handling. **International journal of nephrology**, v. 2012, 2012.

MACHADO, Flavia R. *et al.* The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis prevalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180-1189, 2017.

MAGNANI, Francesca; MATTEVI, Andrea. Estrutura e mecanismos de geração de ROS por NADPH oxidases. **Opinião atual em biologia estrutural**, v. 59, p. 91-97, 2019.

MONHART, Václav. Hypertension and chronic kidney diseases. **cor et vasa**, v. 55, n. 4, p. e397-e402, 2013.

NATOLI, Gioacchino; OSTUNI, Renato. Adaptation and memory in immune responses. **Nature Immunology**, v. 20, n. 7, p. 783-792, 2019.

NUNES, Tiago Ferolla *et al.* Insuficiência renal aguda. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 43, n. 3, p. 272-282, 2010.

PETRUSHANKO, I. *et al.* Na-K-ATPase in rat cerebellar granule cells is redox sensitive. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 4, p. R916-R925, 2006.

QIAN, Qi. Salt, water and nephron: Mechanisms of action and link to hypertension and chronic kidney disease. **Nephrology**, v. 23, p. 44-49, 2018.

RANG, Rang *et al.* **Rang & Dale Farmacologia**. Elsevier Brasil, 2015.

RATLIFF, Brian B. *et al.* Oxidant mechanisms in renal injury and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 25, n. 3, p. 119-146, 2016.

ROCAFULL, Miguel A.; THOMAS, Luz E.; DEL CASTILLO, Jesús R. The second sodium pump: from the function to the gene. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 463, n. 6, p. 755-777, 2012.

RODRÍGUEZ-ITURBE, Bernardo *et al.* Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from angiotensin II exposure. **Kidney international**, v. 59, n. 6, p. 2222-2232, 2001.

RODRÍGUEZ-ITURBE, Bernardo *et al.* Reduction of renal immune cell infiltration results in blood pressure control in genetically hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 282, n. 2, p. F191-F201, 2002.

RODRÍGUEZ-ITURBE, Bernardo *et al.* Evolution of renal interstitial inflammation and NF- $\kappa$ B activation in spontaneously hypertensive rats. **American journal of nephrology**, v. 24, n. 6, p. 587-594, 2004.

SANTOS, Paulo Caleb Junior Lima; KRIEGER, Jose Eduardo; PEREIRA, Alexandre Costa. Renin–angiotensin system, hypertension, and chronic kidney disease: pharmacogenetic implications. **Journal of pharmacological sciences**, v. 120, n. 2, p. 77-88, 2012.

SCHMIDT, Christoph *et al.* Regulation of renal sodium transporters during severe inflammation. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, n. 4, p. 1072-1083, 2007.

SHIOSE, Akira *et al.* A novel superoxide-producing NAD (P) H oxidase in kidney. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 2, p. 1417-1423, 2001.

SOI, Vivek; YEE, Jerry. Sodium homeostasis in chronic kidney disease. **Advances in chronic kidney disease**, v. 24, n. 5, p. 325-331, 2017.

SPADARI, Regina Celia *et al.* Role of beta-adrenergic receptors and sirtuin signaling in the heart during aging, heart failure, and adaptation to stress. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 38, n. 1, p. 109-120, 2018.

TAKEUCHI, Osamu; AKIRA, Shizuo. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TOMAR, Namrata; DE, Rajat K. A brief outline of the immune system. In: Immunoinformatics. **Humana Press**, New York, NY, 2014. p. 3-12.

TURNER, Jan-Eric *et al.* Tissue-resident lymphocytes in the kidney. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 29, n. 2, p. 389-399, 2018.

VIEIRA-FILHO, L.D. *et al.* Renal molecular mechanisms underlying altered Na handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. **British Journal of Nutrition**, v.111, p.1932–1944. 2014.

VIEIRA-FILHO, Leucio D. *et al.* Alpha-tocopherol prevents intrauterine undernutrition-induced oligonephronia in rats. **Pediatric Nephrology**, v. 26, n. 11, p. 2019-2029, 2011.

WOLF, Gunter *et al.* Antioxidant treatment induces transcription and expression of transforming growth factor  $\beta$  in cultured renal proximal tubular cells. **FEBS letters**, v. 488, n. 3, p. 154-159, 2001.

W. Strober and I. J. Fuss, “Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases,” **Gastroenterology**, vol. 140, no. 6, pp. 1756–1767, 2011.

WU, Xiaoyan *et al.* The role of ICAM-1 in endotoxin-induced acute renal failure. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 293, n. 4, p. F1262-F1271, 2007.

YATIM, Nader *et al.* RIPK1 and NF- $\kappa$ B signaling in dying cells determines cross-priming of CD8<sup>+</sup> T cells. **Science**, v. 350, n. 6258, p. 328-334, 2015.

ZHANG, Qin *et al.* Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 104, 2010.

ZHENG, Shixiang *et al.* Lipopolysaccharide Mediates the Destruction of Intercellular Tight Junction among Renal Tubular Epithelial Cells via RhoT1/SMAD-4/JAM-3 Pathway. **International journal of medical sciences**, v. 15, n. 6, p. 595, 2018.

ZHONG, JiuChang *et al.* Prevention of angiotensin II–mediated renal oxidative stress, inflammation, and fibrosis by angiotensin-converting enzyme 2. **Hypertension**, v. 57, n. 2, p. 314-322, 2011.

## 5. CONCLUSÕES

Os dados do presente trabalho mostram que a LRA induzida por sepse promove alterações tardias do estresse oxidativo renal e do transporte tubular proximal de  $\text{Na}^+$  que podem favorecer o surgimento de lesões crônicas no tecido renal e hipertensão. Além disso, os dados sugerem que essas alterações são parcialmente dependentes do sistema imune, o que mostra que abordagens imunomoduladoras podem ser fundamentais na terapia da LRA com o objetivo de promover menores danos renais e de diminuir os riscos de surgimento de hipertensão tardia.

## 6. ANEXO I – ARTIGO

A LESÃO RENAL AGUDA INDUZIDA POR LPS PROMOVE HIPERTENSÃO TARDIA, ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÃO DO TRANSPORTE TUBULAR DE Na<sup>+</sup> DEPENDENTE DE ATP ATRAVÉS DE MECANISMOS SENSÍVEIS AO MICOFENOLATO DE MOFETILA

Lucas C. S. Siqueira<sup>1</sup>; Luís O. M. C. Lima<sup>1</sup>; Marry A. S. Cirilo<sup>1</sup>; Natália K. S. Lima<sup>1</sup>; Leucio D. Vieira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

Autor correspondente: Leucio D. Vieira Filho

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências –  
Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade  
Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

Fax: +55 81 2126 8976

Email: leucio.vieirafo@ufpe.br

## RESUMO

A lesão renal aguda (LRA) induzida por sepse é uma situação clínica que apresenta elevada morbidade/mortalidade. Além disso, a LRA per si é um fator de risco para o desenvolvimento de lesões renais tardias e hipertensão, mesmo quando há recuperação dos marcadores clínicos de função renal após o evento agudo. Essa relação pode ocorrer através de modificações no transporte tubular de  $\text{Na}^+$ , elevação do estresse oxidativo e ativação do sistema renina-angiotensina (SRA). Adicionalmente, tem sido descrito que o sistema imune apresenta um papel-chave nos mecanismos de lesão renal. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto tardio da LRA induzida por sepse no SRA, estresse oxidativo e na atividade das ATPases transportadoras de  $\text{Na}^+$  do túbulo proximal, bem como investigar se a imunossupressão pela administração de micofenolato de mofetil (MMF) é capaz de atenuar a indução dessas alterações em longo prazo. Para isso ratos Wistars (300-350 g, n=16) foram submetidos a indução de lesão renal através da administração de LPS (10 mg/kg, sc). Parte destes animais (n=8) recebeu dose única do MMF (30 mg/kg, via oral) 24h antes da administração do LPS. O grupo controle foi constituído por ratos submetidos a administração de NaCl 0,9% (1 ml/kg, sc) na ausência (n=8) e na presença (n=8) da administração prévia de MMF. Os ratos foram submetidos a avaliação da função renal e da pressão arterial sistólica (PAS), bem como que no córtex renal foram avaliados marcadores de estresse oxidativo, atividade das ATPases transportadoras de  $\text{Na}^+$  e conteúdo proteico do receptor AT1 para angiotensina II ( $\text{AT}_{1\text{R}}$ ), da subunidade p65 do NF $\kappa$ B e das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6. As diferenças entre os grupos experimentais foram analisadas utilizando-se a análise de variância de 2-vias seguida pelo teste de Tukey. Nas primeiras 24 horas após administração do LPS, em relação ao grupo C, observou-se um pronunciado aumento do fluxo urinário e dos níveis séricos de ureia e creatinina. Após 2 semanas, os animais tratados com LPS apresentaram marcadores séricos de função renal semelhantes ao grupo controle, enquanto que, na 4ª semana pós-LRA, o clearance de creatinina apresentou-se diminuído. No período tardio a LRA induzida pelo LPS, também foi observada elevação da PAS, bem como elevação da peroxidação lipídica renal em paralelo a um aumento da atividade da NADPH oxidase. Além disso, foi observado que o grupo tratado com LPS apresentou alterações opostas na atividade das ATPases transportadoras de  $\text{Na}^+$  no cortex corticis renal: maior a atividade da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase sensível a ouabaína e menor atividade da ( $\text{Na}^+$ )ATPase sensível a furosemida. Essas alterações não foram acompanhadas de mudanças no conteúdo proteico cortical renal do  $\text{AT}_{1\text{R}}$ , do NF $\kappa$ B ou das citocinas inflamatórias. O tratamento prévio com MMF preveniu a elevação aguda dos níveis séricos de creatinina e ureia em resposta ao LPS, bem como as alterações tardias no clearance de creatinina, na PAS e no aumento do estresse oxidativo renal e atividade da NADPH oxidase. Por outro lado, o MMF aumentou a atividade da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )ATPase adicionalmente ao efeito já induzido pelo LPS, enquanto que ele preveniu a diminuição da atividade da ( $\text{Na}^+$ )ATPase. Em conjunto, os dados do presente trabalho mostram que a LRA induzida por sepse promove alterações tardias do estresse oxidativo renal e do transporte tubular proximal de  $\text{Na}^+$  que podem favorecer o surgimento de lesões crônicas no tecido renal e hipertensão, bem como que essas alterações devem ser parcialmente dependentes de ativação do sistema imune.

**Palavras-chave:** ATPases Tubulares, Estresse Oxidativo, Lesão Renal, LPS, Micofenolato de mofetila.

## INTRODUÇÃO

A sepse é considerada uma síndrome clínica com elevado nível de mortalidade e alta prevalência em pacientes hospitalizados. Na fisiopatologia da sepse se destaca a inflamação sistêmica exacerbada, a hipoperfusão tecidual em diversos órgãos (ILAS. 2015), incluindo o rim, onde causa lesão renal aguda (LRA) (DAHER *et al.* 2008). A LRA ocorre devido alterações na microcirculação renal, bem como devido aos danos causados pelo estresse oxidativo e inflamação (GOMEZ *et al.* 2014). Apesar de em muitos casos haver recuperação da função renal, a LRA pode predispor a danos tardios que em longo prazo pode predispor a disfunção renal progressiva, surgimento de doença renal crônica (DRC) e aumento do risco do desenvolvimento de hipertensão arterial (BORTOLOTTI. 2008; ASKENAZI *et al.* 2018).

O túbulo proximal é um segmento do néfron de extrema importância para a homeostase do  $\text{Na}^+$ , bem como é um dos segmentos mais afetados na LRA induzida por sepse (KALAKECHE *et al.* 2011). A função do túbulo proximal é altamente dependente do gradiente de  $\text{Na}^+$  gerado ATPases transportadoras de  $\text{Na}^+$  presentes na membrana basolateral: a  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  sensível a ouabaina e a  $\text{Na}^+-\text{ATPase}$  sensível a furosemida (FÉRAILLE & DOUCET 2001; VIEYRA *et al.* 2016). Devido ao seu papel na homeostase do  $\text{Na}^+$ , alterações funcionais do túbulo proximal estão atreladas ao desenvolvimento de hipertensão (ROOS *et al.* 1984; CHIOLERO *et al.* 2000; WANG *et al.* 2009; VIEIRA-FILHO *et al.* 2014; D'ELIA *et al.* 2017).

O sistema renina angiotensina (SRA) também possui um papel importante no curso crônico da lesão renal e no aumento da pressão arterial (DOERSCHUG *et al.* 2010; SOI & YEE, 2017). A ativação exacerbada da via do receptor  $\text{AT}_1$  ( $\text{AT}_1\text{R}$ ) é descrita em diversos modelos de lesão renal e de hipertensão (NAVAR *et al.* 2011), e esses efeitos são parcialmente atrelados ao aumento da atividade das ATPases transportadoras de  $\text{Na}^+$  e aumento da reabsorção proximal (WANG *et al.* 2009; JAITOVICH & BERTORELLO. 2010; VIEIRA-FILHO *et al.* 2014). Além disso, a ativação do  $\text{AT}_1\text{R}$  também é capaz de modular a função celular através do aumento do estresse oxidativo, por induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) mediada pela ativação da NADPH oxidase que também é um fator importante na fisiopatologia da lesão renal crônica (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI. 2010).

O sistema imune também está relacionado com o aumento da produção de ROS e o aumento do risco de disfunção cardiovascular e renal (BETJES *et al.* 2013). Um estudo

realizado por Al-Harbi et al (2019) mostra que a inibição de citocinas inflamatórias atenua a lesão renal por sepse em paralela a inibição da NOX2, mostrando a importância dessa via na lesão renal induzida pela sepse. Além disso, o sistema imune apresenta uma estreita relação de co-regulação com o SRA que pode ser fundamental para a lesão tecidual crônica (RUDEMILLER et al. 2016).

Baseado nesses dados, é possível propor que a LRA causada pela sepse aumente o risco do surgimento tardio de doença renal crônica e hipertensão, através do estabelecimento de alterações funcionais relacionadas à ativação do SRA, inflamação e estresse oxidativo, que culminem em alterações no transporte de  $\text{Na}^+$  mediado pelas ATPases do túbulo proximal. Ainda é plausível estabelecermos a hipótese de que o sistema imune esteja delineando essas alterações. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto tardio da LRA induzida por sepse no SRA, estresse oxidativo e na atividade das ATPases transportadoras de  $\text{Na}^+$  do túbulo proximal, bem como investigar se a imunossupressão pela administração de micofenolato de mofetil (MMF) é capaz de atenuar a indução dessas alterações em longo prazo. O MMF é um fármaco que possui ação imunossupressora e já possui relatos de efeitos protetores nos danos celulares causados pela sepse (DUREZ *et al.* 1999; GARGAH, GOUCHA-LOUZIR & LAKHOUA. 2010; BEDUSCHI *et al.* 2013).

## MATERIAIS E METODOS

### Animais

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. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo nº 0066/2018) e conduzido de acordo com as diretrizes do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA).

Ratos adultos (300–350 g, n=16) foram submetidos a um modelo de indução de lesão renal através da administração de lipopolissacarídeo (LPS) obtido de *E. coli* (10 mg/kg de peso corpóreo, via subcutânea). Parte desses animais (n=8) recebeu um tratamento em dose única do imunossupressor micofenolato de mofetil (grupo LM; 30 mg/kg de peso corpóreo, via oral) 24 horas antes da administração do LPS ou solução de NaCl 0,9% (1 ml/kg, sc) (grupo L). A dose do micofenolato mofetil sugerida é capaz de prevenir a infiltração de macrófagos e a fibrose renal induzida pela isquemia/reperfusão (JIANG et al., 2012). O grupo Controle foi constituído por ratos submetidos a administração de NaCl 0,9% (1 ml/kg de peso corpóreo, via subcutânea), também na ausência (Grupo C, n=8) e na presença (grupo CM, n=8) de administração prévia de micofenolato de mofetila. Imediatamente após a indução da LRA, os ratos foram alocados em gaiolas metabólicas por um período de 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado após 2 e 4 semanas da administração de LPS e foram submetidos a avaliação da pressão arterial sistólica. Finalmente, os ratos foram anestesiados (cetamina e xilazina, 80 e 10 mg/kg de peso corpóreo, respectivamente) e foi realizada a coleta dos rins e uma amostra do fígado. Os ratos sofreram exsanguinação enquanto ainda estavam sob anestesia. Uma fração do córtex renal e do tecido hepático foi mantida em banho-de-gelo para avaliação da peroxidação lipídica e níveis de glutathiona reduzida. Da parte remanescente do tecido renal foi separada a região cortical que foi imediatamente congelada por imersão em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C. Estas amostras do tecido renal foi destinada a obtenção de homogenato do córtex renal e isolamento do *cortex corticis* com o auxílio de micrótomo manual.

### **Avaliação de parâmetros metabólicos, função renal e pressão arterial sistólica**

Os ratos foram alocados em gaiolas metabólicas por 24 horas onde o volume de urina, consumido hídrico e consumo de ração foram mensurados. Ao término do período, os animais foram submetidos a coleta de amostra sanguínea a partir da veia caudal. Os níveis séricos e urinários de creatinina e os níveis séricos de ureia foram avaliados através de sistemas comerciais de ensaios colorimétricos (Labtest, Lagoa Santa, Brasil). A excreção urinária de proteína foi avaliada a partir da dosagem de proteínas totais na urina através do método de folin fenol (LOWRY, 1951).

A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada através de método indireto em animais acordados, através de pletismografia da cauda (IITC Life Science B60-7/16, Life Science Instruments, Woodland Hills, EUA). Previamente a aquisição dos dados, os animais foram submetidos, por três dias consecutivos aos mesmos procedimentos experimentais para que ocorresse adaptação. Os animais foram colocados em um compartimento que limitava seus movimentos e foi acoplado um sensor de pulso ao redor de sua cauda. Em seguida, os animais foram mantidos em um ambiente aquecido a temperatura de 34°C por um período de 15–25 minutos para em seguida cinco medidas da PAS serem captadas sequencialmente.

### **Avaliação do estresse oxidativo**

O estresse oxidativo foi avaliado através da análise da peroxidação lipídica e dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em amostras de córtex renal e fígado. Amostras dos tecidos foram homogeneizadas em solução 150 mM de KCl e 3 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) mantida em banho-de-gelo. A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês thiobarbituric acid reactive substances), de acordo com Ohkawa et al. (1979). Os níveis de GSH foram determinados através da mensuração de grupamentos sulfidrila não-protéicos (SEDLAK & LINDSAY, 1968). Ambos resultados foram corrigidos pela concentração de proteína do homogenato.

### **Avaliação dos ânions superóxido e atividade da NADPH oxidase**

Os ânions superóxidos e a atividade da NADPH oxidase foram avaliados por quimiluminescência derivada da lucigenina. Amostras de córtex renal foram homogeneizadas em uma solução em banho de gelo contendo 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 1% de desoxicolato de sódio, 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), suplementado com inibidor de protease (AEBSF 2 mM, EDTA 1 mM, Bestatin 130 µM, E-64 14 µM, Leupeptina 1 µM, Aprotinina 0,3 µM). As amostras foram centrifugadas a

12.000 g durante 12 min a 4°C e o sobrenadante (1 mg/ml de proteína) foi pré-incubado a 37°C num meio de reação contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,02 M, pH 7,4) e 100 mM de NADPH. Em seguida, a lucigenina foi adicionada (10 µM) e a luminescência foi avaliada em 10 medidas de três segundos, com intervalo de 30 segundos entre si a 37°C (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Loughborough, Reino Unido). O resultado final foi apresentado como a soma da luminescência obtida nas 10 medições e expressa como as unidades relativas de luz (RLU) corrigidas pela quantidade de proteína na amostra. A luminescência avaliada na ausência de NADPH foi representativa da produção basal de ânions superóxidos.

### **Atividade das ATPases transportadoras de Na<sup>+</sup> do túbulo proximal**

As atividades da ATPase transportadoras de Na<sup>+</sup> foram avaliadas de acordo com o método descrito por Grubmeyer e Penefsky (1981) em amostras do *cortex corticis*. A atividade (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)ATPase nas amostras (0,1 mg/mL) foi calculada a partir da diferença de fosfato inorgânico (Pi) liberado na ausência e presença de ouabaína 2 mM, em um meio de reação composto de 50 mM de bis-Tris-propano (pH 7,4), 0,2 mM de EDTA, 5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 120 mM de NaCl. A reação de hidrólise foi iniciada pela adição de ATP (5 mM) e KCl (24 mM), e parada após 20 min pela adição de carvão ativado diluído em HCl 0,1 M. A atividade da Na<sup>+</sup>-ATPase nas amostras (0,5 mg/mL) foi calculada a partir da diferença de Pi liberado na ausência e presença de furosemida 2 mM, ambos na presença de ouabaína 2 mM, em meio de reação contendo 20 mM de HEPES-Tris (pH 7,0), 10 mM de MgCl<sub>2</sub> e 120 mM de NaCl. A reação de hidrólise foi iniciada pela adição de ATP (5mM) e parada após 20 min pela adição carvão ativado diluído em HCl 0,1 M. O Pi liberado foi mensurado espectrofotometricamente (620 nm) numa alíquota do sobrenadante obtido após centrifugação da suspensão de carvão, a 1.500 g por 5 min.

### **SDS-PAGE e Western Blotting**

O conteúdo proteico do AT<sub>1</sub>R, NFκB, TNF-α e IL-6 em amostras de *cortex corticis* foi estimado através imunodeteção pela técnica de *Western Blotting*. As proteínas (80 µg) do homogenato foram separadas utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, e transferidas a uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, G&E Healthcare). Após o bloqueio de sítios de ligação não-específica (leite desnatado 5%), as membranas de nitrocelulose foram incubadas com o anticorpo primário desejado. Em seguida, as membranas

foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase. As imuno-marcações foram visualizadas através de quimioluminescência (ECL Prime Reagent, G&E Healthcare) captada com o auxílio de um sistema fotodocumentador (Chemidoc MP, BioRad). A densitometria óptica da imuno-marcações dos blots foram avaliadas através de um programa de computador (ImageLab, BioRad). A proteínas-alvo tiveram sua quantificação normalizada de acordo com o conteúdo de  $\beta$ -actina.

Os anticorpos primários foram: anti-AT<sub>1</sub>R, diluição 1:500 (sc-57036; Santa-Cruz Biotechnologies, Dallas, EUA); anti-NF $\kappa$ B, diluição 1:500 (sc-8008; Santa-Cruz Biotechnologies); anti-interleucina-6, diluição 1:500 (IM-0407; Imuny Biotechnology, Campinas, Brasil); anti-TNF- $\alpha$ , diluição 1:1000 (IM-0406; Imuny Biotechnology); e anti- $\beta$ -actina, diluição 1:5000 (sc-47778; Santa-Cruz Biotechnologies).

### **Análise estatística**

Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). Primeiramente, foi avaliado se a distribuição dos dados de cada parâmetro era normal pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Considerando a distribuição normal dos dados, a diferença entre os grupos foi analisada usando a análise de variância de duas-vias seguida do teste de Tukey. As diferenças entre médias foram consideradas significativas para  $P < 0,05$ . A análise estatística e o desenho das figuras foram realizados usando o software GraphPad Prism 6 (versão 6.01, GraphPad Software, Inc.).

## RESULTADOS

### **Parâmetros metabólicos gerais, marcadores de função renal e PAS**

Os parâmetros metabólicos gerais e os dados de marcadores de função e lesão renal dos ratos após 24h da administração de LPS são apresentados na Tabela 1. Após 24 horas da administração do LPS, o peso corporal não foi diferente entre os grupos experimentais, no entanto, foi observado que os ratos tratados com LPS (grupo L e LM) apresentaram diminuição na ingestão de alimento: o consumo dietético dos grupos L e LM foi cerca de 40% menor ( $P<0,001$ ) do que os grupos C e CM, respectivamente. A administração do LPS não promoveu alteração do consumo hídrico entre os grupos, contudo o grupo L apresentou diurese 35% maior ( $P<0,05$ ) em comparação ao grupo C. Por outro lado, a diurese não foi estatisticamente diferente entre os grupos C, CM e LM.

Os marcadores funcionais renais avaliados após 24 horas da administração de LPS confirmam a indução de LRA. Os ratos que receberam a administração de LPS apresentaram níveis séricos de creatinina e ureia cerca de 20% maiores ( $P<0,05$ ) do que o grupo C, bem como apresentaram redução (23%;  $P<0,01$ ) do clearance de creatinina. Por outro lado, o tratamento com MMF preveniu as alterações nos níveis séricos de creatinina e ureia induzidas pela administração de LPS, ou seja, o grupo LM apresentou valores séricos de creatinina e ureia inferiores ( $P<0,01$ ) e clearance de creatinina superior ( $P<0,001$ ) ao grupo L. Além disso, esses parâmetros não foram estatisticamente diferentes entre os grupos C, CM e LM. Também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na proteinúria entre os grupos experimentais.

Duas semanas após a administração do LPS, não houve diferença estatística nos parâmetros metabólicos e funcionais renais entre os grupos experimentais (Tabela 2), contudo, podemos observar que a PAS do grupo LM foi suavemente inferior (5%,  $P<0,05$ ) em relação a do grupo L (Figura 1A).

Por outro lado, após 4 semanas da indução de LRA (Tabela 3), os animais do grupo L apresentaram maior diurese (24%;  $P<0,05$ ) do que o grupo C, bem como apresentaram novamente maiores níveis séricos de creatinina (24%;  $P<0,01$ ) e menor clearance de creatinina (23%;  $P<0,01$ ). Também foi observado aumento de cerca de 7 mmHg ( $P<0,01$ ) na PAS do grupo L em comparação ao grupo C (Figura 1B). Essas diferenças estatísticas não ocorreram entre o grupo C e os ratos LPS que tiveram tratamento prévio com MMF.

### **Estresse oxidativo renal e hepático**

O estresse oxidativo nos grupos experimentais foi investigado pela avaliação da peroxidação lipídica e dos níveis de glutatona reduzida no fígado e no córtex renal, bem como pela produção de ânions superóxido e a atividade da enzima NADPH oxidase no córtex do tecido renal após 4 semanas da indução da LRA (Figuras 2-4).

A administração de LPS induziu um importante aumento (44%;  $P<0,001$ ) na peroxidação lipídica no tecido renal em relação ao grupo C ( $P<0,001$ ), enquanto que essa alteração não foi observada nos ratos que foram previamente tratados MMF que apresentaram peroxidação lipídica renal cerca de 30% inferior ( $P<0,001$ ) ao grupo C (Figura 2A). Apesar da administração de LPS ter apresentado um impacto tardio na peroxidação lipídica renal, não foram observadas diferenças estatísticas na peroxidação lipídica hepática entre os grupos (Figura 2B). A administração de LPS também não foi capaz de alterar os níveis de GSH no rim e no fígado (Figura 3). Por outro lado, o tratamento prévio com MMF resultou em um aumento (24%;  $P<0,05$ ) dos níveis renais de GSH nos animais Controle (CM vs C).

No córtex renal, os níveis basais de ânions superóxido também foi aumentado em cerca de 50% ( $P<0,05$ ) no grupo que recebeu a administração do LPS em relação ao grupo C, enquanto que, no córtex renal do grupo LM, os níveis basais de ânions superóxido não foi estatisticamente diferente deste último (Figura 4A). A atividade da NADPH oxidase também foi maior (38%;  $P<0,01$ ) nos ratos L em relação ao grupo C, e esse efeito foi completamente prevenido pelo tratamento prévio com MMF ( $LM < L$ ;  $P<0,001$ ) (Figura 4B). O tratamento com MMF não induziu diferenças estatisticamente significantes nos níveis basais de ânions superóxido e na atividade da NADPH oxidase do grupo controle.

### **Transporte tubular proximal de $Na^+$ dependente de ATP**

No *cortex corticis* renal também foi avaliada a atividade das ATPases transportadoras de  $Na^+$  responsáveis pela geração do gradiente eletroquímico para reabsorção de diversos componentes do ultrafiltrado glomerular (Figura 5). A atividade da ( $Na^++K^+$ )ATPase sensível à ouabaína foi cerca de 50% maior ( $P<0,01$ ) nos animais submetidos a administração de LPS em relação ao grupo controle. Os animais que receberam tratamento com MMF apresentaram aumento da atividade deste transportador em relação aos grupos sem tratamento: o grupo CM apresentou atividade 40% maior ( $P<0,05$ ) do que o grupo C, enquanto que o grupo LM apresentou atividade 25% maior ( $P<0,05$ ) do que os ratos L.

Ao se avaliar o impacto tardio da LRA na atividade da ( $Na^+$ )-ATPase sensível à furosemida, foi observado que o grupo L apresentou atividade do transportador cerca de 40%

menor ( $P < 0,01$ ) que o grupo C ( $P < 0,01$ ) (Figura 5B). Por outro lado, o grupo LPS tratado com MMF não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C.

### **Imunodeteção do receptor AT<sub>1</sub>R e mediadores inflamatórios**

Simultaneamente a avaliação do estresse oxidativo renal e da atividade das ATPases transportadoras de Na<sup>+</sup>, foi avaliada a presença de alterações no conteúdo proteico no cortex corticis de vias de sinalização do SRA e inflamação que podem afetar esses parâmetros: AT<sub>1</sub>R, p65 NFκB, TNF-α e IL-6 (Figura 6). O tratamento com LPS não afetou o conteúdo de nenhuma das proteínas estudadas no *cortex corticis* em relação ao grupo Controle. Ao se avaliar o efeito do MMF, observa-se que o grupo CM apresentou maiores (61%;  $P < 0,05$ ) níveis proteicos de IL-6 do que o grupo C, bem como o grupo LM apresentou conteúdo proteico do AT<sub>1</sub>R mais de 40% maior ( $P < 0,05$ ) do que os grupos L e CM.

## DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi observado que a LRA induzida por sepse em ratos induziu elevação tardia da pressão arterial e diminuição do clearance de creatinina e que a imunossupressão prévia a indução da LRA protegeu o surgimento dessas alterações. Além disso, também foi observada elevação tardia do estresse oxidativo renal, elevação da atividade da NADPH oxidase e a presença de alterações funcionais das ATPases transportadoras de Na<sup>+</sup> no córtex, alterações que podem ser importantes para etiologia da hipertensão. A sepse é uma situação clínica de elevada incidência, onde é estimado que mundialmente ocorra 31,5 milhões de casos de sepse por ano, levando a aproximadamente 5,3 milhões de mortes por ano (FLEISCHMANN *et al.* 2016). O surgimento de LRA é um dos principais fatores de aumento de risco de morte em pacientes com sepse, bem como, a LRA também está envolvida com o aumento de risco tardio de desenvolvimento de DRC e hipertensão (COCA *et al.* 2012; JONES *et al.* 2012; SAWHNEY *et al.* 2017).

No presente estudo, foi observado que os animais que receberam administração de LPS, nas primeiras 24 horas, apresentaram redução do consumo alimentar que pode ser explicada por sintomas iniciais presentes na sepse como alterações na modulação da temperatura, confusão mental, astenia e letargia (ILAS. 2015). Também foi observado aumento da diurese no grupo experimental que recebeu LPS, situação que já foi relatada em outros estudos que avaliam os efeitos da sepse, juntamente com maior excreção de Na<sup>+</sup> (SCHMIDT *et al.* 2007; GOOD,GEORGE & WATTS *et al.* 2009; SALEH. 2014).

O aumento da ureia e creatinina sérica e a diminuição do clearance de creatinina nas primeiras 24 hora após a administração de LPS confirmou o estabelecimento de LRA. Por outro lado, o tratamento com MMF foi efetivo na prevenção do surgimento dessas alterações, o que indica a participação do sistema imune na disfunção renal causada pela sepse. A ação do MMF resulta na diminuição de linfócitos T e B circulantes por impedir sua proliferação e seu principal uso ocorre em pacientes transplantados (RANG *et al.* 2015). Contudo, já foi demonstrado que o MMF inibi a infiltração leucocitária, a expressão de interleucina 1 $\beta$  (IL 1 $\beta$ ) e TNF- $\alpha$  no pulmão de ratos submetidos a sepse por administração de LPS (BEDUSCHI *et al.* 2013). O efeito inibidor do MMF nos níveis de citocinas inflamatórias também já foi relatado no soro de camundongos submetidos a sepse (DUREZ *et al.* 1999). Na função renal, o efeito protetor renal do MMF já é descrito na glomerulonefrite induzida por lupus (GARGAH, GOUCHA-LOUZIR & LAKHOUA. 2010).

Sabe-se que após um episódio de LRA, os parâmetros clínicos que avaliam a função renal podem voltar ao normal posteriormente à doença. No entanto, devido à lesão pré-existente e não totalmente recuperada, a LRA aumenta o risco de doença renal progressiva tardia e hipertensão (COCA *et al.* 2012; HEUNG *et al.* 2012; JONES *et al.* 2012; SAWHNEY *et al.* 2017). Após 2 semanas da administração do LPS, os níveis séricos de creatinina e o clearance de creatinina indicaram a recuperação da função renal pós LRA. Contudo, após 4 semanas, o grupo LPS novamente apresentou a elevação da creatinina sérica e diminuição do clearance de creatinina, indicando a presença de disfunção renal. Além disso, também foi observada elevação da pressão arterial tardia a LRA. Da mesma forma que o MMF preveniu o surgimento das alterações agudas induzidas pelo LPS, ele também impediu o surgimento dessas mudanças tardias, o que sugere que o papel-chave do sistema imune nesse fenômeno.

Em nosso estudo, além do aumento da creatinina sérica e da PAS às 4 semanas, ocorreu concomitantemente o aumento do estresse oxidativo renal, evidenciado pelo aumento dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como também pelo aumento dos níveis de ânions superóxido. O estresse oxidativo possui importante papel na progressão e desenvolvimento da lesão renal para um quadro crônico, pois pode causar a apoptose celular através da estimulação da transcrição de genes que possuem papel na apoptose celular tais como os genes da família foxO e do NFkB (SMALL *et al.* 2012). Além disso, o aumento de superóxido também pode estimular a formação de fibrose por interagir com a citocina pró fibrótica TGF- $\beta$  (JIANG *et al.* 2014). O efeito tardio do estresse oxidativo renal aparentemente ocorre por mecanismo intrínsecos ao órgão uma vez que não foram observadas alterações da peroxidação lipídica hepática, um importante marcador do status oxidativo sistêmica (CONTRERAS-ZENTELLA *et al.* 2016).

As mudanças no status oxidativo renal foram evitadas pelo tratamento com MMF. Sabe-se que a inflamação contribui para progressão da lesão renal parcialmente através de efeitos oxidativos, e o MMF apresenta efeitos anti-inflamatórios por inibir a síntese de DNA em linfócitos T e B e em monócitos, o que leva a redução do número dessas células na circulação sanguínea (ALLISON & EUGUI, 1996). O status inflamatório causado pela sepse induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e TNF- $\alpha$ , secretadas por linfócitos T e macrófagos, respectivamente (SILVERSTEIN. 2009). Tais moléculas promovem o aumento de moléculas de adesão no endotélio dos capilares glomerulares, colaborando na adesão de linfócitos T ativados e monócitos, colaborando para a migração destes para o interstício e indução da lesão renal (SILVERSTEIN. 2009). No presente estudo, não foram observadas diferenças no conteúdo renal de IL-6 e TNF- $\alpha$ , bem como não foram

observadas alterações do conteúdo proteico do sinalizados intracelular pró-inflamatório NFkB. Esse achado não nos permite atribuir a participação desses mediadores inflamatórios na manutenção da disfunção renal e estresse oxidativo em longo prazo, contudo não podemos excluir a possibilidade que esses fatores tenham participado de lesões agudas durante a exposição ao LPS que foram prevenidas pelo efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores do MMF. Por outro lado, a ativação da NADPH oxidase tardia ao LPS deve representar um mecanismo importante para manutenção da disfunção renal e dos níveis pressóricos aumentados (COWLEY *et al.* 2015).

A predisposição renal ao desenvolvimento de lesões tardias à LRA ocorre parcialmente em virtude de recuperação inapropriada da função epitelial tubular (BASILE *et al.* 2016). Ao avaliarmos o transporte tubular de sódio, observamos que após 4 semanas, houve alterações causadas pelo LPS, onde foi evidenciado o aumento da atividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  e diminuição da  $\text{Na}^+-\text{ATPase}$ . O aumento da atividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  pode ser proposto pela estimulação direta do estresse oxidativo mediado pela NADPH oxidase (COWLEY *et al.* 2015). Além disso, nesse trabalho, a alteração da função desse transportador não pode ser atribuída a um aumento do conteúdo do AT1R no tecido renal, contudo não podemos excluir a participação do SRA nesse processo, uma vez que os efeitos do SRA podem ser modulados através da regulação de outros componentes (YANG & XU, 2017).

A reabsorção proximal de  $\text{Na}^+$  é fundamental na regulação da homeostase do  $\text{Na}^+$  e no estabelecimento de hipertensão. A regulação do transporte luminal de  $\text{Na}^+$  coordenado com a diminuição da atividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  são respostas importantes na natriurese pressórica (ZHANG *et al.* 1999, IVY; BAILEY. 2014), efeito que não parece ocorrer nos animais submetidos ao tratamento com LPS. Por outro lado, a diminuição da atividade da  $(\text{Na}^+)\text{ATPase}$  retrata um possível mecanismo compensatório ao aumento da atividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  e ao aumento dos níveis pressóricos (CARUSO-NEVES *et al.* 2001; CORTES *et al.* 2018; VIEYRA *et al.* 2016).

Curiosamente, foi observado que o tratamento prévio com MMF foi capaz de aumentar a atividade da  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  tanto no grupo Controle quanto nos animais que foram submetidos a administração de LPS. Além disso, o grupo LPS que foi tratado com MMF apresentou maiores níveis proteicos do AT<sub>1</sub>R. Ainda é precoce sugerir qual seria o impacto dessas alterações tardias a administração do MMF, contudo já tem sido descrito na literatura que esse fármaco não apresenta efeitos anti-hipertensivos ou nefrotóxicos (MORALES, 2002).

Resumidamente, os dados do presente trabalho mostram que a LRA induzida por sepse promove alterações tardias do estresse oxidativo renal e do transporte tubular proximal de  $\text{Na}^+$  que podem favorecer o surgimento de lesões crônicas no tecido renal e hipertensão. Além disso, os dados sugerem que essas alterações são parcialmente dependentes do sistema imune, o que mostra que abordagens imunomoduladoras podem ser fundamentais na terapia da LRA com o objetivo de promover menores danos renais e de diminuir os riscos de surgimento de hipertensão tardia.

## REFERÊNCIAS

- ALLISON, A. C.; EUGUI, E. M. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clinical transplantation*, v. 10, n. 1 Pt 2, p. 77-84, 1996.
- ASKENAZI, David et al. Acute kidney injury and chronic kidney disease. In: *Avery's Diseases of the Newborn. Content Repository Only*. e5 p. 1280-1300. 2018
- Basile DP. et al. Progression after AKI: Understanding Maladaptive Repair Processes to Predict and Identify Therapeutic Treatments. *Journal of the American Society of Nephrology*. v. 27 n. 3 p. 687-697. 2016
- BEDUSCHI, M. G. et al. Mycophenolate mofetil has potent anti-inflammatory actions in a mouse model of acute lung injury. *Inflammation*, v. 36, n. 3, p. 729-737, 2013.
- BETJES, Michiel GH. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. *Nature Reviews Nephrology*, v. 9, n. 5, p. 255, 2013.
- BENIGNI, A; CASSIS, P; REMUZZI, G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO molecular medicine*, v. 2, n. 7, p. 247-257, 2010.
- BORTOLOTTTO, L.A. Hipertensão arterial e insuficiência renal crônica. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 15, n. 3, p. 152-155, 2008.
- CARUSO-NEVES, C. et al. Regulation of the renal proximal tubule second sodium pump by angiotensins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.34 n. 8. p. 1079-1084. 2001
- CHIOLERO, A. et al. Proximal sodium reabsorption: an independent determinant of blood pressure response to salt. *Hypertension*, v. 36, n. 4, p. 631-637, 2000.
- COCA, S.G.; SINGANAMALA, S.; PARIKH, C.R. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney international*, v. 81, n. 5, p. 442-448, 2012.
- CONTRERAS-ZENTELLA M.L, HERNÁNDEZ-MUÑOZ R. Is Liver Enzyme Release Really Associated with Cell Necrosis Induced by Oxidant Stress? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v. 2016, 2016.
- CORTES A.L et al. Protective outcomes of low-dose doxycycline on renal function of Wistar rats subjected to acute ischemia/reperfusion injury. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. v. 1864 n. 1 p.102-114. 2018

- COWLEY A.W.J. et al. Reactive oxygen species as important determinants of medullary flow, sodium excretion, and hypertension. *American Journal of Renal Physiology*. 2015.
- D'ELIA, L. et al. Altered renal sodium handling and risk of incident hypertension: Results of the Olivetti Heart Study. *Plos One*, v. 12, n. 2, p. e0171973, 2017.
- DAHER, E.F. et al. Acute kidney injury in an infectious disease intensive care unit-an assessment of prognostic factors. *Swiss medical weekly*, v. 138, n. 0910, 2008.
- DOERSCHUG, K.C. et al. Renin-angiotensin system activation correlates with microvascular dysfunction in a prospective cohort study of clinical sepsis. *Critical Care*, v. 14, n. 1, p. R24, 2010.
- DUREZ, P. et al. Antiinflammatory properties of mycophenolate mofetil in murine endotoxemia: inhibition of TNF- $\alpha$  and upregulation of IL-10 release. *International journal of immunopharmacology*, v. 21, n. 9, p. 581-587, 1999.
- FÉRAILLE, E. D. A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiological Reviews*. v. 81 n. 1 p. 345-418. 2001
- GARGAH, T.; GOUCHA-LOUZIR, R.; LAKHOUA, M.R. Place du mycophénolate mofétíl dans la néphropathie lupique proliférative de l'enfant. *Néphrologie & Thérapeutique*, v. 6, n. 7, p. 564-568, 2010.
- GOOD, David W.; GEORGE, Thampi; WATTS III, Bruns A. Lipopolysaccharide directly alters renal tubule transport through distinct TLR4-dependent pathways in basolateral and apical membranes. 2009.
- 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 (Augusta, Ga.)*, v. 41, n. 1, p. 3, 2014.
- HEUNG, M.; CHAWLA, L. S. Predicting progression to chronic kidney disease after recovery from acute kidney injury. *Current opinion in nephrology and hypertension*, v. 21, n. 6, p. 628-634, 2012.
- ILAS. INSTITUTO LATINO AMERICANO PARA ESTUDOS DA SEPSE (ILAS). Sepsis: um problema de saúde pública. 2015.
- JAITOVICH, A.; BERTORELLO, A. M. Salt, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and hypertension. *Life sciences*, v. 86, n. 3-4, p. 73-78, 2010.
- JIANG, S.; Tang, Q.; Rong, R.; Tang, L.; Xu, M.; Lu, J.; Jia, Y.; Ooi, Y.; Hou, J.; Guo, J.; Yang, B.; Zhu, T. (2012) Mycophenolate mofetil inhibits macrophage infiltration and kidney fibrosis in long-term ischemia- reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*, 688, 56–61.

- JIANG, Fan et al. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- $\beta$ -mediated fibrotic responses. *Redox biology*, v. 2, p. 267-272, 2014.
- JONES J. et al. Association of complete recovery from acute kidney injury with incident CKD stage 3 and all-cause mortality. *American Journal of Kidney Diseases*. v.60 n. 3 p.402-8 2012.
- KALAKECHE, R. et al. Endotoxin uptake by S1 proximal tubular segment causes oxidative stress in the downstream S2 segment. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 22, n. 8, p. 1505-1516, 2011.
- LOWRY OH. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*.; n.193, p.265-275. 1951
- MORALES J.M. Influence of the new immunosuppressive combinations on arterial hypertension after renal transplantation. *Kidney International Supplements*. v.82 p.81-87. 2002
- NAVAR LG, KOBORI H, PRIETO M.C, GONZALEZ-VILLALOBOS R.A. Intratubular renin-angiotensin system in hypertension. *Hypertension*. v.57 p.355-362. 2011
- RANG, Rang et al. *Rang & Dale Farmacologia*. Elsevier Brasil, 2015.
- ROOS, J.C. et al. Intrarenal sodium handling during chronic spironolactone treatment. *Nephron*, v. 38, n. 4, p. 226-232, 1984.
- RUDEMILLER NP, CROWLEY SD. Interactions Between the Immune and the Renin-Angiotensin Systems in Hypertension. *Hypertension*. v68. p289-296. 2016
- SALEH, M.. Sepsis-associated renal salt wasting: how much is too much?. *Case Reports*, v. 2014, p. bcr2013201838, 2014.
- SAWHNEY, S. et al. Post-discharge kidney function is associated with subsequent ten-year renal progression risk among survivors of acute kidney injury. *Kidney international*, v. 92, n. 2, p. 440-452, 2017.
- SILVERSTEIN, D. M. Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease. *Pediatric nephrology*, v. 24, n. 8, p. 1445-1452, 2009.
- SMALL, D. M. et al. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology*, v. 17, n. 4, p. 311-321, 2012.
- SCHMIDT, Christoph et al. Regulation of renal sodium transporters during severe inflammation. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 18, n. 4, p. 1072-1083, 2007.
- SOI, V.; YEE, J. Sodium homeostasis in chronic kidney disease. *Advances in chronic kidney disease*, v. 24, n. 5, p. 325-331, 2017.

- VIEIRA-FILHO, L.D. et al. Renal molecular mechanisms underlying altered Na handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. *British Journal of Nutrition*, v.111, p.1932–1944. 2014.
- VIEYRA A. et al. The Role of the Second Na<sup>+</sup> Pump in Mammals and Parasites. In: Chakraborti S., Dhalla N. (eds) *Regulation of Membrane Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase*. *Advances in Biochemistry in Health and Disease* vol 15. Springer, Cham. 2016
- WANG X, A.I, et al. The regulation of proximal tubular salt transport in hypertension: an update. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. v.18 p.412-20. 2009
- YANG T, XU C. Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update. *Journal of the American Society of Nephrology*. v. 28 n. 4 p.1040-1049.2017
- IVY, Jessica R.; BAILEY, Matthew A. Pressure natriuresis and the renal control of arterial blood pressure. *The Journal of physiology*, v. 592, n. 18, p. 3955-3967, 2014.

## TABELAS

**Tabela 1.** Dados metabólicos e funcionais após 24 horas da administração do lipopolissacarídeo (LPS)

|                                                   | C           | L             | CM            | LM             |
|---------------------------------------------------|-------------|---------------|---------------|----------------|
| Peso corpóreo (g)                                 | 367 ± 15    | 376 ± 15      | 353 ± 10      | 356 ± 11       |
| Consumo dietético<br>(g/100 g)                    | 6,6 ± 0,1   | 4,1 ± 0,4***  | 6,2 ± 0,2†††  | 3,9 ± 0,3‡‡‡   |
| Consumo de água<br>(mL/100 g)                     | 10,9 ± 0,9  | 8,9 ± 0,8     | 11,1 ± 0,7    | 9,4 ± 0,5      |
| Diurese (mL/100 g)                                | 3,7 ± 0,2   | 5,7 ± 0,4*    | 3,9 ± 0,3     | 4,9 ± 0,9      |
| Creatinina sérica<br>(mg/dL)                      | 0,52 ± 0,02 | 0,67 ± 0,05*  | 0,51 ± 0,01†† | 0,49 ± 0,01††  |
| Ureia sérica (mg/dL)                              | 43,1 ± 1,7  | 54,7 ± 1,5*** | 44,6 ± 1,9††  | 41,4 ± 1,7†††  |
| Clearance de<br>Creatinina (mL/100 g<br>por 24 h) | 0,53 ± 0,02 | 0,41 ± 0,02** | 0,55 ± 0,02†† | 0,59 ± 0,02††† |
| Proteinúria (mg/100 g<br>por 24 h)                | 44,4 ± 3,2  | 45,2 ± 3,3    | 47,7 ± 2,7    | 39,7 ± 3,6     |

Dados estão apresentados como média ± EPM. C (n=8): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% (1mL/kg de peso corpóreo, s.c.); L (n=8): ratos submetidos a administração de LPS (10 mg/kg de peso corpóreo, s.c.); CM (n=8): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% previamente tratados com micofenolato de mofetila (30 mg/kg de peso corpóreo, p.o.); LM (n=8): ratos submetidos a administração de LPS previamente tratados com micofenolato de mofetila. As médias dos grupos foram comparadas utilizando-se o teste ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. \*P<0,05, \*\*P<0,01 e \*\*\* P<0,001 vs. C; ††P<0,01 e †††P<0,001 vs. L; e ‡‡‡P<0,001 vs. CM.

**Tabela 2.** Dados metabólicos e funcionais após 2 semanas da administração do LPS

|                                                | C           | L           | CM          | LM          |
|------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Peso corpóreo (g)                              | 395 ± 15    | 397 ± 15    | 385 ± 11    | 375 ± 11    |
| Consumo dietético<br>(g/100 g)                 | 5,8 ± 0,9   | 6,9 ± 0,3   | 6,2 ± 0,1   | 7,2 ± 0,3   |
| Consumo de água<br>(mL/100 g)                  | 11,4 ± 0,7  | 12,3 ± 0,5  | 10,6 ± 0,7  | 10,3 ± 1,6  |
| Diurese (mL/100 g)                             | 3,7 ± 0,3   | 4,8 ± 0,7   | 4,0 ± 0,4   | 4,5 ± 0,4   |
| Creatinina sérica<br>(mg/dL)                   | 0,43 ± 0,02 | 0,46 ± 0,02 | 0,44 ± 0,03 | 0,44 ± 0,01 |
| Ureia sérica (mg/dL)                           | 46,5 ± 0,09 | 49,0 ± 1,9  | 47,5 ± 1,2  | 50,8 ± 1,2  |
| Clearance de Creatinina<br>(mL/100 g por 24 h) | 0,51 ± 0,04 | 0,51 ± 0,03 | 0,51 ± 0,04 | 0,49 ± 0,04 |
| Proteinúria (mg/100 g<br>por 24 h)             | 43,2 ± 3,9  | 39,9 ± 4,0  | 37,1 ± 2,1  | 47,9 ± 3,3  |

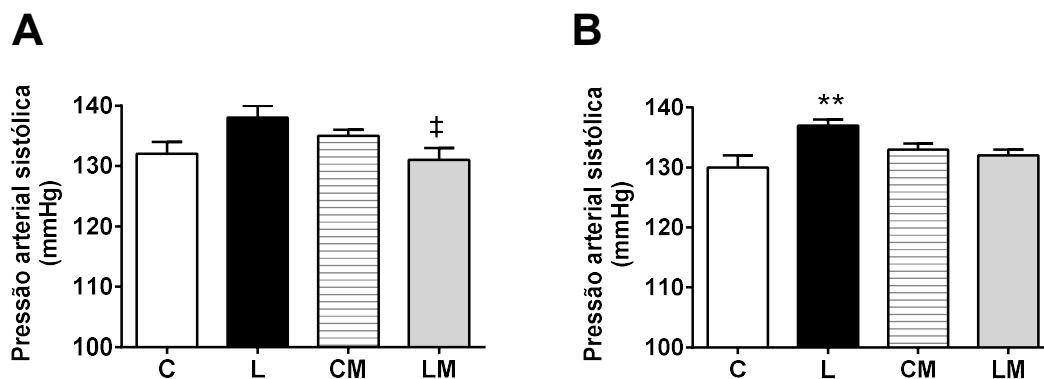
Dados estão apresentados como média ± EPM. C (n=8): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% (1mL/kg de peso corpóreo, s.c.); L (n=8): ratos submetidos a administração de LPS (10 mg/kg de peso corpóreo, s.c.); CM (n=8): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% previamente tratados com micofenolato de mofetila (30 mg/kg de peso corpóreo, p.o.); LM (n=8): ratos submetidos a administração de LPS previamente tratados com micofenolato de mofetila. As médias dos grupos foram comparadas utilizando-se o teste ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. \*P<0,05 e \*\* P<0.01 vs. C; †P<0,05, ††P<0,01 e †††P<0,001vs. L; e ‡P<0,01 vs. CM.

**Tabela 3.** Dados metabólicos e funcionais após 4 semanas da administração do LPS

|                                                   | C           | L                         | CM                        | LM                         |
|---------------------------------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Peso corpóreo (g)                                 | 405 ± 15    | 408 ± 14                  | 395 ± 8                   | 394 ± 11                   |
| Consumo dietético<br>(g/100 g)                    | 6,8 ± 0,2   | 7,3 ± 0,2                 | 5,5 ± 0,3 <sup>†</sup>    | 7,2 ± 0,4 <sup>‡</sup>     |
| Consumo de água<br>(mL/100 g)                     | 11,5 ± 0,4  | 13,1 ± 0,5                | 10,9 ± 0,6 <sup>†</sup>   | 13,0 ± 0,5 <sup>‡</sup>    |
| Diurese (mL/100 g)                                | 4,1 ± 0,2   | 5,4 ± 0,4 <sup>*</sup>    | 3,9 ± 0,4 <sup>†</sup>    | 4,6 ± 0,3                  |
| Creatinina sérica<br>(mg/dL)                      | 0,45 ± 0,01 | 0,59 ± 0,04 <sup>**</sup> | 0,45 ± 0,02 <sup>††</sup> | 0,43 ± 0,02 <sup>†††</sup> |
| Ureia sérica (mg/dL)                              | 52,2 ± 2,8  | 47,7 ± 1,2                | 47,9 ± 2,1                | 47,0 ± 0,8                 |
| Clearance de<br>Creatinina (mL/100 g<br>por 24 h) | 0,52 ± 0,05 | 0,32 ± 0,02 <sup>**</sup> | 0,53 ± 0,01 <sup>††</sup> | 0,51 ± 0,04 <sup>††</sup>  |
| Proteinúria (mg/100 g<br>por 24 h)                | 39,3 ± 2,1  | 37,1 ± 1,5                | 35,7 ± 3,3                | 40,4 ± 3,4                 |

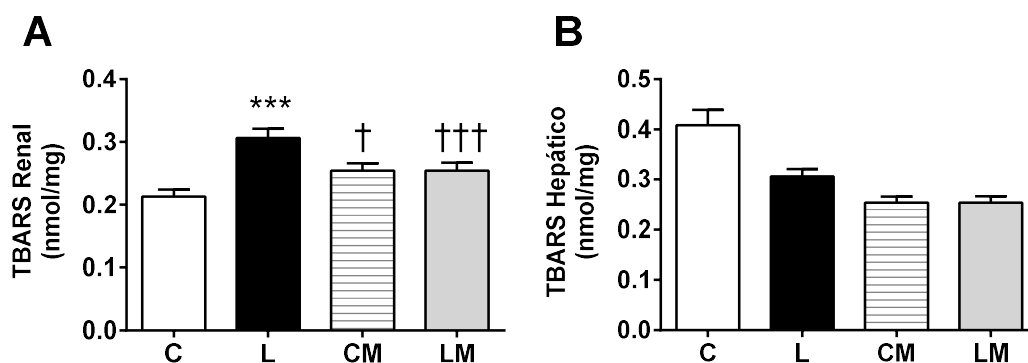
Dados estão apresentados como média ± EPM. C (n=8): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% (1mL/kg de peso corpóreo, s.c.); L(n=8): ratos submetidos a administração de LPS (10 mg/kg de peso corpóreo, s.c.); CM (n=8): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% previamente tratados com micofenolato de mofetila (30 mg/kg de peso corpóreo, p.o.); LM (n=8): ratos submetidos a administração de LPS previamente tratados com micofenolato de mofetila. As médias dos grupos foram comparadas utilizando-se o teste ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. \*P<0,05 e \*\* P<0.01 vs. C; <sup>†</sup>P<0,05, <sup>††</sup>P<0,01 e <sup>†††</sup>P<0,001 vs. L; e <sup>‡‡</sup>P<0,01 vs. CM.

## FIGURAS E LEGENDAS

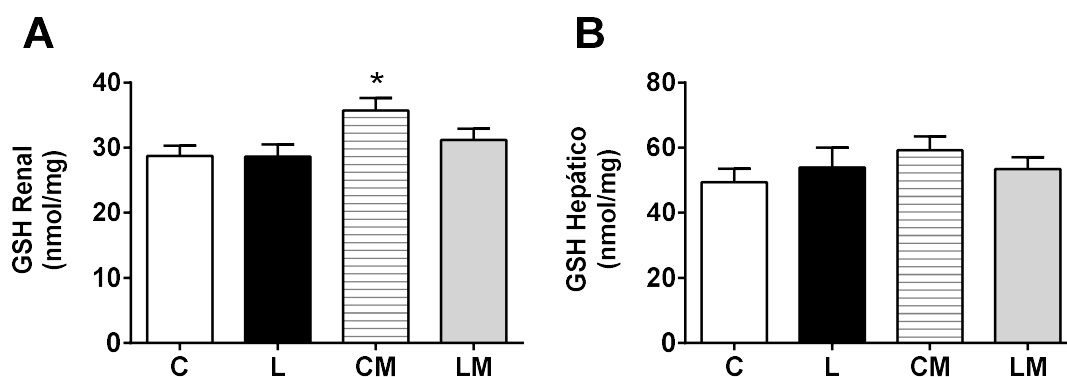


**Figura 1. Pressão arterial sistólica 2 (A) e 4 (B) semanas após administração de LPS.**

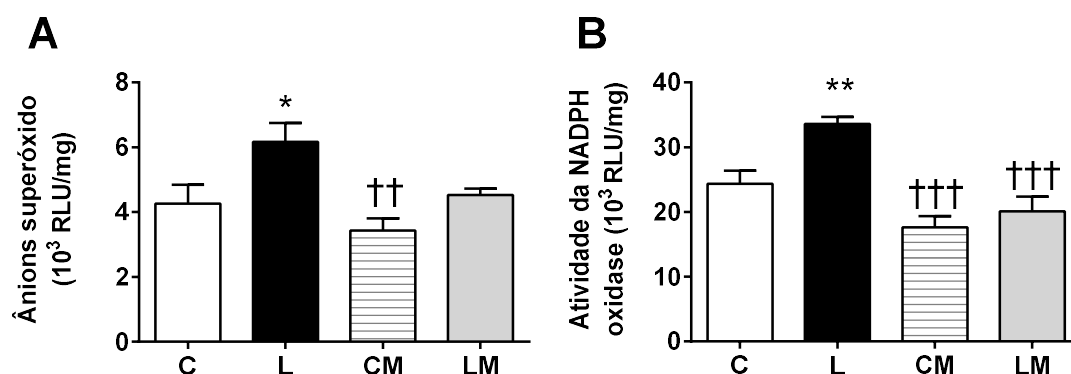
Dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM. C (n=8): ratos submetidos a administração de - solução NaCl 0,9% (1mL/kg de peso corpóreo, s.c.); L (n=8): ratos submetidos a administração de LPS (10 mg/kg de peso corpóreo, s.c.); CM (n=8): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% previamente tratados com micofenolato de mofetila (30 mg/kg de peso corpóreo, p.o.); LM (n=8): ratos submetidos a administração de LPS previamente tratados com micofenolato de mofetila. As médias dos grupos foram comparadas utilizando-se o teste ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. \*P<0,05, \*\* P<0.01 e \*\*\*P<0,001 vs. C; <sup>†</sup>P<0,05, <sup>††</sup>P<0,01 e <sup>†††</sup>P<0,001vs. L; e <sup>‡‡</sup>P<0,01 vs. CM.



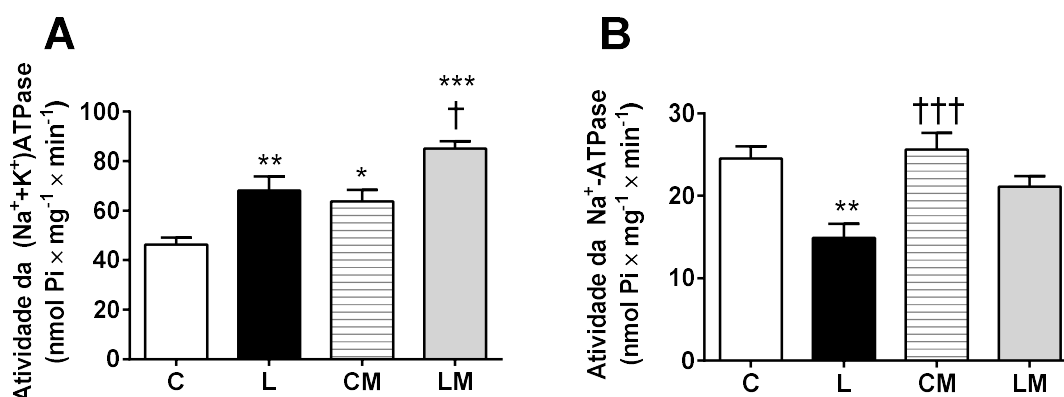
**Figura 2. Peroxidação lipídica no córtex renal e no fígado 4 semanas após administração do LPS.** Dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM. C (n=8): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% (1mL/kg de peso corpóreo, s.c.); L (n=8): ratos submetidos a administração de LPS (10 mg/kg de peso corpóreo, s.c.); CM (n=8): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% previamente tratados com micofenolato de mofetila (30 mg/kg de peso corpóreo, p.o.); LM (n=8): ratos submetidos a administração de LPS previamente tratados com micofenolato de mofetila. As médias dos grupos foram comparadas utilizando-se o teste ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. \*P<0,05, \*\* P<0.01 e \*\*\*P<0,001 vs. C; †P<0,05, ††P<0,01 e †††P<0,001 vs. L; e ‡P<0,01 vs. CM.



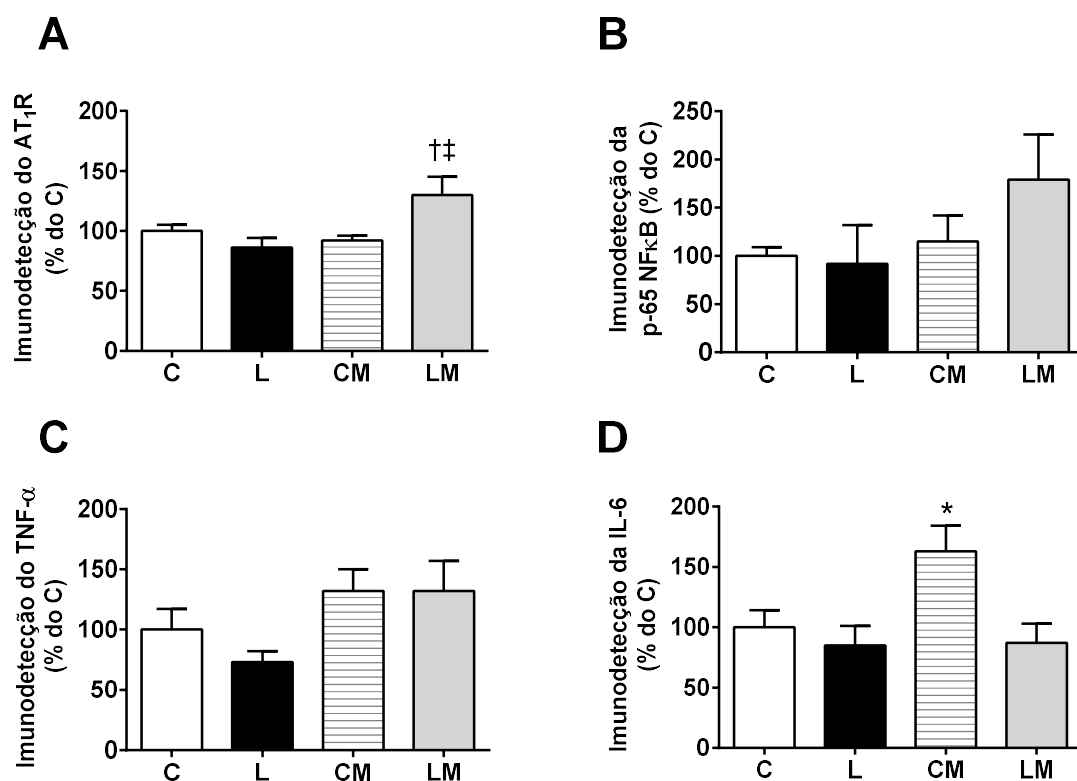
**Figura 3. Níveis de glutathiona reduzida no córtex renal e no fígado 4 semanas após administração de LPS.** Dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM. C (n=8): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% (1mL/kg de peso corpóreo, s.c.); L (n=8): ratos submetidos a administração de LPS (10 mg/kg de peso corpóreo, s.c.); CM (n=8): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% previamente tratados com micofenolato de mofetila (30 mg/kg de peso corpóreo, p.o.); LM(n=8): ratos submetidos a administração de LPS previamente tratados com micofenolato de mofetila. As médias dos grupos foram comparadas utilizando-se o teste ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. \*P<0,05, \*\* P<0.01 e \*\*\*P<0,001 vs. C; †P<0,05, ††P<0,01 e †††P<0,001vs. L; e ‡P<0,01 vs. CM.



**Figura 4. Produção basal de anions superóxido (A) e atividade da NADPH oxidase (B) 4 semanas após a administração do LPS.** Dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM. C (n=6): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% (1mL/kg de peso corpóreo, s.c.); L (n=6): ratos submetidos a administração de LPS (10 mg/kg de peso corpóreo, s.c.); CM (n=6): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% previamente tratados com micofenolato de mofetila (30 mg/kg de peso corpóreo, p.o.); LM (n=6): ratos submetidos a administração de LPS previamente tratados com micofenolato de mofetila. As médias dos grupos foram comparadas utilizando-se o teste ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. \* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  vs. C; † $P < 0,05$ , †† $P < 0,01$  e ††† $P < 0,001$  vs. L; e ‡‡ $P < 0,01$  vs. CM.



**Figura 5. Transportadores de  $\text{Na}^+$  dependentes de ATP avaliados no córtex renal 4 semanas após administração de LPS:  $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$  sensível a ouabaína (A) e  $(\text{Na}^+)\text{ATPase}$  sensível a furosemida (B). Dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM. C (n=6): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% (1mL/kg de peso corpóreo, s.c.); L (n=6): ratos submetidos a administração de LPS (10 mg/kg de peso corpóreo, s.c.); CM (n=6): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% previamente tratados com micofenolato de mofetila (30 mg/kg de peso corpóreo, p.o.); LM (n=6): ratos submetidos a administração de LPS previamente tratados com micofenolato de mofetila. As médias dos grupos foram comparadas utilizando-se o teste ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. \* $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  vs. C; † $P < 0,05$ , †† $P < 0,01$  e ††† $P < 0,001$  vs. L; e ‡‡ $P < 0,01$  vs. CM.**



**Figura 6. Imunodeteção do receptor AT<sub>1</sub> da angiotensina II (A), subunidade p65 do NFκB (B) Fator de necrose tumoral α (C) e Interleucina 6 (D) no córtex renal 4 semanas após administração de LPS.** Dados estão apresentados como média ± EPM. C (n=6): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% (1mL/kg de peso corpóreo, s.c.); L (n=6): ratos submetidos a administração de LPS (10 mg/kg de peso corpóreo, s.c.); CM (n=6): ratos submetidos a administração de solução NaCl 0,9% previamente tratados com micofenolato de mofetila (30 mg/kg de peso corpóreo, p.o.); LM (n=6): ratos submetidos a administração de LPS previamente tratados com micofenolato de mofetila. As médias dos grupos foram comparadas utilizando-se o teste ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. \*P<0,05, \*\* P<0.01 e \*\*\*P<0,001 vs. C; <sup>†</sup>P<0,05, <sup>††</sup>P<0,01 e <sup>†††</sup>P<0,001vs. L; e <sup>‡‡</sup>P<0,01 vs. CM.

## 7. ANEXO II – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal – UFPE



Universidade Federal de Pernambuco  
 Centro de Biociências  
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
 50670-420 / Recife - PE - Brasil  
 Fones: 2126 8842  
 ceua@ufpe.br

Recife, 20 de dezembro de 2018

Ofício nº 112/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
 Para: **Prof. Leucio Duarte Vieira Filho**  
 Centro de Biociências  
 Universidade Federal de Pernambuco  
 Processo nº 0066/2018

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do papel do sistema imune na lesão renal aguda induzida pela sepse em ratos.**” registrada com o nº0066/2018, sob a responsabilidade de **Prof. Leucio Duarte Vieira Filho** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 18/12/2018.

|                         |                                                       |
|-------------------------|-------------------------------------------------------|
| Finalidade              | ( ) Ensino (X) Pesquisa Científica                    |
| Vigência da autorização | Janeiro/2019 a agosto/2019                            |
| Espécie/linhagem/raça   | Ratos Heterogenico                                    |
| Nº de animais           | 32                                                    |
| Peso/Idade              | 250-350g/90-120 dias                                  |
| Sexo                    | (Macho 32)                                            |
| Origem                  | Bioterio do Departamento de Fisiologia e Farmacologia |

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva  
 Vice-Presidente CEUA/UFPE  
 SIAPE 2345691