

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Camille de Moura Balarini

**ANÁLISE TEMPORAL DA FUNÇÃO
RENAL EM CAMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

Vitória

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CAMILLE DE MOURA BALARINI

ANÁLISE TEMPORAL DA FUNÇÃO RENAL EM CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Profa. Dra. Silvana dos Santos Meyrelles.

Co-orientador: Profa. Dra. Ágata Lages Gava.

Vitória

2009

CAMILLE DE MOURA BALARINI

ANÁLISE TEMPORAL DA FUNÇÃO RENAL EM CAMUNDONGOS HIPERCOLESTEROLÊMICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Silvana dos Santos Meyrelles
(Orientador)

Profa. Dra. Ágata Lages Gava
(Co-Orientador)

Profa. Dra. Ivanita Stefanon
(Examinador Interno)

Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira
(Examinador Externo)

AGRADECIMENTOS

Tal conquista jamais poderia ser alcançada sem ajuda. Gostaria, portanto, de agradecer:

Aos meus pais, Ilson e Marluza, meus verdadeiros mestres. Muito obrigada pelos inúmeros exemplos de esforço, trabalho, honestidade, união, perseverança e competência. Todas as minhas conquistas são fruto da dedicação incondicional de vocês. Muito obrigada, amo vocês profundamente.

À minha irmã Michelle e ao Marcos, pelo incentivo à pesquisa, pelo belo exemplo de dedicação à Medicina e por me mostrarem que a vida não é só trabalho!

À Vovó Fenízia e à Bel, por cuidarem tão bem de mim no início de minha vida escolar. Muitas saudades...

Ao Rodrigo, por abraçar minha causa como sua, compreendendo cada momento de ausência, irritação e frustração e por me confortar, além de dividir os momentos de alegrias e conquistas. Tudo teria se tornado mais difícil sem o seu apoio e suas palavras.

Aos amigos, pela paciência e preocupação ao longo destes anos de dedicação ao LTCC e, é claro, pelos momentos de diversão!

Aos professores Silvana e Vasquez pela orientação, confiança e incentivo em todos esses anos no laboratório, servindo como molde de excelência profissional a ser alcançado.

À professora Ágata, que de tanto ajudar tornou-se co-orientadora, muitas vezes servindo de exemplo mais próximo da evolução de um aluno à posição de professor.

Aos professores Redins, Nyam e Mill por permitirem que fossem utilizados equipamentos de seus laboratórios durante a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Aos amigos: Breno, Thiago, Ágata, Maíne e Isabele. Muito obrigada pelos momentos de discussão científica que com certeza contribuíram substancialmente para minha formação e por aqueles de risos, piadas, imitações e descontração que ajudaram a aliviar o estresse.

Aos demais companheiros do laboratório (e de outros laboratórios): Flávia, Fernanda, Clarissa, Bianca, Leandro, Marcela, Bernah, Mariana, Marcelo Baldo, Rogério... por dividir as preocupações, as bancadas e as risadas.

RESUMO

O envelhecimento é um processo fisiológico que apresenta conseqüências deletérias para a função renal, as quais podem ser exacerbadas na presença de co-morbidades, como a dislipidemia. Portanto, o objetivo do presente estudo foi determinar o papel da hipercolesterolemia e do processo de envelhecimento na função renal de murinos. Camundongos machos espontaneamente hipercolesterolêmicos deficientes de apolipoproteína E (ApoE, n=18) e seus respectivos controles C57BL/6 (C57, n=18) de mesma idade foram estudados aos 2, 4 e 8 meses de idade. Em cada um destes momentos, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas por 24 horas para aferição do volume urinário e determinação de creatinina urinária. Amostras de sangue foram coletadas para a determinação de colesterol, uréia e creatinina no plasma. A taxa de filtração glomerular (TFG) foi estimada através da depuração de creatinina. Amostras de urina foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida para verificação da ocorrência de albuminúria e a senescência renal foi avaliada pela técnica de senescência associada à atividade da beta-galactosidase. Medidas morfométricas glomerulares foram avaliadas em 10 cortes (10 μ m) corados com hematoxilina-eosina e a expansão mesangial foi verificada pela coloração com Ácido Periódico de Schiff. A expressão da enzima nNOS foi avaliada através de *Western Blotting*. Para análise estatística foi realizada ANOVA de 2 vias, seguida pelo *post hoc* de Fisher. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. O colesterol plasmático total mostrou-se elevado aproximadamente 5 vezes nos animais ApoE em todas as idades, comparados aos respectivos controles C57 (C57 2 meses: $94,0 \pm 5,1$; ApoE 2 meses: $606,0 \pm 91,3$; C57 4 meses: $97,1 \pm 7,2$; ApoE 4 meses: $493,7 \pm 44,0$; C57 8 meses: $116,0 \pm 10,0$ e ApoE 8 meses: $636,1 \pm 76,4$). Aos 2 meses, a TFG já se mostrou significativamente reduzida nos animais ApoE (187 ± 28) comparados aos camundongos C57 (358 ± 92). O incremento da idade promoveu significativa redução da TFG em camundongos C57 (4 meses: 211 ± 60 e 8 meses: 81 ± 14) mas não piorou este parâmetro nos animais ApoE (4 meses: 128 ± 42 e 8 meses: 93 ± 18). Em adição, os níveis séricos de uréia mostraram-se elevados nos animais ApoE já aos 2 meses de idade e este parâmetro não varia em função do curso temporal (C57 2 meses: $39,8 \pm 5,2$;

ApoE 2 meses: $64,5 \pm 7,6$; C57 4 meses: $41,1 \pm 7,8$; ApoE 4 meses: $73,5 \pm 17,9$; C57 8 meses: $49,1 \pm 3,5$; ApoE 8 meses: $77,3 \pm 7,5$). Somente os animais ApoE aos 8 meses apresentam albuminúria. O curso temporal leva à senescência renal, que é precoce em animais hipercolesterolêmicos. Nenhuma diferença foi encontrada no número de glomérulos e na área do tufo glomerular. Significante expansão mesangial foi observada nos camundongos ApoE já aos 2 meses de idade (ApoE: $35,3 \pm 0,8$ vs. C57: $29,8 \pm 0,9$) e esta condição foi temporalmente agravada neste animais (4 meses: $40,4 \pm 1,2$ e 8 meses: $41,5 \pm 2,7$) e induzida nos controles C57 (4 meses: $37,8 \pm 1,3$ e 8 meses: $37,4 \pm 0,7$). Não foram observadas alterações significativas na expressão da enzima nNOS. Estes achados demonstram que a hipercolesterolemia é capaz de exacerbar a perda de função renal decorrente do processo de envelhecimento.

ABSTRACT

Aging is a physiological process with deleterious consequences for renal function, which could be exacerbated when concurrent with pathological situations, such as dyslipidemia. The aim of this study was to determine whether hypercholesterolemia and aging could affect the renal function in mice. Male hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient (ApoE, n=18) mice and their age-matched C57BL/6 (C57, n=18) control mice were studied at 2-, 4- and 8-month-old. At each time point, animals were placed in metabolic cages for 24 hours in order to analyze urine volume and urinary creatinine determination. Samples of blood were collected for serum cholesterol, urea and creatinine determination. Glomerular filtration rate (GFR) was estimated by the creatinine clearance. Urine samples were submitted to polyacrilamide gel electrophoresis to verify the presence of albuminuria and renal senescence was evaluated by senescence associated beta-galactosidase activity technique. Glomerular morphometric measurements were evaluated in 10 hematoxylin-eosin stained sections (10 μ m-thickness) and mesangial expansion was evaluated by Periodic Acid Schiff staining. Expression of nNOS was measured by Western Blotting. For statistical analysis, 2-way ANOVA was used followed by Fisher's *post hoc*. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. Total plasma cholesterol was increased about 5-fold in ApoE mice at both time points compared with C57 animals (C57 2 months: 94.0 ± 5.1 ; ApoE 2 months: 606.0 ± 91.3 ; C57 4 months: 97.1 ± 7.2 ; ApoE 4 months: 493.7 ± 44.0 ; C57 8 months: 116.0 ± 10.0 and ApoE 8 months: 636.1 ± 76.4). At 2-month-old, GFR was already markedly reduced in ApoE (187 ± 28) when compared to C57 mice (358 ± 92). Aging caused a significant reduction of GFR in C57 mice (4 months: 211 ± 60 and 8 months: 81 ± 14) although did not worsen this parameter in ApoE mice (4 months: 128 ± 42 and 8 months: 93 ± 18). In addition, serum urea was significantly increased in ApoE animals already at 2-month-old compared with C57 mice and this difference is not time-dependent (C57 2 months: 39.8 ± 5.2 ; ApoE 2 months: 64.5 ± 7.6 ; C57 4 months: 41.1 ± 7.8 ; ApoE 4 months: 73.5 ± 17.9 ; C57 8 months: 49.1 ± 3.5 ; ApoE 8 months: 77.3 ± 7.5). Only ApoE mice at 8-month-old presented albuminuria. Aging promoted markedly renal senescence in C57 animals and this occurred earlier in ApoE. No differences were found in glomeruli number nor glomerular tuft area. A significant mesangial expansion

was already observed at 2-month-old ApoE mice (ApoE: 35.3 ± 0.8 vs. C57: 29.8 ± 0.9) and this condition was aggravated by aging in ApoE mice (4 months: 40.4 ± 1.2 and 8 months: 41.5 ± 2.7) and induced in age-matched C57 animals (4 months: 37.8 ± 1.3 and 8 months: 37.4 ± 0.7). No differences were found in nNOS expression due to neither aging nor hypercholesterolemia. These data show that hypercholesterolemia can enhance the age-related loss of renal function.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Representação esquemática dos néfrons	15
Figura 2 – Representação esquemática do glomérulo	16
Figura 3 – Representação esquemática do tipos celulares tubulares	19
Figura 4 – Representação da formação de placa aterosclerótica	25
Figura 5 – Fotografia das lesões ateroscleróticas em camundongos	28
Figura 6 – Fotografias da gaiola metabólica para camundongos	37
Figura 7 – Representação do protocolo de utilização da gaiola metabólica	38
Figura 8 – Espectrofotômetro utilizado para dosagens bioquímicas	38
Figura 9 – Eletroforese para separação de proteínas	42
Figura 10 – Representação esquemática da eletroforese	46
Figura 11 – Representação esquemática da transferência de proteínas	47
Figura 12 – Resultados de medida de colesterol plasmático	52
Figura 13 – Resultados de depuração de creatinina	53
Figura 14 – Resultados de uréia sérica	54
Figura 15 – Gel de poliacrilamida corado com <i>Comassie Blue</i>	55
Figura 16 – Fotografia de rins corados pela técnica SA- β -gal	57
Figura 17 – Resultados de contagem do número de glomérulos	58
Figura 18 – Fotos típicas de glomérulos corados com HE	59
Figura 19 – Resultados de análise da área do tufo glomerular	60
Figura 20 – Fotos típicas de glomérulos corados com PAS	61
Figura 21 – Resultados de análise da expansão mesangial	62
Figura 22 – Resultados de análise da expressão da enzima nNOS	63
Organograma 1 – Divisão dos grupos experimentais	36
Tabela 1 – Parâmetros metabólicos	51

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADMA – *Assimetric Dimetilarginine* – Dimetilarginina Assimétrica
- ApoE – Camundongos deficientes de apolipoproteína E
- C57 – Camundongos C57BL/6
- CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
- cGMP – *Cyclic Guanosine Monophosphate* – Monofosfato de guanosia cíclico
- CTNBIO – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
- DNA – *Deoxyribonucleic acid* – Ácido desoxirribonucléico
- DTT – *Dithiothreitol* – Ditiotreitól
- EMESCAM – Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia
- eNOS – *Endothelial Nitric Oxide Synthase* – Óxido Nítrico Sintase Endotelial
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- HDL – *High Density Lipoprotein* – Lipoproteína de Alta Densidade
- HE – Hematoxilina-Eosina
- ICAM-1 – *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1* – Molécula de adesão intercelular tipo 1
- LDL – *Low Density Lipoprotein* – Lipoproteínas de baixa densidade
- nNOS – *Neuronal Nitric Oxide Synthase* – Óxido Nítrico Sintase Neuronal
- NO – *Nitric Oxide* – Óxido Nítrico
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PAS – *Periodic Acid Schiff* – Ácido Periódico de Schiff
- PBS – *Phosphate-Buffered Saline* - Salina Tamponada em Fosfato
- PBS-T – *Phosphate-Buffered Saline with Tween* - Salina Tamponada em Fosfato com Tween
- SA-β-gal – *Senescence Associated Beta-Galactosidase Activity* – Senescência associada à atividade da beta-galactosidase
- SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* – Dodecil Sulfato de Sódio
- SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
- SPF – *Specific Pathogen Free* – Livre de Patógenos Específicos
- TRS – Terapia Renal Substitutiva
- VLDL – *Very Low Density Lipoprotein* – Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Anatomia e Fisiologia Renal	14
1.2. Envelhecimento e Função Renal	20
1.3. Hipercolesterolemia e Função Renal	24
1.4. Modelos Experimentais	27
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivos Gerais	34
3.2. Objetivos Específicos	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Animais Experimentais	36
4.2. Grupos Experimentais	36
4.3. Parâmetros Metabólicos	37
4.4. Parâmetros Bioquímicos	38
4.4.1. Colesterol Plasmático	38
4.4.2. Creatinina sérica, urinária e <i>clearance</i> de creatinina	39
4.4.3. Uréia sérica	40
4.4.4. Albuminúria	41
4.5. Senescência Renal	42
4.6. Análises histológicas	42
4.6.1. Preparação das amostras	43
4.6.2. Coloração com hematoxilina-eosina	43
4.6.3. Coloração com PAS	44
4.7. Análise da Expressão Protéica	44

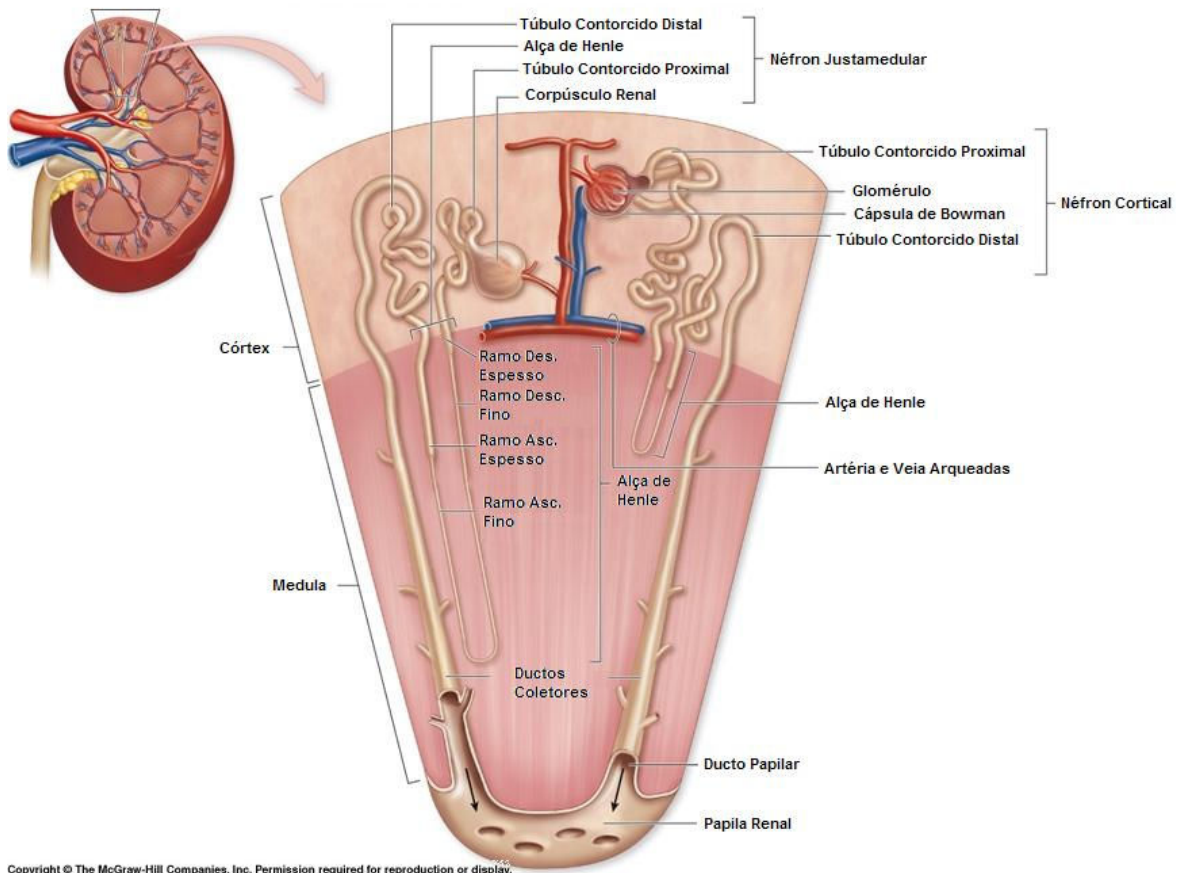
4.7.1. Extração e Determinação da Concentração Protéica	45
4.7.2. Eletroforese	45
4.7.3. Blotting	46
4.7.4. Revelação e Análise dos Resultados	48
4.8. Análise Estatística	48
5. RESULTADOS	50
5.1. Parâmetros Metabólicos	50
5.2. Colesterol Total	52
5.3. Depuração de Creatinina	53
5.4. Uréia Sérica	54
5.5. Albuminúria	55
5.6 Senescência Renal	56
5.7. Contagem de glomérulos	58
5.8. Morfometria Glomerular	59
5.9. Expansão Mesangial	61
5.10 Expressão da nNOS	63
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÃO	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
9. ANEXOS	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anatomia e Fisiologia Renal

Os rins desempenham importante papel na manutenção da homeostasia corporal, na medida em que são responsáveis pela manutenção da osmolaridade e volume dos fluidos corporais, regulação do balanço eletrolítico e do equilíbrio ácido-base, além de realizarem funções de remoção de substâncias indesejadas e produção de hormônios. Constituem-se de um par de órgãos localizados na parede posterior do abdome, lateralmente à coluna vertebral, na cavidade retro-peritoneal. Apresentam cor marrom-avermelhada e são revestidos por uma camada de tecido fibroso denominada cápsula renal. Em sua face medial encontra-se a região denominada hilo, aonde chegam aos rins as artérias e nervos renais e de onde partem as veias renais e a pelve. Cada rim humano pesa aproximadamente 150 gramas e recebe cerca de 25% do débito cardíaco, perfazendo um fluxo sanguíneo renal de 1250 mL/min. Sob a perspectiva da demanda metabólica, pode-se dizer que o fluxo sanguíneo renal é excessivo. Tal fluxo, contudo, serve não somente à perfusão necessária para a nutrição do órgão, mas também à formação do ultrafiltrado plasmático e formação de urina (Guyton e Hall, 2006; Aires et al., 2008).

Cada rim humano possui aproximadamente um milhão de néfrons. Cada um deles, como pode ser visto na figura 1, é formado basicamente por estruturas vasculares representadas pelos capilares glomerulares e por estruturas tubulares (cápsula de Bowman, túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor). O capilar glomerular é o responsável pela filtração do sangue formando o ultrafiltrado plasmático e os túbulos recolhem o líquido filtrado e processam-no reabsorvendo e secretando substâncias para que seja formada a urina, que é encaminhada à pelve renal e desta aos ureteres e bexiga, para finalmente ser eliminada pela uretra. Os rins apresentam duas redes capilares dispostas em paralelo: os capilares glomerulares, onde ocorre a filtração e os capilares peritubulares, os quais participam dos processos de reabsorção e secreção tubular de substâncias (Guyton e Hall, 2006; Aires et al., 2008).

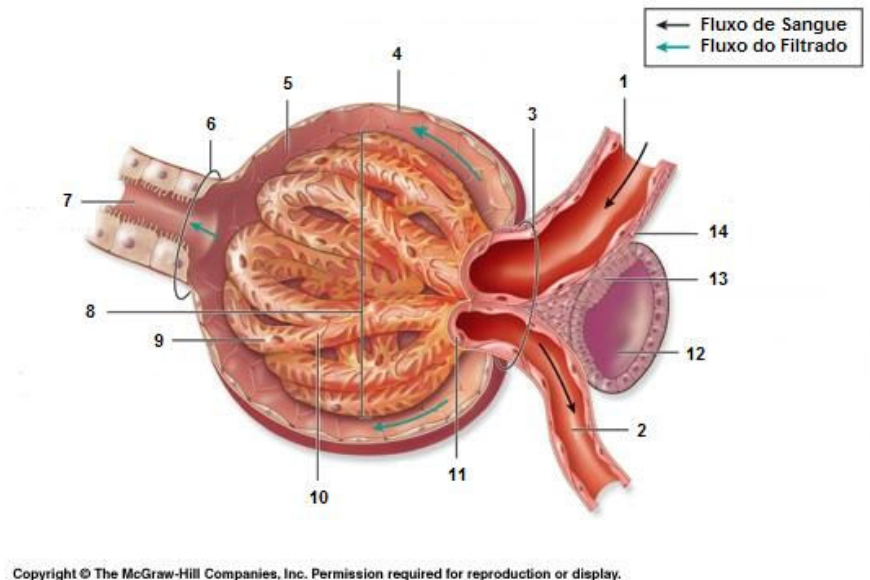


Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

Figura 1: Representação esquemática dos néfrons cortical e justamedular. (Adaptado de <http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKinley/Urinary%20System.htm>)

O metabolismo celular normal leva à produção de substâncias que devem ser excretadas do organismo, como uréia, ácido úrico e creatinina. Para tanto, os rins desempenham o papel crucial de depurar o sangue das moléculas que, em acúmulo, inviabilizariam a vida. Desta forma, o glomérulo apresenta estrutura perfeitamente adaptada para a realização das funções de filtração. Consiste de uma rede de capilares fenestrados, que recebem sangue da arteríola aferente e drenam para a eferente (figura 2). São livremente permeáveis à água, pequenos solutos e até pequenas proteínas, mas não a células. Os capilares são recobertos por uma camada de células epiteliais modificadas, os podócitos, que formam a camada visceral da cápsula de Bowman. As células epiteliais dos capilares glomerulares, juntamente com sua membrana basal e os podócitos formam a barreira de filtração às substâncias presentes no sangue. A membrana basal constitui-se de uma matriz porosa formada por proteínas

extracelulares como colágeno tipo IV, laminina e fibronectina e serve como barreira à filtração de proteínas plasmáticas. Desta forma, em condições fisiológicas, o líquido filtrado tem basicamente a mesma composição do sangue, exceto pela ausência de células e proteínas de alto peso molecular (Guyton e Hall, 2006; Aires et al., 2008).



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

Figura 2: Representação esquemática do glomérulo. 1 – Arteriola Aferente. 2 – Arteriola Eferente. 3 – Pólo Vascular. 4 – Camada Parietal da Cápsula de Bowman. 5 – Espaço de Bowman (espaço urinário). 6 – Pólo Tubular. 7 – Túbulo Contorcido Proximal. 8 – Glomérulo. 9 – Podócitos (Camada Visceral da Cápsula de Bowman). 10 – Pedículo. 11 – Endotélio do Glomérulo. 12 – Túbulo Contorcido Distal. 13 – Mácula Densa. 14 – Célula Justaglomerular. (Adaptado de <http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKinley/Urinary%20System.htm>).

No glomérulo também se encontram as células mesangiais, cuja estrutura é semelhante à de monócitos, apresentando forma irregular e processos citoplasmáticos que podem se posicionar ao redor dos capilares. São responsáveis por fornecer suporte estrutural às alças capilares glomerulares, além de apresentarem propriedades contráteis frente a agentes vasoativos como angiotensina II, vasopressina, norepinefrina, tromboxano, leucotrienos e fator ativador plaquetário, o que as torna capazes de participar ativamente do processo de regulação da filtração. Acredita-se que a contração das células mesangiais reduza a filtração glomerular por reduzir o fluxo sanguíneo a determinadas alças capilares, eliminando assim sua participação no processo de filtração. Por outro lado, exibem resposta relaxante frente à prostaglandina

E2, peptídeo atrial e dopamina, na maioria das vezes pelo aumento das concentrações intracelulares de monofosfato de guanosa cíclico (cGMP). Ainda, as células mesangiais são capazes de secretar prostaglandinas, citocinas e matriz extracelular e por isso estão envolvidas no processo de resposta às injúrias glomerulares (Brenner, 2008).

O processo de filtração nos capilares glomerulares, assim como nos demais capilares sistêmicos, é determinado pelo balanço entre as resultantes de pressão oncótica e hidrostática dentro e fora do capilar (forças de Starling). O conjunto da pressão hidrostática no capilar (cerca de 60 mmHg), que favorece a filtração, e das pressões hidrostática da cápsula de Bowman (18 mmHg) e oncótica do capilar glomerular (32 mmHg), que se opõem à filtração, perfazem um saldo de cerca de 10 mmHg a favor do fluxo de líquido do capilar glomerular para o interior da cápsula de Bowman. A insignificância de pressão oncótica no interior da cápsula é explicada pela quase ausência de proteínas neste compartimento, devido ao impedimento oferecido pela barreira de filtração à passagem destas moléculas. Assim como nos demais capilares corporais, qualquer alteração na resultante destas forças de Starling pode levar a alterações do processo de filtração (Guyton e Hall, 2006; Aires et al., 2008).

Os rins apresentam ainda mecanismos auto-regulatórios para controle do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular a despeito de alterações na pressão arterial, de modo que as alterações normais nos valores de pressão entre 80 e 160 mmHg não se refletem em mudanças significativas no fluxo sanguíneo renal e na taxa de filtração glomerular. O mecanismo miogênico, que não é exclusivo dos rins, baseia-se na resposta constritora dos vasos frente a aumento na tensão de parede. O incremento da pressão arterial promove estiramento na parede dos vasos, cuja resposta se dá pela vasoconstrição, prevenindo grandes alterações no fluxo sanguíneo renal e na taxa de filtração glomerular. Entretanto, o principal mecanismo envolvido na auto-regulação é o *feedback* tubuloglomerular. Neste caso, o aumento da filtração decorrente da elevação da pressão arterial se reflete em aumento do fluxo tubular na região da mácula densa e aumento da carga de sódio e cloreto. Essa região é sensível à concentração destes íons e de maneira parácrina

sinaliza para as células justaglomerulares a necessidade de constrição da arteríola aferente e redução na liberação de renina. Desta forma, os rins são capazes de manter em níveis estáveis, dentro de faixas de variação normais de pressão arterial, o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular (Guyton e Hall, 2006; Aires et al., 2008).

Por outro lado, os rins são responsáveis pela manutenção do volume e composição do fluido extracelular através do controle preciso da reabsorção e secreção de água e eletrólitos a partir do ultrafiltrado formado pelos glomérulos. Para tanto, os diferentes segmentos das estruturas tubulares do néfron são adaptadas para a realização de funções de transporte específicas, que são ativadas na medida das necessidades do organismo (figura 3). Brevemente, as células dos túbulos proximais têm a superfície de sua membrana apical (luminal) extensamente ampliada, chamada de borda em escova, e a superfície basolateral rica em mitocôndrias e invaginações. As células dos segmentos finos da alça de Henle possuem as superfícies apical e basolateral pouco desenvolvidas e pobre em mitocôndrias. Ao contrário, as células do ramo ascendente espesso da alça de Henle e do túbulo distal apresentam abundância de mitocôndrias e extensas invaginações na membrana basolateral. Os ductos coletores são formados por células intercaladas (que possuem bastantes mitocôndrias) e células principais (membrana basolateral com invaginações moderadas e poucas mitocôndrias). À medida que flui da cápsula de Bowman pelos diferentes segmentos tubulares, o ultrafiltrado sofre processos de reabsorção e secreção seletivas de substâncias, de acordo com as necessidades do organismo para a manutenção da homeostase (Guyton e Hall, 2006; Aires et al., 2008).

Não obstante, os rins desempenham importante papel endócrino, ao secretarem hormônios responsáveis pela síntese e amadurecimento de eritrócitos (eritropoetina), formação da angiotensina (renina) e absorção de cálcio (calcitriol). Os rins participam, ainda, da regulação do equilíbrio ácido-básico através do controle preciso da excreção de íons hidrogênio e reabsorção de bicarbonato (Guyton e Hall, 2006; Aires et al., 2008).

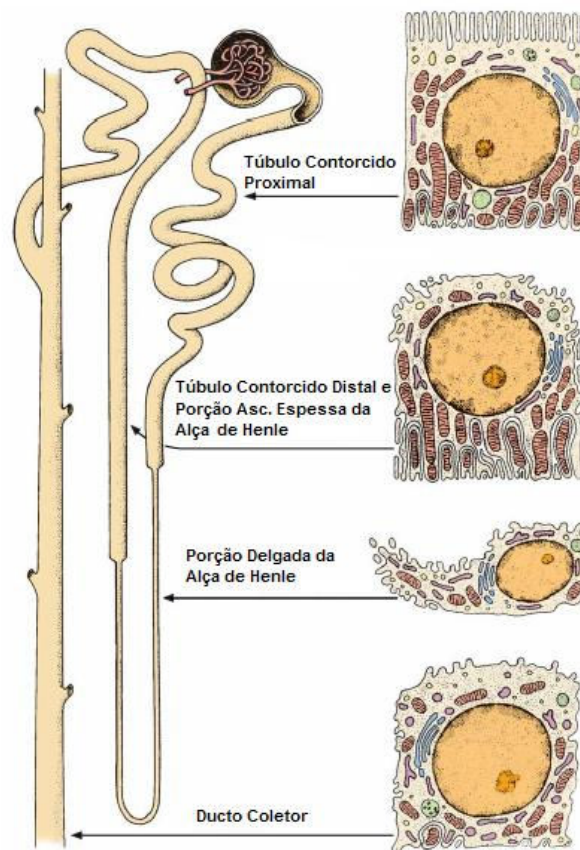


Figura 3: Representação esquemática dos diferentes tipos celulares que compõe os túbulos renais (Adaptado de Junqueira e Carneiro, 2004).

Está claro, então, que os rins desempenham funções importantes na manutenção da homeostasia corporal. Assim sendo, qualquer doença ou alteração do estado fisiológico normal renal implicam no comprometimento de diversos outros órgãos e sistemas. Desta forma, os fatores que possam levar a quaisquer tipos de comprometimento funcional dos rins devem ser extensivamente estudados, a fim que de se possa compreender melhor seus mecanismos, visando uma maior eficiência nos tratamentos empregados.

1.2. Envelhecimento e Função Renal

O processo natural de envelhecimento pode ser considerado o mais complexo fenômeno observado em um organismo. Trata-se de um conjunto de modificações fisiológicas decorrentes de alterações na expressão e regulação de diversos genes ao longo do tempo. Usualmente há um acúmulo temporal de danos celulares que afeta negativamente diversos órgãos e sistemas, os quais normalmente têm sua função comprometida (Amelina e Cristobal, 2009). O grau de comprometimento funcional pode vir a se refletir em prejuízo na manutenção da homeostasia do indivíduo. Tal prejuízo será proporcionalmente maior à medida que aumenta a participação do órgão acometido no processo homeostático. Além disso, a presença de co-morbidades corrobora com a aceleração das modificações, podendo levar a prejuízo funcional precoce.

Muitas teorias desenvolvidas recentemente se propõem a explicar as alterações observadas durante o processo de envelhecimento. Acredita-se que diversos fatores tais como os danos ambientais e possíveis rearranjos genéticos possam estar envolvidos no estabelecimento da idade celular (Martin e Sheaff, 2007(a)). A teoria mitocondrial propõe que o mecanismo básico do envelhecimento nos mamíferos reside na disfunção mitocondrial observada com a idade, a qual leva a um aumento do estresse oxidativo, ou seja, desbalanço entre agentes oxidantes e antioxidantes, que leva a acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), culminando com dano oxidativo em lipídios, proteínas e DNA e conseqüente comprometimento funcional (Barja, 2002; Choksi et al., 2007).

A senescência celular (ou replicativa) trata-se na incapacidade de divisão indefinida das células (Dimri et al., 1995), que não está necessariamente relacionada ao tempo de vida do organismo. Fenômenos como o estresse, que podem causar danos no DNA ou lesões oxidativas, podem levar à senescência celular antes que o limite replicativo tenha sido alcançado (Dmitrieva e Burg, 2007). A técnica de coloração SA- β -gal (beta galactosidase associada à senescência) desenvolvida por Dimri (1995) permite a avaliação da senescência tissular a partir da atividade da enzima beta-galactosidase

sobre o substrato X-Gal, em pH 6,0. Recentemente, a atividade da enzima telomerase e o tamanho dos telômeros (regiões de DNA não codificantes presentes nas extremidades dos cromossomos) têm tido papel de destaque na literatura. Suspeita-se que o comprimento dos telômeros pode servir como um marcador de senescência celular, que não mantém relação com a idade temporal da célula, mas sim com sua capacidade de divisão (Shay e Wright, 2007).

Independente do fator considerado, atualmente sabe-se que muitos deles dividem mecanismos comuns com processos patológicos de alta incidência, como diabetes, hipertensão e dislipidemias. O entendimento destes processos permite inferir sobre quais seriam os efeitos aditivos que certas doenças poderiam provocar sobre a perda temporal de funcionalidade naturalmente observada em determinados tipos celulares e tecidos. Além disso, pode-se vislumbrar a oportunidade de intervenções direcionadas a cada um dos fatores envolvidos (ou mais de um deles), a fim de modificar a velocidade do processo de envelhecimento (Martin e Sheaff, 2007(a); Jiang et al., 2005).

Desvendar os mecanismos envolvidos nas alterações temporais é importante devido ao fato de que nas últimas décadas o fenômeno de incremento da longevidade da população passou a ser notoriamente reconhecido e documentado. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a proporção de pessoas idosas está aumentando mais rapidamente que qualquer outra faixa etária, na maioria dos países. O grupo formado por pessoas com mais de 60 anos da América Latina é o que apresenta crescimento mais rápido no mundo. Esse fenômeno deve-se tanto ao aumento da expectativa de vida da população quanto à queda nas taxas de natalidade, ambos associados a fatores sócio-culturais e econômicos diversos. Em termos numéricos, no ano de 2000 havia no mundo cerca de 600 milhões de pessoas com mais de 60 anos. As projeções sugerem que haverá 1,2 bilhões em 2025 e 2 bilhões em 2050 (OMS). No Brasil, o desenvolvimento alcançado nos últimos anos está relacionado com melhorias nos programas nacionais de saúde pública, o que se reflete no aumento do Índice de Envelhecimento (número de indivíduos idosos/100 pessoas jovens) (DATASUS).

Devido ao aumento da proporção de indivíduos idosos, as doenças associadas ao envelhecimento têm se tornado mais prevalentes, e conseqüentemente os custos relativos aos respectivos tratamentos têm tido um significativo impacto econômico em todos os países (Martin e Sheaff, 2007(a)). No Brasil, enquanto a expectativa de vida ao nascimento beira os 72 anos, a expectativa de vida saudável em 2003 era de 60 anos. Isso implica que o aumento da longevidade deve ser irrefutavelmente acompanhado de políticas de saúde pública que visem garantir ampla assistência e que proporcionem uma qualidade de vida satisfatória aos idosos.

Dentre os órgãos mais afetados pelo incremento da idade, podem-se destacar os rins (Csiszar et al., 2007). Observa-se que, durante o processo de envelhecimento, a função e a morfologia destes importantes órgãos alteram-se significativamente (Martin e Sheaff, 2007(b)). O curso temporal leva a alterações tanto funcionais quanto estruturais no parênquima renal. Modificações estruturais também podem comprometer a funcionalidade do órgão, haja vista a intensa relação estrutural-funcional observada nos rins. As alterações funcionais incluem redução do fluxo plasmático renal, da taxa de filtração glomerular e da disponibilidade de fatores vasodilatadores no tecido renal. Por outro lado, as modificações estruturais englobam redução da massa renal, redução do número de glomérulos corticais, expansão mesangial e acúmulo de matriz extracelular levando à fibrose túbulointersticial (Brenner, 2008).

Embora estudos demonstrem que as alterações fenotípicas associadas à idade possam representar causas de insuficiência renal (Csiszar et al., 2007), as alterações temporais de funcionalidade não costumam ser responsáveis por grande prejuízo na manutenção da homeostasia, na ausência de uma comorbidade. Contudo, há perda de “reserva renal” o que implica que o órgão torna-se mais suscetível ao dano na presença de patologia associada, como hipertensão, diabetes e aterosclerose. Curiosamente, sugere-se que a glomerulosclerose e a fibrose túbulointersticial não são conseqüências necessariamente inevitáveis do processo de envelhecimento. Diversas moléculas, tais como angiotensina II, produtos finais de glicosilação, espécies

reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico podem desempenhar papéis importantes na doença renal associada ao envelhecimento e a modulação das vias que envolvem estes fatores pode representar uma alternativa viável para a prevenção e atenuação da piora de função dos rins associada à idade (Jiang et al., 2005).

Adicionalmente, o envelhecimento é considerado um fator de risco ao desenvolvimento de doença renal crônica, a qual pode ser definida, segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia (2007), como um processo de perda lenta, progressiva e irreversível da função dos rins, que se estabelece normalmente após uma injúria renal inicial e que culmina com a incapacidade dos órgãos em realizar suas funções regulatórias, excretórias e endócrinas. A função renal representa um dos fatores de inclusão ou exclusão de indivíduos em cirurgias de transplante renal, tanto como doadores quanto como receptores. De maneira assustadora, atualmente no Brasil mais de 70.000 pacientes são dependentes de Terapia Renal Substitutiva (TRS), seja ela o transplante renal ou a diálise, perfazendo um gasto anual de 2 bilhões de reais (Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2007). Tal situação torna-se ainda mais preocupante quando se considera que o envelhecimento leva à redução de função renal e que o aumento do número e proporção de indivíduos idosos é uma tendência demográfica global (Martin e Sheaff, 2007(b)).

Além disso, a perda de função renal eleva grandemente o risco cardiovascular. Os mecanismos envolvidos incluem hipertensão, aumento do tônus simpático, acúmulo de moléculas inibidoras da produção de óxido nítrico (como ADMA), dislipidemia e estresse oxidativo. Na insuficiência renal, costuma-se atribuir ao aumento no estresse oxidativo a aceleração da formação de placa aterosclerótica e a hipertrofia ventricular esquerda, mesmo na ausência de hipertensão (Piecha et al., 2008).

1.3. Hipercolesterolemia e Função Renal

A despeito dos consideráveis avanços terapêuticos alcançados nos últimos anos, as doenças cardiovasculares ainda estão entre as principais causas de morte no mundo. Isso se deve principalmente ao aumento da prevalência de aterosclerose, sobretudo na crescente população idosa atual. (Sanz e Fayad, 2008). Apesar de autores sugerirem que, mesmo na ausência de outros fatores de risco, o envelhecimento *per se* pode ser responsável pelo incremento no número de mortes devido a eventos cardiovasculares (Csiszar et al., 2007), sabe-se que o mais notável fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose (e, conseqüentemente, doenças cardiovasculares) é a hipercolesterolemia.

A hipercolesterolemia caracteriza-se pelo acúmulo de lipoproteínas no plasma, que podem ser oxidadas e migrar para o espaço subendotelial de vasos, comprometendo a função do endotélio, sobretudo devido ao decréscimo da produção de óxido nítrico (figura 4). Segue-se então o processo de desenvolvimento da placa aterosclerótica, com aumento da expressão de moléculas de adesão e diapedese de monócitos. A fagocitose dos lipídios oxidados leva à formação de células espumosas. Há a liberação de fatores pró-inflamatórios e recrutamento de células musculares lisas, além do aumento da produção de matriz extracelular. Por fim, tem-se a formação de uma capa fibrótica no local de acúmulo de gorduras, que compromete o lúmen vascular. Esporadicamente pode ocorrer o rompimento da placa, com a exposição de fatores teciduais que levam à formação de trombos no local da lesão, os quais podem seguir pela corrente sanguínea e atuar como êmbolos, levando ao infarto do miocárdio ou ao acidente vascular cerebral, por exemplo (Libby, 2002; Sanz e Fayad, 2008).

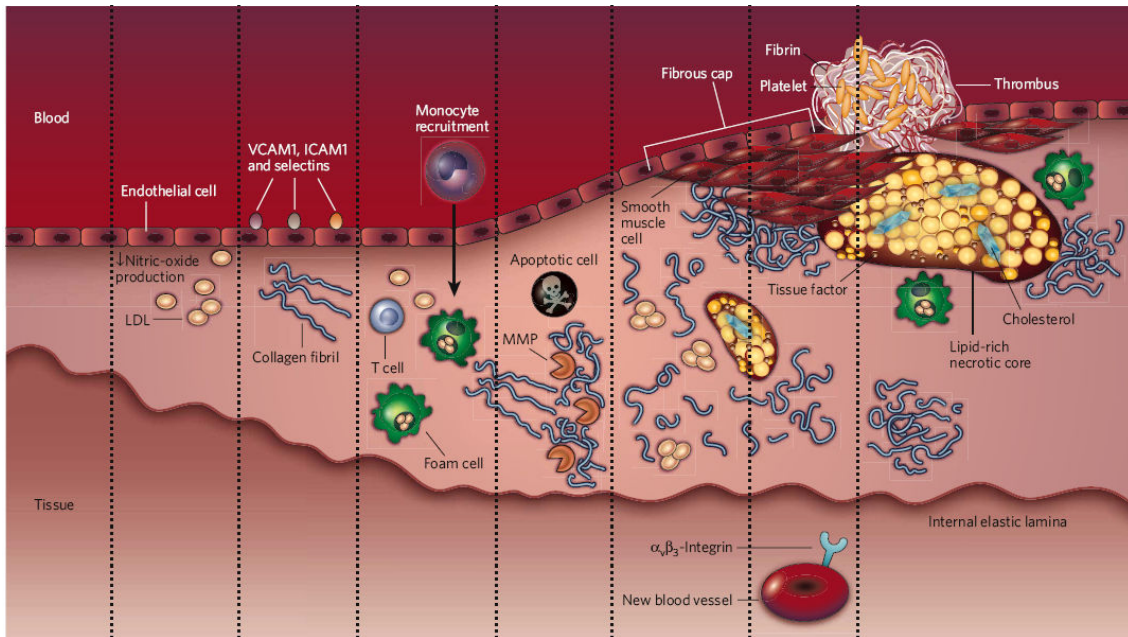


Figura 4: Representação esquemática da formação de uma placa aterosclerótica com a presença de um trombo. (Adaptado de Sanz e Fayad, 2008).

Deve-se destacar que a presença de dislipidemias e aterosclerose é notável na população idosa. No Brasil, estima-se que 35% da população acima de 60 anos possua níveis elevados de colesterol plasmático (Pereira et al., 2008), justificando toda a atenção prestada ao estudo desta desordem, assim como suas principais causas e potenciais tratamentos. A hipercolesterolemia é um fenótipo cujas causas podem ser relacionadas tanto à predisposição genética quanto à influência ambiental. Os fatores genéticos envolvidos normalmente relacionam-se a alterações no metabolismo e transporte de lipoproteínas, ao passo que os fatores não genômicos englobam principalmente hábitos físicos e alimentares (Ross, 1999; Jawień et al., 2004; Roy et al., 2009).

Além de sua relação com os eventos cardiovasculares, a hipercolesterolemia pode ser considerada tanto um fator que contribui substancialmente para a piora da função desempenhada pelos rins em pacientes com comprometimento renal prévio, quanto como preditora da proporção de queda da depuração (ou *clearance*) de creatinina (Muntner et al., 2000; Bruneval et al., 2002), um parâmetro normalmente utilizado na prática clínica para inferência sobre a taxa de filtração glomerular e, por conseguinte, sobre a função renal. As doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose, perfazem complicações

comumente observadas em pacientes renais crônicos, que realizam hemodiálise (Vázquez-Pérez et al., 2001).

Somam-se aos estudos realizados em humanos os ensaios em animais experimentais, os quais submetidos à dieta hiperlipídica ou manipulação genética demonstraram que a dislipoproteinemia está associada com alteração de função e estrutura renal (Scheuer et al., 2000; Lambert et al., 2001; Buzello et al., 2004). Demonstrou-se que a redução das lipoproteínas circulantes por meio de dieta ou intervenção farmacológica minimiza o nível de lesão renal (McCarthy et al., 2000; Vázquez-Pérez, 2001; Buzello et al., 2004).

Considerando que os indivíduos que apresentam dislipidemia e hipercolesterolemia normalmente desenvolvem complicações cardiovasculares, poucos estudos têm como objetivo principal a investigação do potencial desenvolvimento de comprometimento renal nestes pacientes. Por outro lado, é difícil determinar os exatos efeitos da hipercolesterolemia *per se* neste processo, devido à presença de múltiplos fatores envolvidos na progressão da doença. O uso recente de animais experimentais permite a dissecção dos efeitos diretos da hiperlipidemia na injúria glomerular (Wen et al., 2002).

Conforme já mencionado, o envelhecimento apresenta mecanismos moleculares comuns a determinadas doenças, como a hipercolesterolemia. Gendron e colaboradores (2007) demonstraram que a disfunção endotelial observada com o incremento da idade é acelerada quando associada à dislipidemia e que tal disfunção deve-se basicamente à redução da biodisponibilidade de vasodilatadores como o óxido nítrico (NO). Visto que o NO tem importante papel na manutenção da homeostasia renal, podemos sugerir que o comprometimento funcional renal que acomete indivíduos mais velhos seja, ao menos em parte, relacionado à redução deste vasodilatador. De fato, já foi demonstrado que ratos machos velhos têm menor excreção de produtos nitrosilados e redução na expressão da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (nNOS) (Baylis, 2005), o que indica menor produção de NO. Por outro lado, a aterosclerose está associada a aumento do estresse oxidativo e incremento do conteúdo de colágeno na placa aterosclerótica

(Ivanovski et al., 2007), o que podemos inferir que ocorra também nos capilares glomerulares de animais idosos hipercolesterolêmicos.

1.4. Modelos Experimentais

Recentemente, o uso de modelos experimentais animais tem demonstrado ser uma ferramenta extremamente útil para estudo e compreensão de processos fisiopatológicos observados em humanos. A grande vantagem do uso de animais reside na possibilidade de dissociação do fator a ser investigado dos demais que também estejam envolvidos na progressão da doença.

Os primeiros modelos animais para estudos de dislipidemias e aterosclerose datam do início do século XX, quando Ignatowski relatou espessamento da camada íntima da aorta de coelhos, com a formação de grandes células claras (Jawien et al., 2004). O desenvolvimento das lesões, contudo, estava condicionado a uma dieta especial hiperproteica. Por outro lado, seu conteúdo era mais abundante em lipídios e macrófagos que as humanas, além da presença de um nível absurdamente elevado de colesterol plasmático, muito além do que é, proporcionalmente, observado em humanos. A partir de então, os modelos animais mais utilizados neste tipo de estudos restringiam-se a animais relativamente grandes, como suínos, primatas e coelhos. Os ratos não se apresentavam como alternativas viáveis devido à sua relativa resistência ao desenvolvimento das lesões e à necessidade de modificações drásticas na dieta (Jawien et al., 2004). Em vista disso e das dificuldades de se trabalhar com coelhos e primatas, novos modelos de hiperlipidemia e aterosclerose experimental foram desenvolvidos.

A despeito da resistência de camundongos ao desenvolvimento de aterosclerose, os animais da linhagem C57BL/6 (C57) mostraram-se suscetíveis ao desenvolvimento de lesões vasculares quando alimentados com dieta rica em colesterol e contendo ácido cólico, apesar de diferirem das humanas no que diz respeito à localização e avaliação histológica. Infelizmente o modelo de camundongo aterosclerótico condicionado à dieta mostrou-se ineficiente, visto à reduzida área de lesão e à toxicidade da dieta adotada, que

por si só já promovia ativação de sistemas pró-inflamatórios. Além disso, o conteúdo das placas mostrava-se rico em células espumosas, mas pobre em células musculares lisas, limitando-se à presença de estrias gordurosas, sem progredir para lesões intermediárias similares às humanas (Jawien et al., 2004).

Durante muito tempo, a criação de um modelo experimental murino de aterosclerose foi o objetivo de muitos pesquisadores, assim como a identificação de genes-alvo que poderiam modificar a aterogênese e a progressão da lesão. Em 1992, foi criado por Piedrahita um modelo cujo gene da apolipoproteína E foi silenciado. Trata-se de uma glicoproteína determinante para o catabolismo mediado por receptor de todas as lipoproteínas ricas em triglicerídeos (quilomícrons e VLDL) e seus remanescentes (LDL) (Mahley e Huang, 1999). Outro grupo (Plump et al., 1992) demonstrou que estes animais desenvolviam hipercolesterolemia severa e lesões ateroscleróticas (Figura 5).

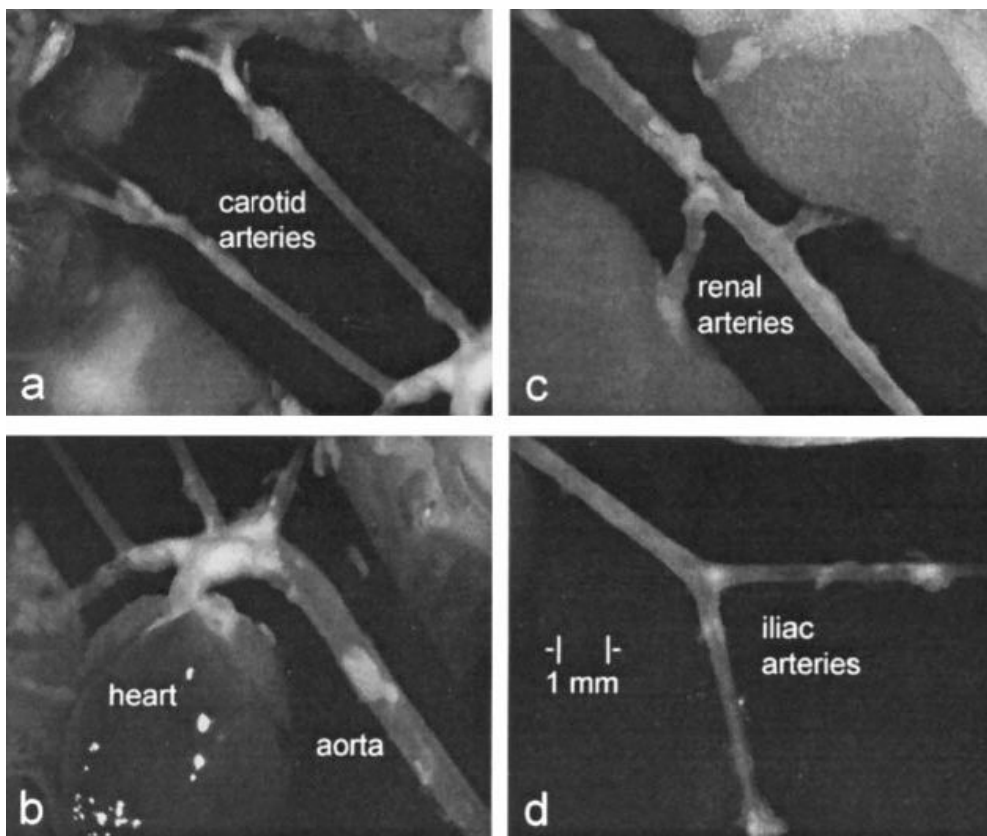


Figura 5: Fotografias demonstrando áreas de lesão nas principais artérias de camundongos ApoE knockout (pontos claros). (Adaptado de Hartley et al., 2000).

Apesar de camundongos normalmente apresentarem altos níveis de HDL (lipoproteína de alta densidade) em relação ao LDL (lipoproteínas de baixa densidade), ao contrário de seres humanos, cujo perfil lipoprotéico é o inverso, os animais *ApoE knockout* (*ApoE*) exibem fenótipos comparáveis aos humanos. Além disso, a análise cronológica do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas neste modelo animal revela que a seqüência de eventos envolvidos no estabelecimento do ateroma é extremamente semelhante à observada em humanos, sem a necessidade de adoção de uma dieta com suplementação lipídica. Ainda, o conteúdo celular da placa é similar ao humano, consistindo de macrófagos, células T e músculo liso, assim como a presença de lipoproteínas oxidadas (Ang et al., 2008). A principal diferença relatada consiste na ausência de ruptura de placa nos animais *ApoE*, o que é bastante comum em humanos e, na verdade, trata-se de um dos maiores complicadores da aterosclerose. A ruptura de placa leva à formação de trombos que podem migrar e formar êmbolos, os quais são grandemente responsáveis pelos processos isquêmicos associados ao evento. Em camundongos, o pequeno diâmetro das artérias faz com que a tensão superficial no vaso seja proporcionalmente grande, potencialmente sendo este o mecanismo que impede a ruptura nestes animais.

Ishibashi, em 1993, desenvolveu outro modelo experimental geneticamente modificado de aterosclerose que consistia de camundongos *knockout* para o receptor de LDL. O incremento do colesterol plasmático, contudo, mostrou-se moderado em relação aos animais *ApoE*, o que não leva ao desenvolvimento de placa aterosclerótica espontaneamente. Por outro lado, os animais são extremamente sensíveis à manipulação da dieta, desenvolvendo placas quando são submetidos à ração rica em lipídios.

Além de serem mostrarem excelentes modelos experimentais para o estudo de hipercolesterolemia e aterosclerose, os camundongos *ApoE* também podem ser considerados modelos preciosos para estudos de fenótipos relativos ao envelhecimento. Esses fenótipos que, além do desenvolvimento de aterosclerose, incluem perda de pêlos, prejuízo na regeneração capilar e acinzamento dos pêlos e atrofia de túbulos seminíferos, são observados

mesmo na ausência de dieta rica em lipídios, embora tal dieta acelere seu aparecimento (Ang et al., 2008).

2. JUSTIFICATIVA

Dado o importante papel desempenhado pelos rins na manutenção da homeostasia corporal, é imprescindível que sua fisiologia seja conhecida e, mais ainda, os processos envolvidos no estabelecimento de estados patológicos sejam desvendados.

Visto que o comprometimento temporal da função renal pode implicar em questões de saúde pública, torna-se importante que os mecanismos envolvidos nestas alterações funcionais sejam esclarecidos. Isto proporciona a possibilidade de interferências, a fim de preservar a funcionalidade do órgão, de modo que a doença renal crônica possa ser prevenida. Por outro lado, o fato de o comprometimento funcional renal apresentar mecanismos comuns a determinadas manifestações recorrentes, inclusive entre indivíduos jovens, como a hipercolesterolemia, implica no potencial envelhecimento precoce do órgão na presença de co-morbidades.

Desta maneira, os estudos que correlacionem hipercolesterolemia e envelhecimento com alterações funcionais renais justificam-se na medida em que auxiliam na constituição da base teórica de conhecimento que permite intervenções precoces, a fim de se evitar o estabelecimento de comprometimento funcional renal em indivíduos idosos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

- Avaliar a influência do processo de envelhecimento e da hipercolesterolemia na função renal de camundongos.

3.2. Objetivos Específicos

Em camundongos espontaneamente hipercolesterolêmicos ApoE *knockout* e seus respectivos controle C57, avaliar temporalmente:

- Parâmetros metabólicos (consumo de água e ração e produção de urina em 24 horas) e níveis de colesterol total;
- A taxa de filtração glomerular;
- Possíveis alterações na capacidade de excreção de uréia;
- O estabelecimento de lesão glomerular;
- A senescência renal;
- Possíveis alterações no número de glomérulos;
- Modificações na área glomerular;
- O curso do processo de expansão mesangial;
- Modificações na expressão da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (nNOS).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais

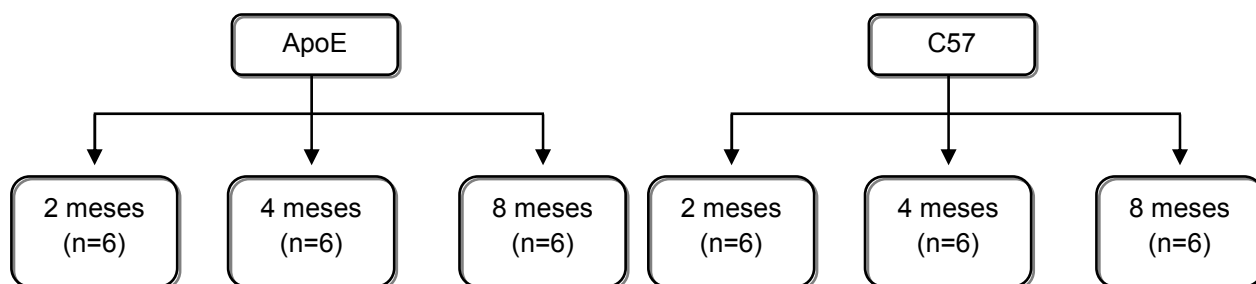
Neste estudo foram utilizados camundongos machos, isogênicos, *knockout* para apolipoproteína E (ApoE) que nascem hipercolesterolêmicos e desenvolvem aterosclerose espontaneamente e seus respectivos controles da linhagem C57BL/6 (C57).

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular da Universidade Federal do Espírito Santo, até o momento da realização dos experimentos, em um ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com temperatura (23°C) e umidade (55%) controladas, onde receberam água e ração (Labina®) *ad libitum*.

A criação e o manuseio experimental dos animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO) e sociedades de biologia e fisiologia experimentais.

4.2. Grupos experimentais

Os animais de cada linhagem foram avaliados em 3 idades diferentes: 2, 4 e 8 meses (n=6 em cada grupo), divididos conforme o organograma abaixo:



Organograma 1: Organograma esquematizando a divisão dos grupos experimentais utilizados no trabalho.

Os protocolos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia (EMESCAM) (Protocolo número 003/2009).

4.3. Parâmetros metabólicos – Avaliação da ingestão de água e ração, excreção de 24 horas e peso corporal

Foram avaliados os seguintes parâmetros metabólicos para cada grupo: ingestão de água e ração de 24 horas e volume urinário do mesmo período. Para tanto, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas para camundongo (Tecniplast®) (Figura 6) por um período inicial de adaptação de 24 horas, após o qual a urina produzida foi descartada. Seguiu-se o período experimental de 24 horas. A urina produzida durante este tempo foi mensurada e armazenada em refrigerador para análises posteriores (Figura 7). As quantidades de água e ração consumidas durante o período experimental foram medidas, assim como o peso corporal do animal ao ser retirado da gaiola metabólica.

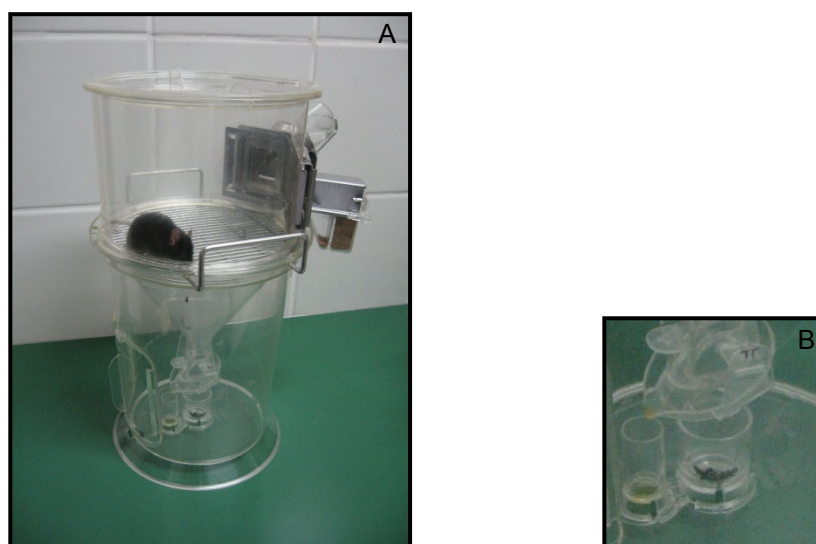


Figura 6: A: Animal alocado em gaiola metabólica durante a realização do experimento. B: Detalhe dos compartimentos da gaiola metabólica que permitem a separação de fezes e urina.

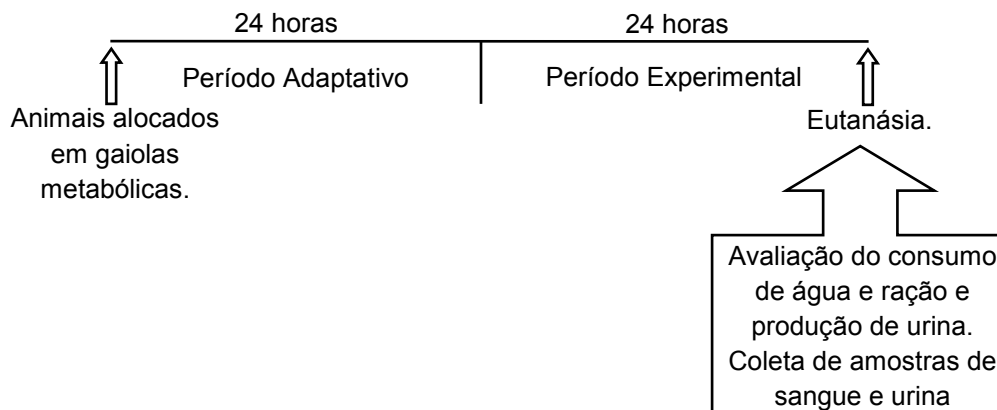


Figura 7: Representação esquemática do protocolo de utilização da gaiola metabólica.

4.4. Parâmetros Bioquímicos

O plasma armazenado foi utilizado para medida de colesterol total, creatinina e uréia (todos se utilizando de Kits Bioclin®) por espectrofotometria (Figura 8).



Figura 8: Espectrofotômetro no qual as dosagens bioquímicas foram realizadas.

4.4.1. Colesterol Plasmático

A determinação do colesterol plasmático baseia-se na formação de um cromóforo cereja a partir da reação do fenol e 4-aminoantipirina e da ação da peroxidase sobre o peróxido de hidrogênio liberado pela ação da enzima colesterol oxidase sobre o colesterol desesterificado. A absorbância do produto final foi medida no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 500 nm. A intensidade da coloração observada é diretamente proporcional à concentração

de colesterol na amostra estudada, que pode ser calculada a partir da utilização de um padrão conhecido, segundo a Lei de Lambert-Beer:

$$[] = \frac{\text{Abs amostra} \times P}{\text{Abs P}}$$

Onde:

[] (mg/dL) = Concentração de colesterol na amostra (mg/dL)

Abs amostra = absorvância da amostra a 500 nm

P = Concentração do padrão (mg/dL)

Abs P = Absorvância do padrão a 500 nm

Devido aos altos níveis de colesterol encontrados nos animais ApoE, seu plasma foi diluído em 1:5 com solução salina antes da realização das medidas para garantir que os valores mensurados estivessem dentro da linearidade da curva de absorvância do kit, e o resultado final encontrado foi multiplicado por 5.

4.4.2. Creatinina sérica, urinária e *clearance* de creatinina

A urina de 24 horas coletada na gaiola metabólica foi utilizada para medida de creatinina, assim como o plasma. A determinação da creatinina baseia-se na formação de um complexo amarelo-avermelhado quando esta reage com ácido pícrico. Nas dosagens realizadas no plasma, houve a necessidade de acidificação do meio após a primeira medida espectrofotométrica devido à formação de produtos cromógenos derivados de elementos plasmáticos. A acidificação desfaz o complexo derivado da creatinina e, por diferença entre as duas medidas, é possível estabelecer a absorvância devida somente à reação com a creatinina. Os cálculos para as concentrações de creatinina também seguem a lei de Lambert-Beer, e foram realizados a partir da absorvância de um padrão conhecido, seguindo a fórmula:

$$[] = \frac{\text{Abs amostra} \times P}{\text{Abs P}}$$

Onde:

[] (mg/dL) = Concentração de creatinina na amostra (mg/dL)

Abs amostra = absorbância da amostra a 510 nm

P = Concentração do padrão (mg/dL)

Abs P = Absorbância do padrão a 510 nm

Para as amostras de urina, foi realizada uma diluição de 1:25 e o resultado final calculado foi multiplicado por 25.

Utilizando-se dos valores de creatinina urinária e plasmática, foi possível calcular a depuração ou *clearance* de tal substância, a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Depuração} = \frac{[U] \times V_T}{[P] \times 1440}$$

Onde:

Depuração = Depuração de creatinina (mL/min)

[U] = Concentração urinária de creatinina (mg/dL)

V_T = Volume total de urina em 24 horas (mL)

[P] = Concentração plasmática de creatinina (mg/dL)

1440 = Tempo de coleta relativa às 24 horas (min)

Na prática clínica, o *clearance* de creatinina costuma ser utilizado como inferência sobre a taxa de filtração glomerular, por ser uma substância livremente filtrada no capilar glomerular, não reabsorvida e cuja taxa de secreção pode ser considerada desprezível.

4.4.3. Uréia Sérica

A uréia é o principal produto resultante do catabolismo de proteínas e aminoácidos excretado na urina e sua concentração sérica pode apresentar-se aumentada em caso de insuficiência renal. A determinação espectrofotométrica da uréia baseia-se em sua hidrólise enzimática pela atuação da enzima urease, liberando íons amônio, os quais em pH alcalino e na presença de salicilato e

hipoclorito de sódio reagem dando origem a um composto esverdeado, cuja concentração pode ser determinada quando a absorvância da solução é medida a 600 nm, utilizando-se de um padrão com concentração conhecida de uréia, segundo a lei de Lambert-Beer:

$$[] = \frac{\text{Abs amostra} \times P}{\text{Abs P}}$$

Onde:

[] (mg/dL) = Concentração de uréia na amostra (mg/dL)

Abs amostra = absorvância da amostra a 600 nm

P = Concentração do padrão (mg/dL)

Abs P = Absorvância do padrão a 600 nm

4.4.4. Albuminúria

A urina coletada foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com SDS (SDS-PAGE). Alíquotas de urina foram diluídas na proporção de 1:1 em solução tampão de Laemmli (Tris-HCl – 62,5 mM, pH 8,0; SDS – 2%; glicerol – 25%; azul de bromofenol – 0,01%; DTT – 6%; uréia – 39 μ M). Em seguida, colocadas em banho-maria a 99°C por 4 minutos para desnaturação das proteínas até sua estrutura primária. As amostras foram, então, aplicadas nos poços presentes no gel de entrada em duplicata, assim como um controle positivo e um marcador de peso molecular que permite a visualização temporal da dinâmica da eletroforese (RPN 800E, GE Health Care, São Paulo, Brasil). Finalmente, o sistema foi submetido a uma corrente constante de 85 V (PowerPac 300, BioRad) por aproximadamente 1 hora e 30 minutos, até que houvesse a desejada separação das bandas observada pelo marcador de peso molecular cromóforo (Figura 9).

O gel foi corado com solução de Comassie, e verificou-se a presença ou ausência de bandas na faixa da banda do controle de albumina (aproximadamente 69 kDa).

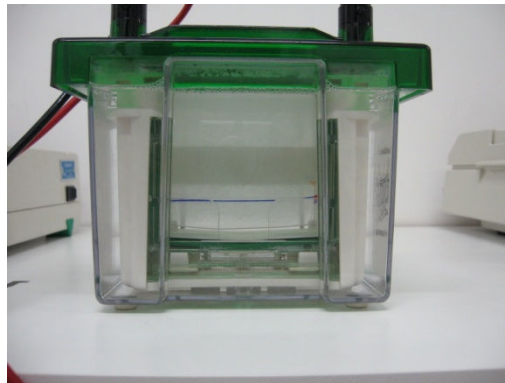


Figura 9: Eletroforese para a separação de proteínas de acordo com o peso molecular.

4.5. Senescência Renal

Para a detecção de senescência renal, utilizou-se a técnica de coloração por medida de atividade enzimática da β -galactosidase em pH 6,0 (Takaki et al., 2004). As amostras de rins previamente fixados em paraformaldeído 4% foram cortadas ao meio longitudinalmente com bisturi e lavadas com PBS. Posteriormente foram expostas a uma solução contendo 1 mM de $MgCl_2$, 4,9 mM de $K_3Fe(CN)_6$, 4,7 mM de $K_4Fe(CN)_6$, e 2,4 mM de X-gal (Sigma-Aldrich) em PBS por 4 horas a 37° C, em pH 6,0. Em tecidos senescentes, o X-gal é hidrolisado pela β -galactosidase e produz um indoliol que é oxidado e emite a coloração azul. A análise da senescência foi realizada através da intensidade da coloração azul. As imagens foram adquiridas usando uma câmera digital (Canon Power Shot A530).

4.6. Análises Histológicas

Os rins fixados foram utilizados para a realização de morfometria da área do tufo capilar glomerular e da cápsula de Bowman e a contagem do número total de glomérulos em lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina. Além disso, foi realizada coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) para avaliação da porcentagem de expansão mesangial e ainda coloração com tricômio de Masson, para averiguação da deposição de colágeno tubular e glomerular.

4.6.1. Preparação das Amostras

Após a eutanásia, os animais foram perfundidos com solução de tampão fosfato em pH fisiológico (PBS; pH 7,4) utilizando-se de pressão similar à fisiológica (100 mmHg) e em seguida com solução de paraformaldeído 4% em PBS, para fixação dos tecidos. Os rins foram retirados e congelados para realização de análise de expressão protéica ou fixados em paraformaldeído por, no mínimo, 24 horas até a realização do processamento para a realização dos cortes histológicos.

As peças foram desidratadas utilizando-se concentrações crescentes de etanol (70%, 96%, 100%) por duas horas em cada solução. Em seguida, embebidas em xilol (3 banhos de 15 minutos) e finalmente em parafina líquida a 58°C (3 horas). Em seguida, os blocos foram solidificados em formas de alumínio, para posterior microtomia (Presnell et al., 1997). Foram realizados cortes de 10 µm de espessura, ao longo de todo o rim, com uma distância de 200 µm entre eles. De cada rim foram feitos cerca de 20 cortes os quais foram montados em lâminas albuminizadas, após abertura dos mesmos em banho-maria a 37°C. Para a realização das colorações, os cortes foram desparafinizados em xilol (3 banhos de 3 minutos cada) e hidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (álcool 50% em xilol, álcool 96% em meio aquoso e álcool 100%, banhos de 3 minutos em cada solução) e água corrente (5 minutos). Em seguida às colorações, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (96% em meio aquoso, 100% e 50% em xilol, banhos de 2 minutos em cada solução), e xilol (3 banhos de 2 minutos) e, finalmente, montados em meio permanente com o uso de verniz.

4.6.2. Coloração com Hematoxilina e Eosina

Foi realizada coloração com HE para realização de morfometria e contagem do número total de glomérulos. Após a desidratação os cortes foram corados com hematoxilina de Mayer por 10 minutos e eosina por 5 minutos. Em seguida, foram desidratados e montados em meio permanente com o uso de verniz. Para análise morfométrica, foram fotografados 10 glomérulos ao longo de 10

cortes selecionados, perfazendo um total de 100 glomérulos por animal, em um aumento de 400X (Microscópio AX70, Olympus, Center Valley, PA, EUA; Câmera Digital VKC150, Hitachi, Tokyo, Japão). A análise foi realizada com o auxílio do programa Image J (*National Institute of Health, USA*). Foram medidas a área do tufo capilar glomerular e da cápsula de Bowman. A área do espaço de Bowman foi calculada através da subtração da área do tufo da área da cápsula. A média dos 100 valores da área mensurada foi considerada como a área média para cada um dos animais. Os 10 cortes selecionados foram totalmente visualizados para a contagem do número total de glomérulos.

4.6.3. Coloração com PAS

Foi realizada a coloração com PAS para indicativo de expansão mesangial, uma alteração histopatológica renal precoce. Após desparafinização, os cortes foram tratados com ácido periódico, seguido por Reagente de Schiff e solução de metabissulfito de sódio. Em seguida, os cortes foram desidratados e montados em meio permanente (Presnell et al., 1997). Um total de 50 glomérulos por animal foram aleatoriamente selecionados e fotografados. Com o auxílio do programa Image J (domínio público), foi determinada a porcentagem de área corada em cada glomérulo. A média dos valores encontrados foi considerada a porcentagem média de expansão mesangial para cada animal.

4.7. Análise de Expressão Protéica

Para a análise da expressão da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (nNOS) renal foi utilizada a técnica de Western Blotting, conforme descrito por Pereira et al (2009).

4.7.1. Extração e Determinação da Concentração Protéica

Imediatamente após perfusão com solução tampão gelado (PBS, pH 7,4), os rins foram congelados (-20°C) até o momento do processamento. Para a extração de proteínas do rim total, inicialmente as peças foram limpas em placa de gelo para a retirada de tecido conjuntivo e pesadas. Então foram maceradas em com o auxílio de um bisturi e, em seguida, vertidas em homogeneizador de vidro contendo 350 µL de tampão de lise hipotônico a 60°C (TrisHCl pH 7,4 – 10 mM, NaVO₃ – 1 mM, SDS – 1%, DTT – 0,5 mM, EDTA – 5 mM, PMSF – 1mM, NaF – 10 mM e inibidor de protease – 1:100 (0.1 µL/mg- Sigma Aldrich P2714)). Após a maceração, as amostras foram centrifugadas à 11000 rpm, por 20 minutos à 4°C em centrífuga refrigerada (Eppendorff ®). O sobrenadante foi recolhido, alíquotas foram retiradas para a dosagem de proteínas e o restante foi armazenado a -20°C.

A determinação da concentração de proteínas em cada amostra foi realizada pelo método de Bradford (1976). A construção de uma curva padrão com albumina sérica bovina permitiu o cálculo das concentrações a partir da absorbância medida a 595 nm, utilizando-se da lei de Lambert-Beer.

4.7.2. Eletroforese

De posse dos valores de concentração protéica previamente determinados, foi possível a diluição de todas as amostras para a aplicação de 100 µg de proteína em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), em condições desnaturantes. A acrilamida permite a preparação de géis que formam malhas que separam proteínas de acordo com o peso molecular. A polimerização do gel foi preparada em sistema Mini-Protean III (BioRad), que é composto de um gel de entrada menos concentrado (3%) e um gel de separação eletroforética mais concentrado, de acordo com o peso molecular da proteína que se deseja separar (no caso deste estudo, 8%) (Figura 10).

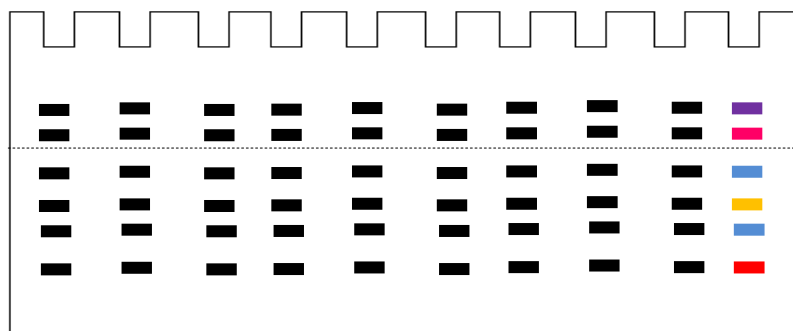


Figura 10: Representação esquemática simples demonstrando a separação protéica de acordo com o peso molecular em SDS-PAGE. A linha tracejada representa a divisão entre o gel de entrada e o gel de separação. Os pontos coloridos representam o marcador de peso molecular. (Adaptado de Pereira, 2005).

Alíquotas do homogeneizado com a concentração de proteína pré-determinada (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foram diluídas na proporção de 1:1 em solução tampão de Laemmli (Tris-HCl – 62,5 mM, pH 8,0; SDS – 2%; glicerol – 25%; azul de bromofenol – 0,01%; DTT – 6%; uréia – 39 μM). Em seguida colocadas em banho-maria a 99°C por 4 minutos para desnaturação das proteínas até sua estrutura primária. As amostras foram, então, aplicadas nos poços presentes no gel de entrada em duplicata, assim como um controle positivo e um marcador de peso molecular que permite a visualização temporal da dinâmica da eletroforese (Sigma, C1992). Finalmente, o sistema foi submetido a uma corrente constante de 85 V (PowerPac 300, BioRad) por aproximadamente 1 hora e 30 minutos, até que houvesse a desejada separação das bandas observada pelo marcador de peso molecular cromóforo.

4.7.3. Blotting

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, RPN 203D, GE-Healthcare) previamente embebida com solução de transferência (Tris-25 mM, Glicina-190 mM, Metanol-20%, SDS-0,1%) por 45 minutos. Para a transferência, o gel, a membrana e o *Blot Paper* (#1703966, BioRad) foram colocados em um sistema de *sandwich* (Figura 11) dentro de um Trans-Blot *Semi-dry* (BioRad). O sistema

foi submetido a uma corrente constante de 25 V (Power Pac 300, BioRad) durante 60 minutos.

A transferência foi confirmada pela presença de coloração das bandas do marcador de peso molecular na membrana, pela ausência de bandas no gel através da coloração com Coomassie Blue, além da coloração da membrana com Ponceau 0,1 % em ácido acético.

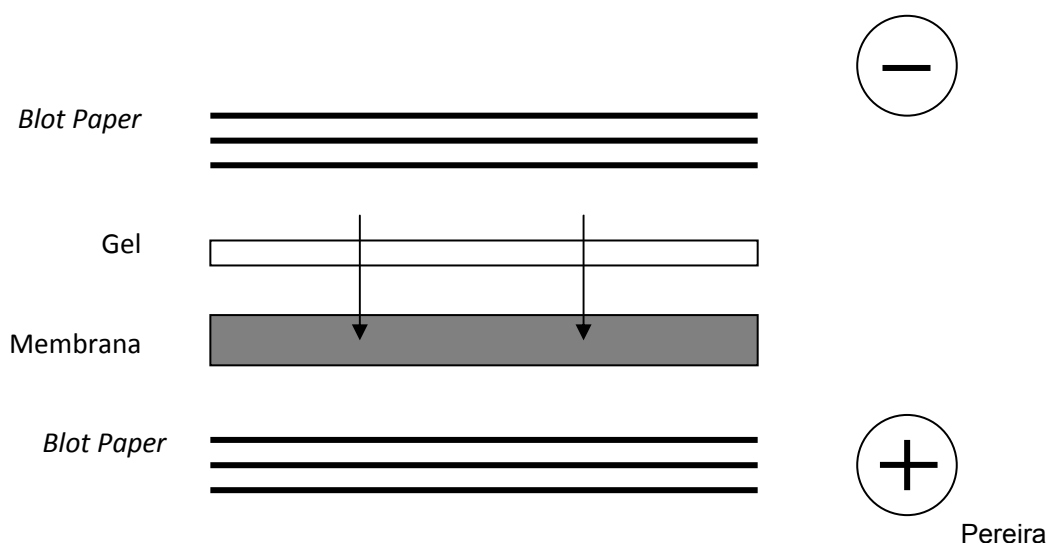


Figura 11: Representação esquemática da transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose. As setas indicam o sentido da migração das proteínas (catodo para o anodo) previamente separadas durante a eletroforese (SDS-PAGE), de acordo com o peso molecular. (Adaptado de Pereira, 2005).

Para descoloração da membrana, foi utilizado ácido acético 1% por 5 minutos. Em seguida, água deionizada durante 5 minutos e por fim, PBS-T (Na_2HPO_4 – 80 mM, NaH_2PO_4 – 20 mM, NaCl – 100 mM, Tween 20 – 0,1%) durante 5 minutos. A seguir, o bloqueio não específico da membrana foi realizado com 10% de leite desnatado em PBS-T por um período de 1 hora sob agitação constante. Após isso, a membrana foi lavada com PBS-T durante 15, 5 e 5 minutos, respectivamente. Após lavagem, a membrana foi dividida em duas partes para incubação devida com os anticorpos primários anti-nNOS (Santa Cruz Biotechnology – SC-648, policlonal, diluição 1/250 em PBS-T + albumina bovina a 3%) e anti-GAPDH como *housekeeping* (Abcam 8245, monoclonal, diluição 1/5000 em PBS-T + albumina bovina a 3%), ambos em *overnight* a 4°C

sob agitação constante. O corte da membrana possibilita a exposição simultânea dos 2 tipos de anticorpos, já que as proteínas avaliadas possuem pesos moleculares de 136 kDa e 37 kDa, respectivamente.

Em seguida, a membrana foi cuidadosamente lavada com PBS-T 3 vezes durante 20 minutos, também sob agitação. Após lavagem, foi feita a incubação do anticorpo secundário anti-rabbit e anti-mouse (ECL GE Healthcare – RPN 2108, diluição 1/2000 em PBS-T + 3% de leite desnatado) durante 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. Mais uma vez, a membrana foi lavada com PBS-T em 3 momentos de 20 minutos, também sob a mesma agitação.

4.7.4. Revelação e Análise dos Resultados

Para revelação da membrana, foi usado o sistema para ECL (GE Healthcare - RPN 2108). A membrana foi envolvida com plástico e fixada no hipercassete. Rapidamente, numa sala escura, o filme de raio X (IBF - Medix) foi adicionado sobre esta membrana. Após exposição de 2 minutos (ou mediante a intensidade de luz emitida), o filme foi revelado (revelação-fixação-lavagem, IBF-filmes, Brasil, São Paulo). A seguir, as imagens respectivas foram digitalizadas com o auxílio do *scanner* e em seguida, a densitometria das bandas foi feita com o auxílio do software “Image J” (domínio público - National Institute of Health, USA).

4.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se Análise de Variância de duas vias (ANOVA), seguida do *post hoc* de Fisher, utilizando-se o programa GB-Stat versão 6.5 (Dynamic Microsystems, Inc.). O nível de significância foi estabelecido em 95%.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros Metabólicos – Peso corporal, consumo de água e ração e excreção de 24 horas

Os animais foram alocados em gaiolas metabólicas para avaliação de parâmetros metabólicos. A tabela 1 sumariza os resultados obtidos durante as análises dos seguintes parâmetros: peso corporal, consumo de água e ração de 24 horas e volume urinário de 24 horas.

Não foram observadas alterações significativas de peso corporal entre os animais C57 e ApoE de mesma idade aos 2, 4 e 8 meses de idade. Entretanto, os animais de 8 meses de ambos os grupos apresentam-se mais pesados que os respectivos camundongos de mesma linhagem aos 2 meses.

Em relação ao consumo de ração, alterações significativas não foram observadas entre os animais C57 e ApoE aos 2, 4 ou aos 8 meses de idade. Quando comparados aos respectivos camundongos de mesma linhagem aos 2 meses, tanto os animais C57 quanto os ApoE de 8 meses apresentam queda no consumo alimentar.

O consumo de água mensurado no período de 24 não apresenta-se alterado em função da idade e tampouco da hipercolesterolemia, de forma que não há diferença estatisticamente significante em qualquer dos grupos estudados.

De maneira semelhante, a produção de urina não é afetada pelo incremento da idade nos animais normocolesterolêmicos, tampouco na presença de hipercolesterolemia.

Tabela 1 – Parâmetros Metabólicos

Parâmetro	2 meses		4 meses		8 meses	
	C57	ApoE	C57	ApoE	C57	ApoE
Peso Corporal (g)	25,6±0,4	24,8±1,0	26,9±0,8	26,8±0,6	29,1±1,2**	28,1±0,8*
Consumo de Ração (g)	3,7±0,4	4,0±0,2	3,2±0,2	3,6±0,3	2,2±0,2**	2,8±0,3**
Consumo de Água (mL)	8,2±1,6	7,6±0,8	7,7±0,8	7,1±0,7	6,3±0,9	5,4±0,6
Produção de Urina (mL)	2,7±0,3	2,6±0,4	2,3±0,3	2,0±0,3	2,2±0,4	1,7±0,2

Valores estão expressos como média ± erro padrão da média. **p<0,01 e *p<0,05 vs. mesma linhagem aos 2 meses.

5.2. Colesterol Total

Conforme esperado, os animais ApoE apresentam níveis de colesterol no mínimo 5 vezes maiores que seus respectivos controles de mesma idade, conforme demonstrado pela figura 12 (C57 2 meses: $94,0 \pm 5,1$; ApoE 2 meses: $606,0 \pm 91,3$; C57 4 meses: $97,1 \pm 7,2$; ApoE 4 meses: $493,7 \pm 44,0$; C57 8 meses: $116,0 \pm 10,0$ e ApoE 8 meses: $636,1 \pm 76,4$). O processo de envelhecimento não influencia tal parâmetro nos animais normocolesterolêmicos e tampouco nos hipercolesterolêmicos, visto que não há diferenças entre os animais de mesma linhagem em idades distintas.

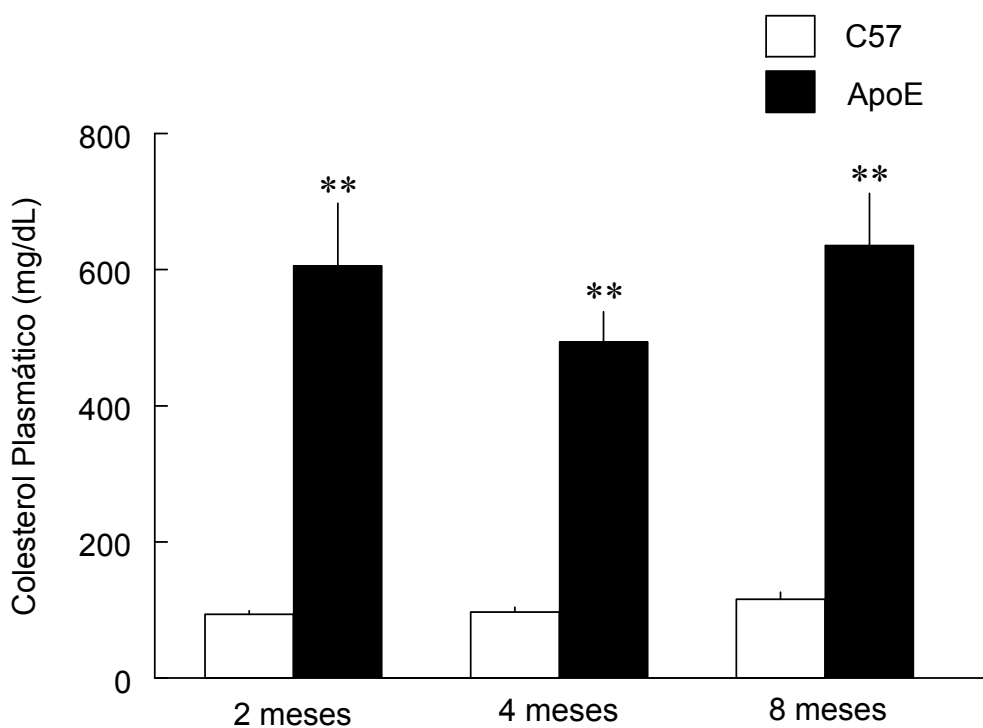


Figura 12: representação gráfica dos resultados encontrados para as medidas de colesterol sérico total. ** $p < 0,01$ vs. respectivo controle C57.

5.3. Depuração de Creatinina

A depuração de creatinina, calculada a partir das concentrações desta substância no plasma e na urina de 24 horas, serve como uma inferência sobre a taxa de filtração glomerular e, deste modo, como um indicativo de função renal nos animais estudados. A figura 13 sumariza os resultados encontrados para este parâmetro. Observa-se uma redução temporal da taxa de filtração glomerular nos animais C57 (2 meses: 358 ± 92 , 4 meses: 211 ± 60 e 8 meses: 81 ± 14). Interessantemente, aos 2 meses os animais ApoE já apresentam filtração reduzida em relação ao respectivo controle (187 ± 28). Como aos 4 e 8 meses a filtração dos animais C57 reduz-se, tal diferença é abolida (ApoE 4 meses: 128 ± 42 e ApoE 8 meses: 93 ± 18).

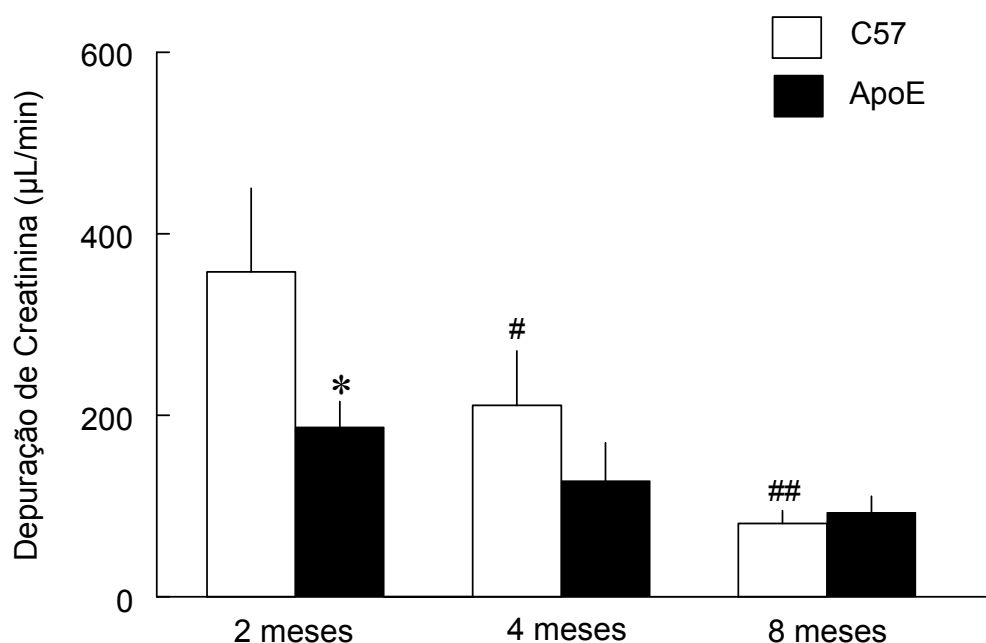


Figura 13: representação gráfica dos resultados obtidos para depuração de creatinina. * $p < 0,05$ vs. respectivo controle C57; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ vs. animais de mesma linhagem aos 2 meses de idade.

5.4. Uréia Sérica

O incremento na concentração sérica de uréia serve como indicativo de comprometimento renal devido à incapacidade dos rins de excretar tal substância. Os animais ApoE apresentam elevação da uréia sérica em relação aos respectivos controles C57 em todas as idades (C57 2 meses: $39,8 \pm 5,2$; ApoE 2 meses: $64,5 \pm 7,6$; C57 4 meses: $41,1 \pm 7,8$; ApoE 4 meses: $73,5 \pm 17,9$; C57 8 meses: $49,1 \pm 3,5$; ApoE 8 meses: $77,3 \pm 7,5$), conforme demonstrado pela figura 14. A idade não influencia este parâmetro em ambas as linhagens estudadas.

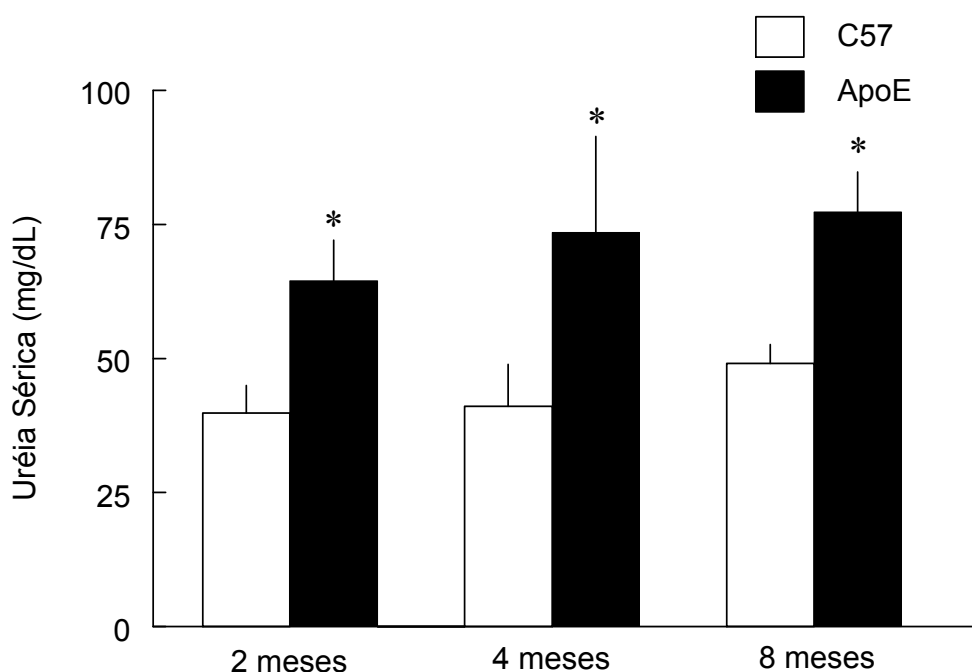


Figura 14: representação gráfica dos resultados obtidos para dosagem de uréia plasmática. * $p < 0,05$ vs. respectivo controle C57.

5.5. Albuminúria

A presença de albuminúria, que serve como indicativo de severa injúria glomerular, foi realizada através de eletroforese de amostras de urina. Conforme demonstrado na figura 15, somente os animais ApoE de 8 meses apresentam bandas coradas de mesmo peso molecular que a albumina, indicando lesão glomerular nestes animais.



Figura 15: foto de gel de poliacrilamida com SDS, corado com *Comassie Blue*, no qual foi realizada eletroforese de amostras de urina. Verifica-se a presença de albumina na urina dos animais ApoE aos 8 meses.

5.6. Senescência Renal

A ocorrência de senescência renal foi verificada através da técnica SA- β -gal (senescência associada à β -galactosidase). Neste caso a intensidade da coloração azul é diretamente proporcional ao índice de senescência do tecido estudado. Como controle positivo, foi utilizado rim de camundongo transgênico Lac-Z, o qual superexpressa a enzima β -galactosidase.

A figura 16 demonstra os resultados obtidos para este parâmetro nos rins dos animais de 2, 4 e 8 meses de ambos os grupos, corados *en face* com a técnica SA- β -gal. A intensidade da coloração azul aumenta temporalmente nos animais controle, indicando que o envelhecimento leva à senescência renal (os pontos mais corados nos animais de 2 e 4 meses tratam-se de artefatos produzidos pela fixação do tecido em suporte durante a coloração). Observa-se claramente que a hipercolesterolemia leva à senescência renal precoce aos 2 meses de idade, que permanece ao longo das idades estudadas nos animais ApoE. Interessantemente, a medula não se apresenta corada em nenhum dos rins utilizados.

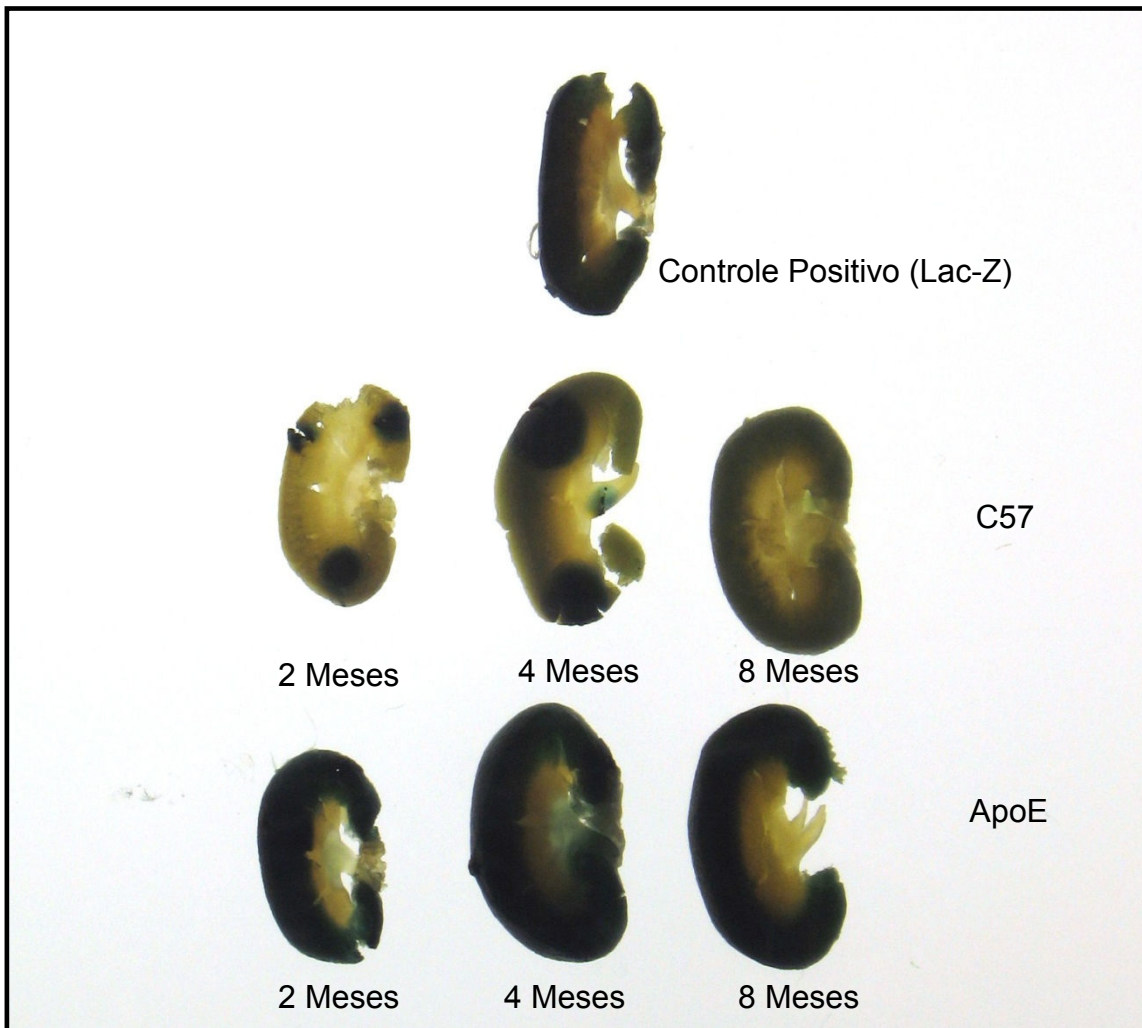


Figura 16: Fotografia dos rins de animais C57 e ApoE aos 2, 4 e 8 meses corados com a técnica de SA-β-gal para demonstração de senescência. Como controle positivo foi utilizado rim de camundongo Lac-Z macho.

5.7. Contagem de Glomérulos

As possíveis alterações temporais e decorrentes da hipercolesterolemia no número de glomérulos foram avaliadas. A figura 17 sumariza os resultados encontrados para a contagem do número total de glomérulos em 10 cortes de cada animal. A idade parece não influenciar este parâmetro no curso temporal estudado, uma vez que não há diferenças entre os animais de mesma linhagem em idades diferentes (C57 2 meses: 1593 ± 270 ; C57 4 meses: 1472 ± 97 e C57 8 meses: 1410 ± 71). A hipercolesterolemia não foi capaz de alterar significativamente este parâmetro nas idades estudadas (ApoE 2 meses: 1663 ± 147 ; ApoE 4 meses: 1663 ± 121 e ApoE 8 meses: 1668 ± 186).

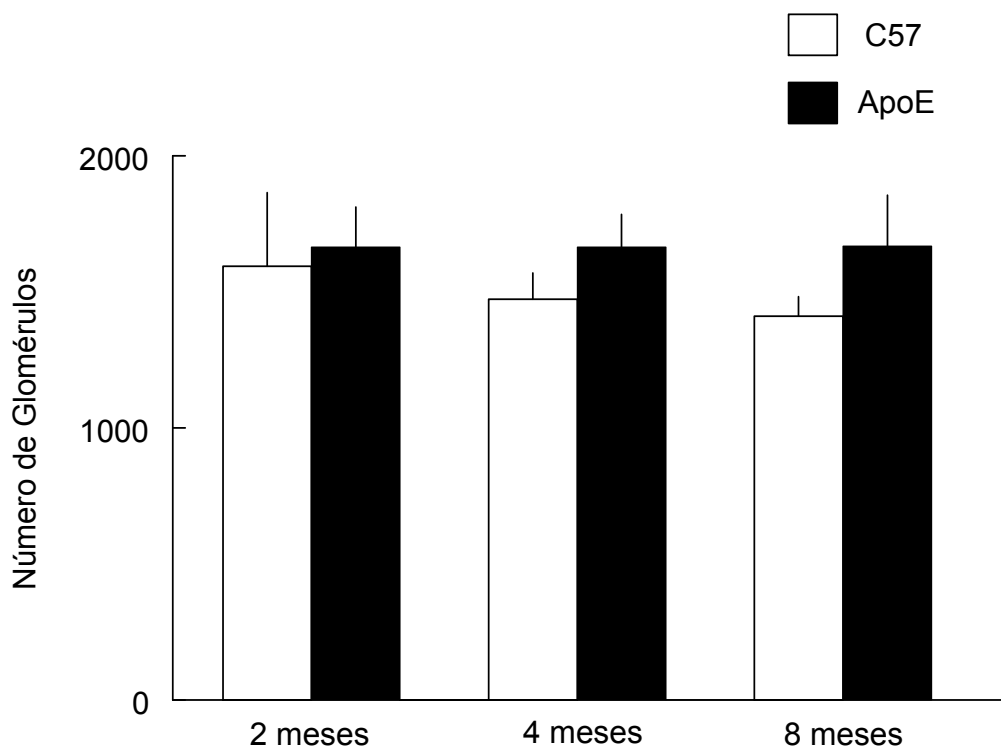


Figura 17: representação gráfica dos resultados obtidos para a contagem de glomérulos.

5.8. Morfometria Glomerular

A morfometria do tufo capilar glomerular foi avaliada para verificar a ocorrência de possível hipertrofia glomerular. As fotos típicas de glomérulos de animais C57 e ApoE são representadas na figura 18.

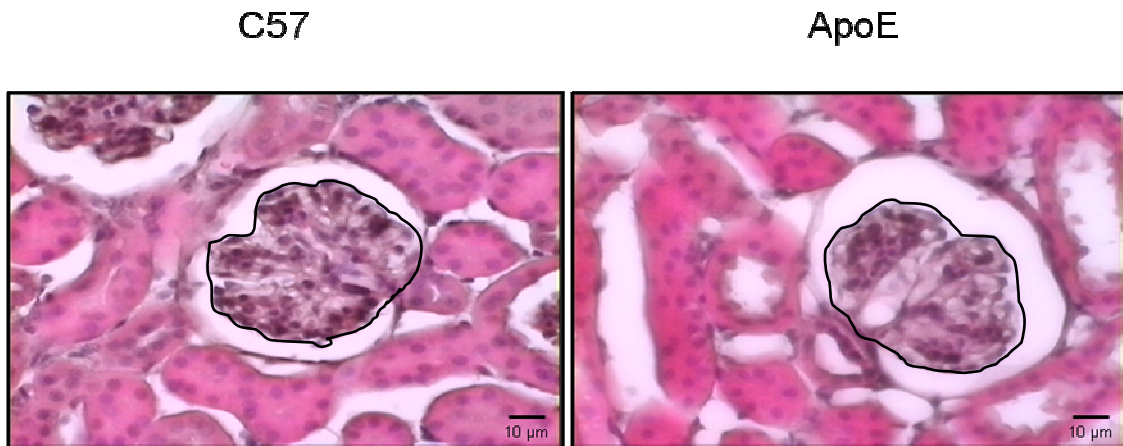


Figura 18: fotos típicas de glomérulos de animais C57 e ApoE corados com hematoxilina-eosina. Em preto está representada a delimitação da área do tufo glomerular mensurada. Aumento de 40x.

Conforme representado pela figura 19, nem a idade e tampouco a hipercolesterolemia foram capazes de provocar alterações significativas neste parâmetro (C57 2 meses: 2617 ± 330 ; C57 4 meses: 3062 ± 276 ; C57 8 meses: 3278 ± 351 ; ApoE 2 meses: 2869 ± 308 ; ApoE 4 meses: 3566 ± 90 ; ApoE 8 meses: 3387 ± 478).

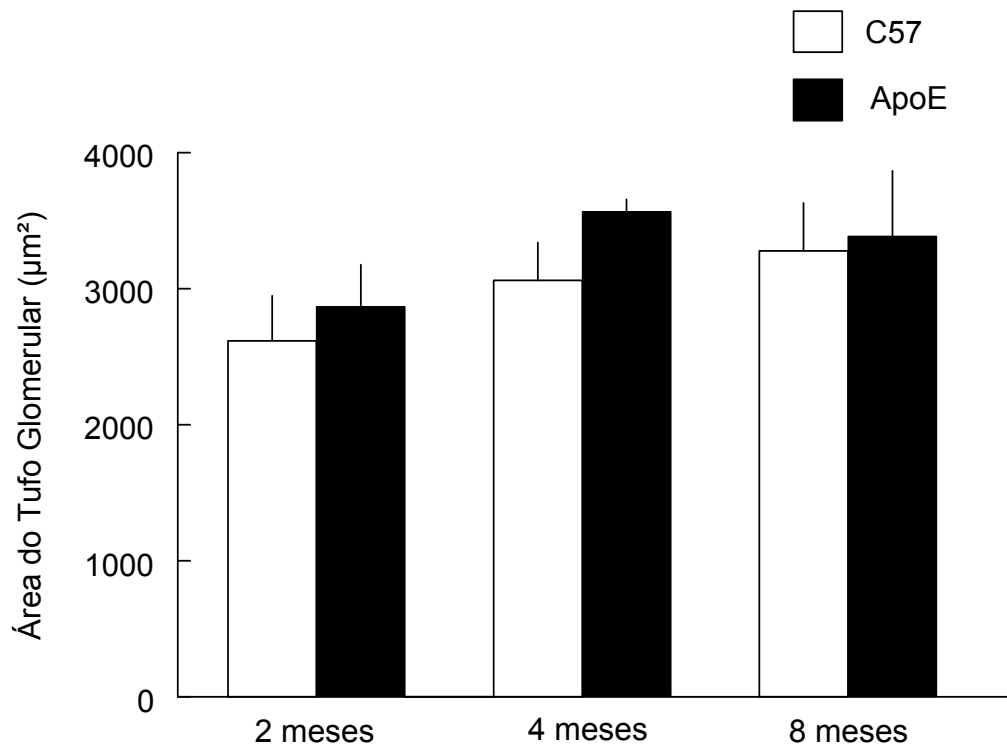


Figura 19: representação gráfica dos resultados obtidos para análise da área do tufo glomerular.

5.9. Expansão Mesangial

A avaliação da expansão mesangial foi feita através da análise da intensidade de coloração dos glomérulos com Ácido Periódico de Schiff (PAS), conforme fotos típicas mostradas na figura 20.

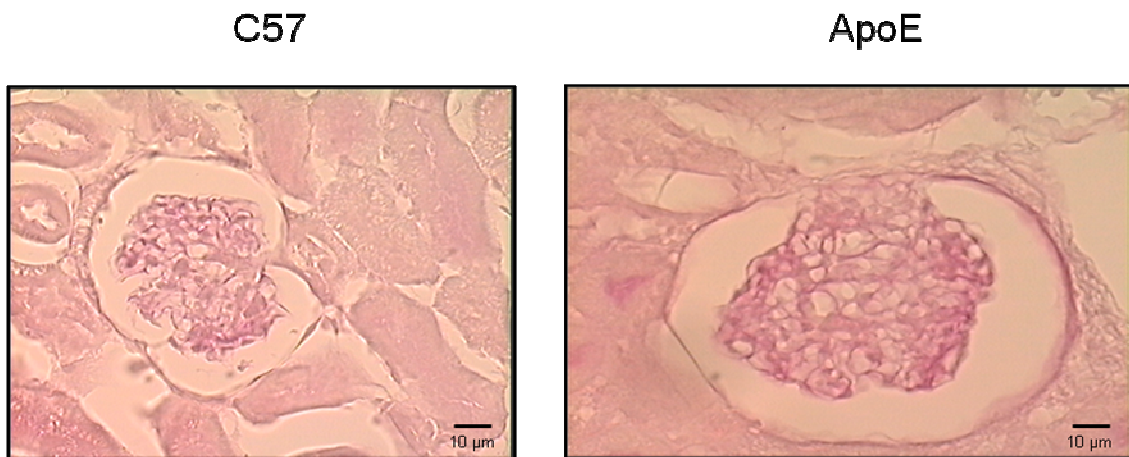


Figura 20: fotos típicas de glomérulos de animais C57 e ApoE corados com Ácido Periódico de Schiff. Aumento de 40x.

Interessantemente, a hipercolesterolemia promove marcante expansão mesangial nos animais ApoE aos 2 meses de idade, quando comparados ao respectivo controle de mesma idade ($35,3 \pm 0,8$ vs. $29,8 \pm 0,9$; Figura 21). O curso temporal exacerba esta condição nos animais hipercolesterolêmicos (ApoE 4 meses: $40,4 \pm 1,2$ e ApoE 8 meses: $41,5 \pm 2,7$) além de estabelecer significativa expansão mesangial nos animais controle (C57 4 meses: $37,8 \pm 1,3$ e C57 8 meses: $37,4 \pm 0,7$).

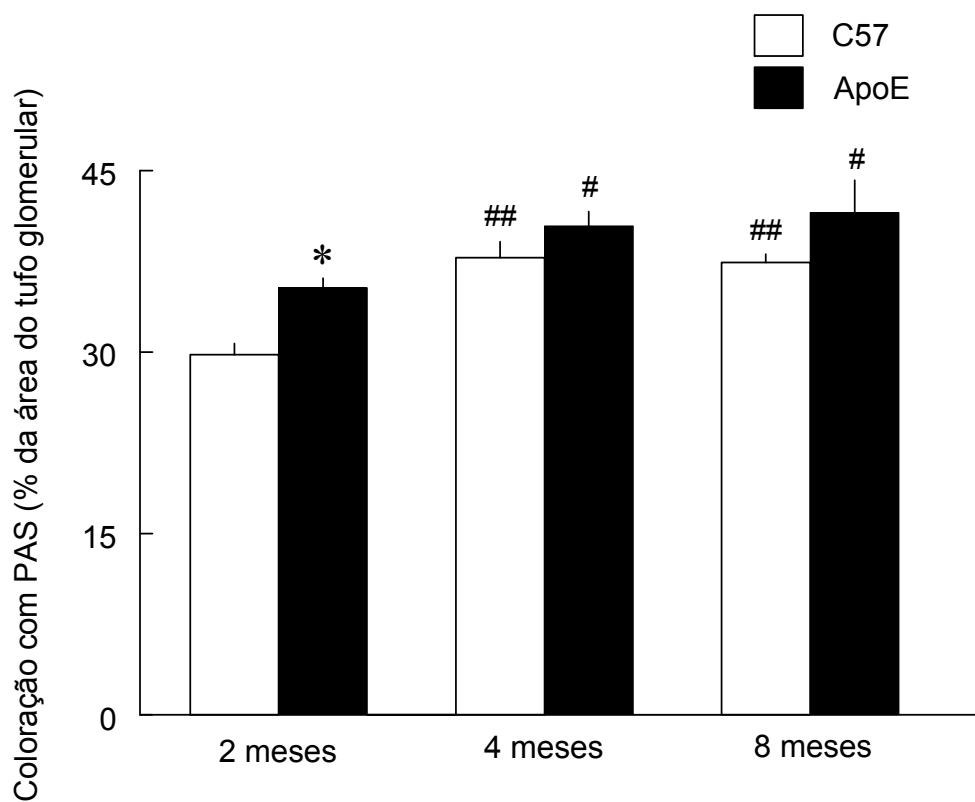


Figura 21: representação gráfica dos resultados obtidos para avaliação da expansão mesangial através da coloração com PAS. * $p < 0,05$ vs. respectivo controle C57; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ vs. animais de mesma linhagem aos 2 meses de idade.

5.10. Expressão da nNOS

A expressão da enzima nNOS foi verificada através da técnica de *Western Blotting*. Conforme verificado na figura 22, aparentemente o curso temporal não é capaz de modificar significativamente a expressão da enzima nos animais controle (C57 2 meses: $0,53 \pm 0,16$; C57 4 meses: $1,05 \pm 0,2$ e C57 8 meses: $1,09 \pm 0,13$). Este parâmetro não parece ser influenciado pela presença da hipercolesterolemia (ApoE 2 meses: $0,88 \pm 0,25$; ApoE 4 meses: $0,79 \pm 0,14$ e ApoE 8 meses: $0,89 \pm 0,12$).

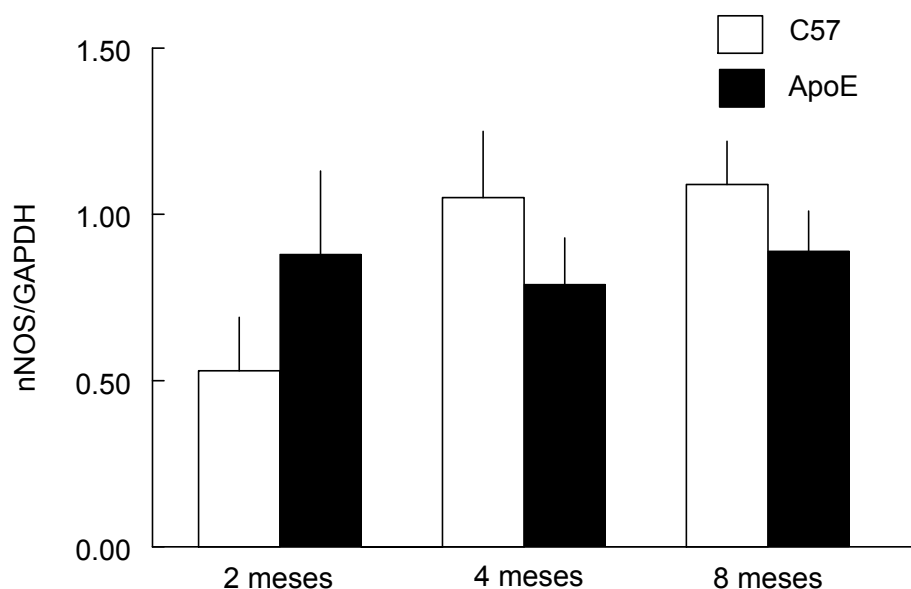


Figura 22: representação gráfica dos resultados obtidos para análise da expressão da enzima nNOS. Os resultados estão expressos em relação à expressão da proteína *housekeeping* GAPDH.

6. DISCUSSÃO

O manejo do processo de envelhecimento constitui-se em um dos maiores desafios da humanidade. A ciência moderna já é capaz de compreender que, para que se possam manipular os eventos associados ao processo de envelhecimento, é preciso desvendar seus mecanismos. A partir dessa concepção, várias teorias complementares entre si foram criadas visando explicar as alterações fisiológicas e morfológicas observadas nos indivíduos à medida que envelhecem.

A teoria mitocondrial propõe que o aumento do estresse oxidativo promovido pela ocorrência de disfunção mitocondrial seria o mecanismo básico responsável pelo envelhecimento em mamíferos, uma vez que estas organelas são as principais fontes produtoras de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo os radicais livres. Esses radicais altamente reativos podem associar-se a polímeros de maior estabilidade, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Desta interação surgem moléculas alteradas, que servem como marcadores moleculares de estresse oxidativo e que podem apresentar alterações funcionais, até mesmo envolvendo a aquisição de propriedades tóxicas (Choksi et al., 2007). Deste modo, há um acúmulo temporal de danos celulares, que compromete a função fisiológica normal da célula.

De fato, em animais C57 observou-se um incremento na senescência renal à medida que os animais envelhecem. Conforme já mencionado, a senescência não guarda necessariamente relação com a idade celular, estando mais intimamente relacionada à injúria sofrida pelo tecido (Dmitrieva e Burg, 2007). Deste modo, é natural se esperar que o acúmulo temporal de danos celulares leve à senescência tecidual, com perda de funcionalidade representada pela redução da filtração glomerular, discutida adiante.

Conforme já mencionado, modificações observadas durante o incremento da idade compartilham mecanismos comuns a determinados distúrbios. Neste caso, a hipercolesterolemia torna-se um agravante às perdas funcionais temporais, na medida em que também promove aumento do estresse oxidativo

(Wever et al., 1998). Já foi descrito que a hipercolesterolemia aumenta a produção de radicais superóxido (uma das espécies reativas de oxigênio mais ativas e danosas) em células endoteliais (Ohara et al., 1993). Corroborando para essa teoria, sabe-se que a oxidação de lipídios pode gerar um ciclo auto-sustentável de produção de radicais de oxigênio e oxidação de proteínas (Scheuer et al., 2000). Uma vez que alterações no balanço entre agentes oxidantes e antioxidantes determinam o estado de oxidação de um dado tecido e que qualquer falha na compensação antioxidante ou aumento da atividade das enzimas oxidantes podem contribuir para o aumento do estresse oxidativo tecidual (Gwinner et al., 1997), pode-se inferir que seja por isso que animais geneticamente hipercolesterolêmicos, como o ApoE, tratem-se de modelos interessantes para estudos de aceleração do envelhecimento.

Constatou-se que os animais ApoE apresentam senescência do tecido renal já aos 2 meses de idade, quando comparados aos respectivos controle C57. Estes dados indicam que a hipercolesterolemia presente nestes animais é capaz de promover o estabelecimento precoce de um processo de senescência renal, de acordo com o que é descrito pela literatura no que tange à influência dos altos níveis de colesterol sobre o aumento do estresse oxidativo.

A apolipoproteína E é um constituinte das moléculas de VLDL (lipoproteínas de densidade muito baixa), sintetizado no fígado e em outros tecidos que atua como ligante de alta afinidade para os receptores de LDL (lipoproteínas de baixa densidade) e participa do processo de captação celular do LDL. Desta forma, a ausência de apolipoproteína E determina altos níveis séricos de colesterol (Jawien et al., 2004).

Como esperado, os animais do grupo ApoE apresentaram níveis no mínimo 5 vezes maiores de colesterol plasmático quando comparados a seus respectivos controles C57. Este achado está de acordo com a literatura desde que esse animal geneticamente modificado foi desenvolvido por Piedrahita e colaboradores em 1992, e que foi demonstrado por Plump e colaboradores (1992) que desenvolvia hipercolesterolemia e deposição de placa aterosclerótica espontaneamente. Ainda de acordo com a literatura, estes

níveis não se alteraram com o incremento da idade (Jawien et al., 2004). Os animais ApoE *knockout*, portanto, representam um modelo plenamente estabelecido de hipercolesterolemia genética, que independe da administração de dieta rica em lipídios e que desenvolve placas ateroscleróticas espontaneamente (Meir e Leitersdorf, 2004).

De acordo com a teoria de que o envelhecimento leva a um aumento do estresse oxidativo e que os animais hipercolesterolêmicos apresentem uma exacerbação da produção de radicais livres (Chade et al., 2002), pode-se inferir que nestes animais haja um comprometimento da biodisponibilidade de óxido nítrico. Na presença de ânions superóxido, há a formação de radicais peroxinitrito, a partir do NO (Wever et al., 1998). Estes radicais ligam-se a resíduos de tirosina nas proteínas, servindo como marcador de estresse oxidativo tecidual (Upmacis et al., 2007). Se os animais ApoE apresentam, então, comprometimento do sistema NO, podem ser comparados a camundongos nos quais o gene do receptor de bradicinina B₂ foi inativado (B₂ *knockout*).

A bradicinina trata-se de um peptídeo de 9 resíduos de aminoácidos formada pela ação da protease calicreína sobre o substrato cininogênio. Tal nonapeptídeo exerce sua ação através da ativação de receptores transmembrana acoplados à proteína G denominados B₁ e B₂. Os receptores B₂ são constitutivamente expressos e são responsáveis pelas principais ações conhecidas da bradicinina, ao passo que os receptores B₁ são fracamente expressos em condições fisiológicas, mas estão regulados positivamente (*upregulated*) em estados patológicos e são ativados pelo metabólito proveniente da degradação da bradicinina por uma carboxipeptidase (normalmente a enzima conversora da angiotensina, também envolvida na formação de angiotensina II a partir de angiotensina I). No rim, os efeitos mais pronunciados da bradicinina devem-se à ativação dos receptores B₂, promovendo redução da resistência vascular renal e aumento no fluxo sanguíneo renal, sem alterações na taxa de filtração glomerular. Além disso, estimulam a diurese e a natriurese. Tais ações da bradicinina devem-se, ao

menos em parte, pelo aumento da produção de NO estimulada pelo agonismo dos receptores B₂ (Schanstra et al., 2003).

Visto isso, poderia ser esperado que animais *knockout* para receptores B₂ apresentassem redução de diurese. Interessantemente, isso não foi observado por Schanstra e colaboradores (2003), apesar da redução de nitritos urinários, que reflete a redução da produção de NO. Esses dados corroboram para a teoria de que, mesmo com o comprometimento da biodisponibilidade de NO, os animais ApoE não apresentam alteração de fluxo urinário à medida que envelhecem, de maneira similar a seus respectivos controles, uma vez que não foram observadas alterações significativas no volume urinário de 24 horas nos grupos estudados. Em paralelo, também não foi observado aumento no fluxo urinário de 24 horas em ratas Wistar fêmeas, com o incremento da idade (Casadevall et al., 1995).

Em humanos e roedores é comum a redução do consumo de alimento à medida que envelhecem (Kmiec, 2006). O mesmo foi observado nos animais de 8 meses de ambos os grupos. Provavelmente nesta idade os animais já estão em processo de redução das funções orgânicas normais, o que explicaria a redução na ingestão de ração.

Em relação ao consumo de água, observou-se uma tendência ao mesmo padrão encontrado para a ração, embora sem diferenças estatisticamente significantes.

Por outro lado, houve aumento do peso corporal aos 8 meses, em ambos os grupos. Isso se deve ao crescimento normal do animal, conforme previamente descrito em ratos (Reckelhoff et al., 1998) e camundongos C57 (Jiang et al., 2005).

O envelhecimento pode promover, contudo, marcante comprometimento funcional em diversos órgãos além das alterações metabólicas já descritas. Segundo Berg (2006), a melhor maneira de se medir a funcionalidade dos rins é através da taxa de filtração glomerular. Essa medida é importante porque

visa não somente a caracterização de diferentes doenças renais, mas também o ajuste de dose de diversos medicamentos, a avaliação do efeito de terapias e garante que potenciais doares de rins para transplante apresentem função renal normal.

Observou-se que o processo natural de envelhecimento leva à perda de função renal, conforme demonstrado pela redução da taxa de depuração de creatinina dos animais C57 à medida que envelhecem.

A creatinina é uma substância endógena, produzida a partir do metabolismo de proteínas, sobretudo em células musculares. Devido ao fato de ser uma substância livremente filtrada no glomérulo, que não é reabsorvida e cuja taxa de secreção é baixa, a depuração (*clearance*) da creatinina costuma ser usada na prática clínica para inferir sobre a taxa de filtração glomerular e, desta maneira, sobre a função renal (Margarida et al., 2008).

Embora Qi e colaboradores (2003) critiquem o uso do *clearance* de creatinina como indicativo da taxa de filtração glomerular em camundongos devido à presença de cromógenos endógenos diferentes da creatinina, o que poderia ocasionar erros de leitura espectrofotométrica, a utilização do método de Jaffé modificado assegura que a cor devida aos cromógenos seja descontada nos cálculos de concentração plasmática de creatinina.

Considerando isso, a redução temporal na depuração de creatinina observada nos camundongos normocolesterolêmicos é um indicativo de perda de função renal nestes animais. Este achado está de acordo com o que é relatado pela literatura. Foi demonstrado que homens têm redução significativa da taxa de filtração glomerular em relação ao incremento da idade, embora tal redução não seja tão acentuada em mulheres, potencialmente devido ao efeito protetor do estrogênio e prejudicial da testosterona (Baylis, 2005; Berg, 2006).

Em animais experimentais, foi relatado que ratos apresentam redução temporal de filtração, embora a velocidade com que a injúria ocorre varie conforme a linhagem estudada (Baylis e Corman, 1998). Interessantemente, afirma-se que

a redução funcional observada com o incremento da idade está associada a uma prévia redução do fluxo sanguíneo para o rim, devido à vasoconstrição renal observada em indivíduos normotensos e, mais ainda, em hipertensos (Schmieder et al., 1994; Fliser et al., 1997), potencialmente provocada pela redução da disponibilidade de moléculas vasodilatadoras ou acúmulo de vasoconstritoras.

Estudos demonstram que as mudanças temporais observadas em rins de ratos são acompanhadas pelo incremento de estresse oxidativo e peroxidação lipídica e que tais modificações podem ser parcialmente prevenidas pela administração de vitamina E, um poderoso agente antioxidante (Reckelhoff et al., 1998). Considerando que o aumento do estresse oxidativo reduz a disponibilidade de vasodilatadores, esse pode ser um provável mecanismo pelo qual o envelhecimento leva ao prejuízo de função renal.

A perda temporal de funcionalidade renal em condições normais é lenta o suficiente para que não haja grande prejuízo na ausência de co-morbidade. Entretanto, há perda de “reserva renal”, de maneira que o órgão se torna altamente suscetível a dano, caso haja alguma doença associada, como hipercolesterolemia, diabetes ou hipertensão.

Surpreendentemente, observou-se que os animais ApoE apresentam redução da filtração glomerular em relação aos respectivos controles aos 2 meses. Assim, podemos afirmar que a hipercolesterolemia genética provoca perda precoce de função renal. Por partir de valores mais baixo de depuração de creatinina, o incremento na idade durante o curso temporal estudado não é capaz de alterar de maneira significativa esse parâmetro, que já se encontra prejudicado nos animais jovens. Aos 8 meses, ambos os grupos apresentam severo comprometimento, de modo que não há diferença entre os animais hipercolesterolêmicos e seus controles.

Questiona-se que os danos renais provocados pela aterosclerose possam ser devidos a outros fatores além da própria estenose arterial renal, visto que está associada a somente pequenas alterações de pressão arterial e função renal

(Chade et al., 2002). O presente estudo demonstra que a hipercolesterolemia, *per se*, contribui para o comprometimento da filtração glomerular em animais jovens.

Sabe-se que a estenose arterial renal, normalmente provocada pela hipercolesterolemia, pode estar envolvida com a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico e exacerbação do sistema renina-angiotensina intra-renal, levando à inflamação e predominância de agentes vasoconstritores e promotores de crescimento (Sigmon e Beierwaltes, 1993; Barton et al. 2001; Napoli e Ignarro, 2001). Isto explica o notável prejuízo na função renal dos animais hipercolesterolêmicos, visto que o NO constitui-se no principal vasodilatador renal cujos efeitos se opõem justamente àqueles promovidos pela angiotensina II (Ren et al., 2002).

Além de apresentar-se como um fator de risco para a progressão de doença renal (Samuelson et al., 1997; Muntner et al., 2000; Scheuer et al., 2000; Bruneval et al., 2002; Wen et al., 2002; Buzello et al., 2004), a hipercolesterolemia promove aumento na geração de espécies reativas de oxigênio e outros radicais livres, culminando com aumento do estresse oxidativo sistêmico (Chade et al., 2002), que compromete a disponibilidade de vasodilatadores endógenos e promove aumento da resistência vascular renal com conseqüente redução de fluxo.

Surpreendentemente, não foram observadas alterações temporais significativas na expressão da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (nNOS) nos animais controle e tampouco naqueles hipercolesterolêmicos, como seria esperado durante o processo de envelhecimento, conforme descrito para ratos machos (Baylis C., 2005). Este achado está de acordo com outro estudo utilizando camundongos ApoE machos com 20 e 35 semanas de idade, no qual também não se observou alterações nos marcadores de produção de NO em aorta (Villeneuve et al., 2003). Nestes animais, observou-se aumento da atividade da enzima NADPH oxidase, levando a uma maior produção de ânions superóxido. Deste modo, ainda que a expressão da enzima encontre-se inalterada, pouco provavelmente o óxido nítrico produzido está disponível para

realizar suas ações. A ocorrência de senescência renal associada ao envelhecimento e, mais ainda, à hipercolesterolemia sugere que o potencial envolvimento do estresse oxidativo neste processo.

Como previamente mencionado, o envelhecimento e a hipercolesterolemia guardam mecanismos comuns que levam à perda de função de diversos órgãos. Por isso, os animais geneticamente hipercolesterolêmicos ApoE constituem-se em valiosos modelos para estudos de aceleração dos danos observados com o incremento da idade. Por outro lado, a presença de múltiplos fatores que potencialmente influenciam a progressão de doença renal em humanos torna difícil a determinação dos mecanismos pelos quais a hipercolesterolemia exerce seu papel neste distúrbio. Desta maneira, o modelo murino cujo gene codificante da apolipoproteína E foi inativado torna-se poderosa ferramenta para o estudo dos efeitos dissociados das dislipidemias na perda progressiva de função renal.

O incremento na uremia é um marcador de insuficiência renal, por demonstrar a incapacidade dos rins em excretar uréia, que se acumula no plasma (Gagnon and Gallimore, 1988).

O fato de os animais ApoE de todas as idades apresentarem aumento da concentração plasmática de uréia em relação aos respectivos controles de mesma idade corrobora com a teoria de que a hipercolesterolemia causa prejuízo de função renal nestes animais. Os valores obtidos neste trabalho estão de acordo com o que é demonstrado pela literatura, sem alteração temporal (Massy et al., 2005).

É desconcertante o achado de que nos animais C57, apesar de se observar uma redução temporal da função renal, não houve aumento de uremia. Uma hipótese para explicar tal situação é o fato de ocorrer uma redução na expressão de transportadores de uréia nos rins, com o incremento da idade (Bagnasco, 2005). Desta forma, há redução na reabsorção e o conteúdo filtrado de uréia é excretado na urina. Como os animais ApoE já apresentam

uremia elevada desde jovens, a redução na reabsorção não se reflete em redução da uremia.

Por outro lado, somente os animais hipercolesterolêmicos de 8 meses apresentaram presença de albumina na urina, indicando severa lesão glomerular. A dislipidemia parece contribuir substancialmente para a progressão da lesão, uma vez que a desordem do perfil lipídico plasmático contribui para a glomerulosclerose em ratas albuminurêmicas (Baylis e Corman, 1998). Aparentemente, no modelo murino C57 a progressão do prejuízo renal é lenta o suficiente para que aos 8 meses os animais ainda não apresentem lesão glomerular severa com conseqüente albuminúria.

O número de glomérulos não foi afetado temporalmente nos animais da linhagem C57 nas idades estudadas e tampouco nos camundongos hipercolesterolêmicos da linhagem ApoE. Deste modo, não se estabeleceu a hipertrofia que costuma acompanhar a redução no número de glomérulos e por isso também não foram observadas alterações na área do tufo capilar glomerular nos grupos estudados. Em acordo com estas observações, estudos demonstram que o número de néfrons não necessariamente reduz-se com o incremento da idade em roedores e que tal achado depende grandemente da linhagem e gênero dos animais estudados (Baylis e Corman, 1998).

Neste aspecto, os animais ApoE diferem dos animais *knockout* para o receptor de bradicinina B₂, os quais apresentam redução da área do tufo glomerular aos 2 meses de idade, provavelmente devido à ausência de produção de óxido nítrico a partir da bradicinina para se opor aos efeitos de vasoconstritores endógenos, como a angiotensina II (Schanstra et al., 2003).

Yabuki e colaboradores (2003) relatam que as alterações morfológicas temporais observadas em rins de camundongos podem ser influenciadas pela microbiota do meio onde os animais são criados. Por isso, avaliam as modificações decorrentes do envelhecimento em animais C57BL/6 livres de patógenos específicos (*specific pathogen free*, SPF). A ausência de alterações no diâmetro dos corpúsculos renais está de acordo com o que observamos em

nosso estudo, apesar da utilização de animais que não são SPF, indicando que as condições de nosso biotério encontram-se adequadas para a criação e manuseio dos animais.

A proliferação anormal de células mesangiais é um achado comum em diversas desordens que podem levar à doença renal crônica. Esse processo leva ao aumento da deposição de matriz extracelular e à glomerulosclerose, resultando em redução da filtração devido ao comprometimento dos néfrons funcionantes (Cove-Smith e Hendry, 2008).

Conforme observado pelo incremento da coloração com ácido periódico de Schiff nos animais controle, o processo de envelhecimento leva à expansão mesangial. Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com o que foi observado por Jiang e colaboradores (2005) em um estudo utilizando camundongos C57 com 3, 6, 12, 19 e 23 meses. Observou-se aumento da coloração com PAS nos glomérulos dos animais à medida que envelhecem, sobretudo a partir dos 12 meses. Tal expansão mesangial está associada com aumento na deposição de colágeno tipo IV no córtex renal e severa lesão renal aos 23 meses, demonstrada pelo aumento significativo da relação albumina/creatinina urinária (Jiang et al., 2005).

As alterações temporais no mesangio dos animais C57 independem da presença de patógenos específicos no ambiente onde os animais são criados, visto que camundongos SPF C57 também apresentam aumento temporal gradual de lesão glomerular até os 12 meses, a partir dos quais esse aumento torna-se mais marcante (Yabuki et al., 2003).

Baylis e Corman (1998) em revisão sobre envelhecimento renal afirmam que a matriz mesangial expande-se significativamente ao longo da vida, em ratos. A presença de hormônios sexuais masculinos, por si só, já pode ser considerada como um fator agravante ao desenvolvimento de comprometimento renal, uma vez que as doenças renais costumam acometer primeiro e de maneira mais agressiva machos que fêmeas. O papel protetor dos estrógenos é atribuído a seus efeitos diretos anti-proliferativos e inibidores do acúmulo de matriz

extracelular mesangial, que são eventos típicos de injúria glomerular, como descrito adiante (Berg, 2006).

Apesar da presença de hormônios sexuais femininos ser notoriamente documentada como um fator de proteção para o sistema cardiovascular, aparentemente nos rins a participação dos estrógenos é pequena, pois fêmeas castradas tendem a permanecer protegidas de danos renais temporais. Os hormônios sexuais masculinos, por outro lado, mostram-se altamente prejudiciais à fisiologia renal na medida em que machos castrados desenvolvem marcante proteção ao dano temporal (Baylis, 2005). Pode-se supor então que, para a fisiologia renal, o papel deletério dos andrógenos sobreponha-se à proteção oferecida pelos estrógenos.

Algumas espécies mostram-se mais suscetíveis ao estabelecimento de expansão mesangial que outras, como é o caso dos hamsters sírios da linhagem APA. Mesmo nestes animais, a idade constitui-se em um fator que influencia de maneira prejudicial esse parâmetro (Nishida et al., 1996). A análise por microscopia eletrônica das células mesangiais destes animais demonstra desenvolvimento temporal de organelas citoplasmáticas, sobretudo do complexo de Golgi. Isso indica que a produção de matriz extracelular pelas células mesangiais, sobretudo de colágeno tipo IV, progride com o avanço da idade, o que pode se refletir no estabelecimento de quadros de glomerulosclerose.

Diversos mecanismos podem estar envolvidos na injúria renal advinda do processo natural de envelhecimento. O tratamento de camundongos com enalapril (20 mg/L) desde o desmame até os 12 meses de idade previne a expansão mesangial e a expressão de α -actina de músculo liso pelas células mesangiais (Romano et al., 1994). A proliferação de células mesangiais com a aquisição de um fenótipo comparável ao de músculo liso pela expressão de α -actina pode ser considerada como um marcador de injúria glomerular. A satisfatória prevenção dessa injúria promovida pelo tratamento com enalapril revela que o sistema renina-angiotensina tem importante papel nas alterações temporais da morfologia renal, mesmo em animais normotensos.

Interessantemente, os animais ApoE além de desenvolverem expansão mesangial influenciada pelo incremento da idade já descrito para nos animais normocolesterolêmicos, aos 2 meses já demonstram incremento da coloração com PAS quando comparados aos respectivos controles de mesma idade. Esses dados demonstram que a hipercolesterolemia genética, mesmo na ausência de placas ateroscleróticas estabelecidas, influencia de maneira nociva a homeostasia renal.

Wen e colaboradores (2002) demonstraram a ocorrência de lesão renal em animais ApoE aos 6 e aos 9 meses de idade. Embora não tenham sido realizadas avaliações funcionais, os animais apresentam marcante expansão mesangial, com proliferação celular de macrófagos e formação de células espumosas. A idade é um fator crucial no desenvolvimento de lesões, visto que há marcante progressão temporal da severidade das alterações morfológicas. Além disso, observa-se acúmulo de matriz formada por laminina e colágeno tipo IV. Esses componentes da matriz extracelular normalmente são produzidos no mesângio e tendem a acumular-se em caso de injúria, servindo como marcadores de lesão renal. Neste estudo, também foram observados trombos lipídicos no lúmen dos capilares glomerulares por microscopia eletrônica (Wen et al., 2002). Provavelmente tratam-se de diminutas placas ateroscleróticas obstruindo o lúmen vascular glomerular, cuja progressão já está bem descrita em grandes vasos (Libby, 2002; Sanz e Fayad, 2008) e que normalmente encontra-se associada à disfunção endotelial, visto que nas idades utilizadas os animais já apresentam placas plenamente estabelecidas. Isso reitera a importância do nosso trabalho ao demonstrar o prejuízo renal precoce observado nos animais dislipidêmicos, ocasionado pela hipercolesterolemia mesmo na ausência de lesões ateromatosas.

A expansão mesangial está associada à redução da filtração glomerular na medida em que as células mesangiais apresentam resposta contrátil frente à ação de moléculas vasoconstritoras (Cove-Smith e Hendry, 2008). Considerando-se a predominância de agentes vasoconstritores tanto devido ao incremento da idade (Schmieder et al., 1994; Fliser et al., 1997) quanto à

presença de hipercolesterolemia (Sigmon e Beierwaltes, 1993; Barton et al. 2001; Napoli e Ignarro, 2001), pode-se inferir que a expansão mesangial está diretamente associada ao prejuízo funcional renal nos animais estudados.

Por outro lado, a expansão mesangial também contribui para a expansão da matriz extracelular, que afeta a taxa de filtração na medida em que promove redução da permeabilidade glomerular (Cove-Smith e Hendry, 2008).

Ao que tudo indica, a formação glomerular de células espumosas não se restringe às células mesangiais já presentes na região. A hipercolesterolemia promove a migração de monócitos nos capilares glomerulares, do mesmo modo que nos grandes vasos. Após a diapedese, os monócitos transformam-se em macrófagos e a fagocitose de grandes quantidades de lipídios, incluindo LDL oxidado transforma-os em células espumosas. De fato, já foi demonstrado que o tratamento de culturas de células endoteliais glomerulares com LDL oxidado estimula a expressão de molécula de adesão intracelular tipo 1 (ICAM-1), a principal molécula de adesão envolvida no processo de adesão de monócitos. A adesão destas células ao endotélio é o primeiro passo no processo de diapedese e a expressão de moléculas de adesão indica injúria e disfunção endotelial, que levam à ativação de processos inflamatórios. Além disso, a capacidade das lipoproteínas aterogênicas ativarem as células mesangiais a produzirem peptídeos quimioatrativos para monócitos incrementa a relação entre os monócitos e as células endoteliais, favorecendo a migração e conseqüentemente o processo de expansão mesangial. De maneira intrigante, aparentemente as moléculas de LDL não oxidadas não apresentam a mesma eficiência no desencadeamento do processo inflamatório e de incremento da região do mesângio (Kamanna et al., 1999). Desta forma, o incremento do estresse oxidativo advindo do processo de envelhecimento, segundo a teoria mitocondrial, desempenha papel crucial na lesão renal induzida pela hiperlipidemia.

Corroborando com essa teoria, estudos em porcos tratados com dieta hipocolesterolêmica demonstram disfunção endotelial e redução da vasodilatação dependente do endotélio em artérias renais. Esse quadro foi

revertido quando os animais foram tratados cronicamente com uma mistura de vitaminas C e E, perfazendo um tratamento antioxidante (Stulak et al., 2001). Além disso, a hiperresponsividade compensatória observada nos vasos de animais hipercolesterolêmicos desprovidos de endotélio e tratados com doador de NO foi abolida com o tratamento antioxidante, revelando a potencial preservação da biodisponibilidade do vasodilatador NO nestes animais.

Conforme já discutido, o estresse oxidativo promove redução do óxido nítrico disponível devido à reação com radicais livres e espécies reativas de oxigênio. Ainda, o tratamento com vitaminas preserva a expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a qual estava diminuída na presença de hipercolesterolemia. Mais uma vez, somente LDL oxidado está envolvido na regulação da atividade da eNOS, reiterando a participação do estresse oxidativo na injúria renal, desta vez através da promoção de disfunção endotelial (Stulak et al., 2001).

Pode-se inferir, assim, que a prática clínica deve dedicar-se não somente ao controle das dislipidemias, mas também ao manejo do balanço oxidativo nos indivíduos jovens, sobretudo àqueles que apresentem potenciais fatores de risco ao desenvolvimento de lesão renal, visando garantir a funcionalidade do órgão durante a vida adulta.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra a perda temporal de função renal em camundongos normocolesterolêmicos aos 2, 4 e 8 meses de idade. Tal prejuízo está associado ao processo de expansão mesangial, ainda que não tenham sido observadas alterações significativas no número de glomérulos ou na área do capilar glomerular. Surpreendentemente, aos 2 meses de idade, os camundongos hipercolesterolêmicos da linhagem ApoE *knockout* já apresentam comprometimento funcional renal quando comparados aos respectivos controles. Tal situação tende a agravar-se com o curso temporal, culminando com severa lesão glomerular aos 8 meses. Os potenciais mecanismos envolvidos incluem o aumento do estresse oxidativo promovido pelo processo de envelhecimento e pela hipercolesterolemia, que resultam em redução da biodisponibilidade de moléculas vasodilatadores e excesso de agentes vasoconstritores, que podem atuar sobre as células mesangiais, agravando o quadro.

Transpondo estes resultados para a prática clínica, este estudo enfatiza a necessidade de se tratar pacientes dislipidêmicos em sua fase precoce, visando não apenas a redução do risco de eventos cardiovasculares, mas também a prevenção de desenvolvimento de doença renal crônica. A terapia aplicada a tais pacientes deve vislumbrar, além da redução dos níveis lipídicos, o controle do balanço oxidativo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aires, M. M. et al. Fisiologia. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1232.

Amelina, H.; Cristobal, S. Proteomic study on gender differences in aging kidney of mice. *Proteome Science*. 2009; 7: 16-28.

Ang, L. S.; Cruz, R. P.; Hendel, A.; Granville, D. J. Apolipoprotein E, an important player in longevity and age-related diseases. *Experimental Gerontology*. 2008; doi:10.1016/j.exger.2008.03.010.

Bagnasco, S. M. Role and regulation of urea transporters. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*. 2005; 450: 217–226.

Barja, G. Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. *Ageing Research Reviews*. 2002; 1: 397–411.

Barton, C. H.; Ni, Z.; Vaziri, N. D. Effect of severe aortic banding above the renal arteries on nitric oxide synthase isotype expression. *Kidney International*. 2001; 59: 654–661.

Baylis, C.; Corman, B. The Aging Kidney: Insights from Experimental Studies. *Journal of the American Society Nephrology*. 1998; 9(4): 699-709.

Baylis, C. Changes in renal hemodynamics and structure in the aging kidney; sexual dimorphism and the nitric oxide system. *Experimental Gerontology*. 2005; 40: 271–278.

Berg, U. B. Differences in decline in GFR with age between males and females. Reference data on clearances of inulin and PAH in potential kidney donors. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2006; 21: 2577–2582.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. [Analytical Biochemistry](#). 1976; [72\(2\)](#): 248-254.

Brenner, B. M. *The Kidney*. 8^a ed, Vol. 1. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008.

Bruneval, P.; Bariéty, J.; Bélair, M.F.; Mandet, C.; Heudes, D.; Nicoletti, A. Mesangial expansion associated with glomerular endothelial cell activation and macrophage recruitment is developing in hyperlipidaemic apoE null mice. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2002; 17: 2099–2107.

Buzello, M.; Haas, C. S.; Hauptmann, F.; Gross, M. L.; Faulhaber, J.; Schultze-Mosgau, S.; Ehmke, H.; Ritz, E.; Amann, K. No aggravation of renal injury in apolipoprotein E knockout mice (ApoE^{-/-}) after subtotal nephrectomy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2004; 19: 566–573.

Casadevall, G.; Piera, C.; Setoainb, J.; Queralt, J. Age-dependent enzymuria, proteinuria and changes in renal blood flow and glomerular filtration rate in rats. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1995; 82: 51-60.

Chade, A. R.; Rodriguez-Porcel, M.; Grande, J. P.; Krier, J. D.; Lerman, A.; Romero, J. C.; Napoli, C.; Lerman, L. O. Distinct Renal Injury in Early Atherosclerosis and Renovascular Disease. *Circulation*. 2002; 106: 1165-1171.

Choksi, K. B.; Nuss, J. E.; Boylston, W. H.; Rabek, J. P.; Papaconstantinou, J. Age-related increases in oxidatively damaged proteins of mouse kidney mitochondrial electron transport chain complexes. *Free Radical Biology & Medicine*. 2007; 43: 1423–1438.

Cove-Smith, A.; Hendry, B. M. The Regulation of Mesangial Cell Proliferation. *Nephron Experimental Nephrology*. 2008; 108: e74–e79.

Csiszar, A.; Toth, J.; Peti-Peterdi, J.; Ungvari, Z. The aging kidney: role of endothelial oxidative stress and inflammation. *Acta Physiologica Hungarica*. 2007; 94:107-115.

Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS). Disponível em: <<http://w3.datasus.gov.br/datasus/index.php>>. Acesso em: 02 jun. 2009.

Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E. E.; Linskens, M.; Rubeljii, I.; Pereira-Smith, O.; Peacocke, M.; Campisi, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995; 92: 9363-9367.

Dmitrieva, N. I.; Burg, M. B. High NaCl Promotes Cellular Senescence. Cell Cycle. 2007; 6 (24): 3108-3113.

Fliser, D.; Franek, E.; Joest, M.; Block, S.; Mutschler, E.; Ritz, E. Renal function in the elderly: impact of hypertension and cardiac function. Kidney International. 1997; 51(4): 1196-1204.

Gagnon, R. F.; Gallimore, B. Characterization of a Mouse Model of Chronic Uremia. Urological Research. 1988; 16: 119-126.

Gendron, M. E.; Thorin-Trescases, N.; Villeneuve, L.; Thorin, E. Aging associated with mild dyslipidemia reveals that COX-2 preserves dilation despite endothelial dysfunction. American Journal Physiology Heart Circulation Physiology. 2007; 292: 451–458.

Guyton, A. C.; Hall, J. E. Textbook of Medical Physiology. 11^a ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006. 1150.

Gwinner, W.; Landmesser, U.; Brandes, R. P.; Kubat, B.; Plasger, J.; Eberhard, O.; Koch, K. M.; Olbricht, C. J. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Puromycin Aminonucleoside Glomerulopathy. *Journal American Society Nephrology*. 1997; 8: 1722-1731.

Hartley, C. J.; Reddy, A. K.; Madala, S.; Martin-McNulty, B.; Vergona, R.; Sullinvan, M. E.; Halks-Miller, M.; Taffet, G. E.; Michael, L. H.; Entman, M. L.; Wang, Y. X. Hemodynamic changes in apolipoprotein E-knockout mice. *American Journal Physiology. Heart and Circulation Physiology*. 2000; 279: 2326–2334.

Ishibashi, S.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L.; Gerard, R. D.; Hammer, R. E.; Herz, J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *The Journal of Clinical Investigation*. 1993; 92(2): 883-893.

Ivanovski, O.; Nikolov, I. G.; Drueke, B. T.; Massy, A. Z. Atherosclerosis and vascular calcification in uraemia - a new experimental model. *Macedonian Academy of Sciences and Arts, Section of Biological and Medical Sciences*. 2007; 28(2): 11-24.

Jawien, J.; Nastalek, P.; Korbut, R. Mouse Models of Experimental Atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2004; 55(3): 503-517.

Jiang, T.; Liebman, S. E.; Lucia, M. S.; Li, J.; Levi, M. Role of altered renal lipid metabolism and the sterol regulatory element binding proteins in the pathogenesis of age-related renal disease. *Kidney International*. 2005; 68: 2608–2620.

Junqueira, L. C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Kamanna, V. S.; Pai, R.; Ha, H.; Kirschenbaum, M. A.; Roh, D. D. Oxidized low-density lipoprotein stimulates monocyte adhesion to glomerular endothelial cells. *Kidney International*. 1999; 55: 2192-2202.

Kellogg Community College Academic Web Server. Disponível em <<http://academic.kellogg.cc.mi.us/>>. Acesso em: 28 ago. 2009.

Kmiec, Z. Central Regulation of Food Intake in Ageing. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2006; 57(6): 7-16.

Lambert, G.; Sakai, N.; Vaisman, B. L.; Neufeld, E. B.; Marteyn, B.; Chan, C. C.; Paigen, B.; Lupia, E.; Thomas, A.; Striker, L. J.; Blanchette-Mackie, J.; Csako, G.; Brady, J. N.; Costello, R.; Striker, G. E.; Remaley, A. T.; Brewer, H. B. Jr; Santamarina-Fojo, S. Analysis of glomerulosclerosis and atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase-deficient mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(18): 15090-15098.

Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420: 868-874.

Mahley, R. W.; Huang, Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Current Opinion in Lipidology*. 1999; 10: 207-217.

Martin, J. E.; Sheaff, M. T. The pathology of ageing: concepts and mechanisms. *Journal of Pathology*. 2007(a); 211: 111–113.

Martin, J. E.; Sheaff, M. T. Renal Ageing. *Journal of Pathology*. 2007(b); 211: 198-205.

Massy, Z. A.; Ivanovski, O.; Nguyen-Khoa, T.; Angulo, J.; Szumilak, D.; Mothu, N.; Phan, O.; Daudon, M.; Lacour, B.; Drüeke, T. B.; Muntzel, M. S. [Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout mice](#). *Journal of the American Society Nephrology*. 2005; 16(1): 109-116.

McCarthy, K. J.; Routh, R. E.; Shaw, W.; Walsh, K.; Welbourne, T. C.; Johnson, J. H. Troglitazone halts diabetic glomerulosclerosis by blockade of mesangial expansion. *Kidney International*, 2000; 58: 2341–2350.

Meir, K. S.; Leitersdorf, E. Atherosclerosis in the Apolipoprotein E–Deficient Mouse: A Decade of Progress. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2004; 24: 1006-1014.

Muntner, P.; Coresh, J.; Smith, C.; Eckfeldt, J.; Klag, M. J. Plasma lipids and risk of developing renal dysfunction: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Kidney International*. 2000; 58: 293–301.

Napoli, C.; Ignarro, L. J. Nitric Oxide and Atherosclerosis. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 2001; 5(2): 88–97.

Nishida, E.; Yamanouchi, J.; Ogata, S.; Itagaki, S.; Doi, K. Age-Related Histochemical and Ultrastructural Changes in Renal Glomerular Mesangium of APA Hamsters. *Experimental Animals*. 1996; 45(4): 339-45.

Ohara, Y.; Peterson, T. E.; Harrison, D. G. Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production. *The Journal of Clinical Investigation*. 1993; 91: 2546-2551.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 02 jun. 2009.

Pereira J. C.; Barreto, S. M.; Passos, V. M. A. The Profile of Cardiovascular Health of Elderly Brazilian People Needs to Improve: a Population-Based Study. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2008; 91(1): 1-10.

Pereira, T. M. C. Angiotensina II Intra-Renal Modula a Expressão da Óxido Nítrico Sintase Neuronal na Hipertensão Renovascular 2R1C. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo. 2005.

Pereira, T. M. C.; Balarini, C. M.; Silva, I. V.; Cabral, A. M.; Vasquez, E. C.; Meyrelles, S. S. Endogenous angiotensin II modulates nNOS expression in renovascular hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2009; 42: 685-691.

Piecha, G.; Koleganova, N.; Gross, M. L.; Geldyyev, A.; Ritz E. Oxidative stress after uninephrectomy alters heart morphology in the apolipoprotein E^{-/-} mouse. *Journal of Hypertension*. 2008; 26: 2220–2229.

Piedrahita, J. A.; Zhang, S.H.; Hagan, J.R.; Oliver, P. M.; Maeda, N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene mediated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89: 4471–4475.

Plump, A. S.; Smith, J. D.; Hayek, T.; Aalto-Setälä, K.; Walsh, A.; Verstuyf, J. G.; Rubin, E. M.; Breslow, J. L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992; 71: 343–353.

Presnell, J. K.; Schreibman, M. P.; Humason, G. L. Humason's Animal Tissue Techniques. 5^a ed. Maryland, EUA: The Johns Hopkins University Press, 1997. 600.

Qi, Z.; Whitt, I.; Mehta, A.; Jin, J.; Zhao, M.; Harris, R. C.; Fogo, A. B.; Breyer, M. D. Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *American Journal Physiology. Renal Physiology*. 2004; 286: 590–596.

Reckelhoff, J. F.; Kanji, V.; Racusen, L. C.; Schmidt, A. M.; Yan, S. D.; Morrow, J.; Roberts II, L. J.; Salahudeen, A. K. Vitamin E ameliorates enhanced renal lipid peroxidation and accumulation of F2-isoprostanes in aging kidneys. *American Journal Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1998; 274: 767-774.

Ren, Y.; Garvin, J. L.; Ito, S.; Carretero, O. A. Role of neuronal nitric oxide synthase in the macula densa. *Kidney International*, 2001; 60: 1676–1683.

Romano, L. A.; Ferder, L.; Inserra, F.; Ercole, L.; Gomez, R. A. Intraglomerular expression of alpha-smooth muscle actin in aging mice. *Hypertension* 1994; 23: 889-893.

Ross, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*. 1999; **340(2)**: 115–126.

Roy, H.; Bhardwaj, S.; Yla-Herttuala, S. Molecular genetics of atherosclerosis. *Human Genetics*. 2009; 125: 467–491.

Samuelsson, O.; Mulec, H.; Knight-Gibson, C.; Attman, P. O.; Kron, B.; Larsson, R.; Weiss, L.; Wedel, H.; Alaupovic, P. Lipoprotein abnormalities are associated with increased rate of progression of human chronic renal insufficiency. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1997; 12: 1908–1915.

Sanz, J.; Fayad, Z. A. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease *Nature*. 2008; 451: 963-957.

Schanstra, J. P.; Duchene, J.; Praddaude, F.; Bruneval, P.; Tack, I.; Chevalier, J.; Girolami, J. P.; Bascands, J. L. Regulation of Cardiovascular Signaling by Kinins and Products of Similar Converting Enzyme Systems. Decreased renal NO excretion and reduced glomerular tuft area in mice lacking the bradykinin B2 receptor. *American Journal Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2003; 284: 1904–1908.

Scheuer, H.; Gwinner, W.; Hohbach, J.; Gröne, E. F.; Brander, R. P.; Malle, E.; Olbricht, C. J.; Walli, A. K.; Gröne, H. J. Oxidant stress in hyperlipidemia-induced renal damage. *American Journal Physiology. Renal Physiology*. 2000; 278: 63–74.

Schmieder, R. E.; Schachinger, H.; Messerli, F. H. Accelerated decline in renal perfusion with aging in essential hypertension. *Hypertension*. 1994; 23: 351-357.

Shay, J. W.; Wright, W. E. Hallmarks of telomeres in ageing research. *Journal of Pathology*. 2007; 211: 114–123.

Sigmon, D. H.; Beierwaltes, W. H. Renal nitric oxide and angiotensin II interaction in renovascular hypertension. *Hypertension*. 1993; 22: 237-242.

Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN); Associação Brasileira de Enfermagem em Nefrologia (SOBEN); Associação Brasileira dos Centros de Diálise e Transplante (ABCDT); Associações de Pacientes Renais Crônicos. Perfil da Doença Renal Crônica. O Desafio Brasileiro. 2007. Disponível em: <<http://www.sbn.com.br>>. Acesso em: 02 jun. de 2009.

Stulak, J. M.; Lerman, A.; Porcel, M. R.; Caccitolo, J. A.; Romero, J. C.; Schaff, H. V.; Napoli, C.; Lerman, L. O. Renal vascular function in hypercholesterolemia is preserved by chronic antioxidant supplementation. *Journal of the American Society Nephrology*. 2001; 12: 1882–1891.

Takaki, A.; Jimi, S.; Segawa, M.; Iwasaki, H. Cadmium-Induced Nephropathy in Rats Is Mediated by Expression of Senescence-Associated Beta-Galactosidase and Accumulation of Mitochondrial DNA Deletion. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004; 1011: 332–338.

Upmacis, R. K.; Crabtree, M. J.; Deeb, R. S.; Shen, H.; Lane, P. B.; Benguigui, L. E. S.; Maeda, N.; Hajjar, D. P.; Gross, S. S. Profound biopterin oxidation and protein tyrosine nitration in tissues of ApoE-null mice on an atherogenic diet: contribution of inducible nitric oxide synthase. *American Journal Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2007; 293: 2878–2887.

Vázquez-Pérez, S.; Aragoncillo P.; De Las Heras, N.; Navarro-Cid, J.; Cediél, E.; Sanz-Rosa, D.; Ruilope, L. M.; Díaz, C.; Hernández, G.; Lahera, V.; Cachofeiro, V. Atorvastatin prevents glomerulosclerosis and renal endothelial dysfunction in hypercholesterolaemic rabbits. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2001; 16(1): 40-44.

Villeneuve, N.; Fortuno, A.; Sauvage, M.; Fournier, N.; Breugnot, C.; Jacquemin C.; Petit, C.; Gosgnach, W.; Carpentier, N.; Vanhoutte, P.; Vilaine, J. P. Persistence of the Nitric Oxide Pathway in the Aorta of Hypercholesterolemic Apolipoprotein-E-Deficient Mice. *Journal of Vascular Research*. 2003; 40: 87–96.

Wen, M.; Segerer, S.; Dantas, M.; Brown, P. A.; Hudkins, K. L.; Goodpaster, T.; Kirk, E.; LeBoeuf, R. C.; Alpers, C. E. Renal Injury in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Laboratory Investigation*. 2002; 82: 999–1006.

Wever, R. M. F.; Lüscher, T. F.; Cosentino, F.; Rabelink, T. J. Atherosclerosis and the Two Faces of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation*. 1998; 97: 108-112.

Yabuki, A.; Matsumoto, M.; Nishinakagawa, H.; Suzuki, S. Age-related Morphological Changes in Kidneys of C57BL/6Cr Mice Maintained Under Controlled Situations. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2003; 65(8): 845-851.