

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

VINICIUS CORREA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO FATOR ESTIMULADOR DE
COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS NA
ISQUEMIA/REPERFUSÃO RENAL**

VITÓRIA
2014

VINICIUS CORREA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO FATOR ESTIMULADOR DE
COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS NA
ISQUEMIA/REPERFUSÃO RENAL**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia do Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Federal
do Espírito Santo, como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Breno Valentim
Nogueira

VITÓRIA

2014

VINICIUS CORREA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO FATOR ESTIMULADOR DE
COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS NA
ISQUEMIA/REPERFUSÃO RENAL**

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

Apresentada em 25 de abril de 2014

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
Instituição: Universidade Federal
do Triângulo Mineiro- UFTM

Profa. Dra. Agata Lages Gava
Instituição: Universidade Federal
do Espírito Santo-UFES

Prof. Dr. Marco Cesar Guimaraes
Instituição: Universidade Federal
do Espírito Santo-UFES

Orientador
Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
Instituição: Universidade Federal
do Espírito Santo-UFES

VITÓRIA

2014

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus pela saúde e sabedoria durante essa caminhada.

Deixo um agradecimento ao programa de pós-graduação em Biotecnologia pela oportunidade de ingresso e realização do mestrado.

Agradeço também ao professor Dr. Breno Valentim Nogueira pela oportunidade de realizar esse trabalho e por toda a orientação concedida no Laboratório de Ultraestrutura Celular prof. Carlos Alberto Redins (LUCCAR). Agradeço ao prof. Marco pela colaboração e participação em minha banca. Agradeço aos colegas do LUCCAR, em especial à Isabela Binotti (*Grazie ragazza di mio core!*), à Rosi Ervati e demais colegas de trabalho (Wanderson, Janine, Jairo, Brenna, Brunelli, Bárbara, Lohayne, etc.) que tornaram a caminhada do mestrado mais prazerosa e produtiva.

Agradeço aos laboratórios de Fisiopatologia Cardiovascular (em especial à Rebeca Machado e Ludimila Forechi pelas idéias e pela utilização dos recursos) e de Transgenes e Cultura de Células (LTCC), em especial à Flávia Freitas (pelo treinamento de procedimentos cirúrgicos) e à Marcella Porto pela ajuda com as análises bioquímicas do departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde (CCS-UFES) pelas contribuições com material e pessoal para a realização desse trabalho.

Deixo um agradecimento também aos funcionários do Biotério Central (CCS-UFES) por toda ajuda durante o manejo dos animais do experimento, sempre zelando pela ética e respeito aos animais. Agradeço a Fundação de Amparo à pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pela bolsa de estudos.

Finalmente, mas não menos importantes, agradeço aos meus pais por acreditarem em mim desde o começo desta jornada!

RESUMO

A isquemia/reperfusão (IR) renal, pela oclusão temporária da artéria renal, provoca lesões similares aos casos de falência renal aguda encontrados na prática clínica. Diversas estratégias terapêuticas têm sido estudadas para minimizar as consequências dos danos provocados pela IR. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) em modelo animal de isquemia e reperfusão renal após o evento isquêmico. No presente estudo foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 150-250 g. Realizou-se uma curva dose-resposta para estabelecer uma dose segura de G-CSF sem prejuízo da função renal nas concentrações de 10, 50, 100 e 250 µg/kg/dia por 5 dias. Para o estudo de IR os animais foram distribuídos nos grupos: SHAM (n=10) (controle, sem clampeamento, com nefrectomia unilateral) que receberam solução glicosada 5% (veículo), IR (n=9) (IR sem tratamento, nefrectomia unilateral) e IR-GCSF (n=9) (IR associado com G-CSF 100 µg/kg por 3 dias). A isquemia foi obtida pelo clampeamento da artéria renal por 40 minutos, seguida de reperfusão. Os animais foram alocados em gaiolas metabólica para análise dos parâmetros de função renal e posteriormente sacrificados com sobredose de anestésico para coleta de sangue e órgãos de interesse. Os resultados obtidos foram normalizados e foi utilizada ANOVA-1 seguido do *post hoc* de Tukey, os valores estão apresentados como média ± EPM e considerados significantes quando $p < 0,05$. Ao final do tratamento o total de leucócitos dos animais foi de 10370 células/dL (SHAM), 11775 células/dL (IR) e 28800 células/dL (IR-GSCF) ($p > 0,05$; Grupos SHAM e IR vs IR-GCSF). Os valores de creatinina plasmática foram de $0,34 \pm 0,02$; $0,43 \pm 0,03$ e $0,33 \pm 0,02$ mg/dL para os animais dos grupos SHAM, IR e IR-GSCF, respectivamente ($p < 0,05$; IR vs IR-GCSF). A área de deposição percentual de colágeno na região medular foi de $17\% \pm 3,41$, $33\% \pm 1,17$ e $20 \pm 1,20\%$ para os grupos SHAM, IR e IR-GSCF respectivamente ($p < 0,01$; IR vs IR-GCSF). Houve ainda menor quantidade de células em apoptose e menor concentração de produtos avançados de oxidação de proteínas nos animais tratados quando comparados aos do grupo IR. Esses resultados demonstram o efeito protetor do G-CSF contra a lesão renal em modelo experimental de IR.

Palavras-chave: Isquemia, reperfusão, função renal, G-CSF, colágeno

ABSTRACT

Ischemia/reperfusion (IR) in kidney obtained by temporary occlusion of the renal artery causes injuries similar to cases of acute renal failure founded in clinical practice. Several therapeutic strategies have been studied to minimize the consequences of the damage caused by IR. The aim of this study was to evaluate the effects of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in an animal model of renal ischemia and reperfusion after the ischemic event. In the present study male Wistar rats weighing between 150-250 g were used. We performed a dose-response curve to establish a safe dose of G-CSF without loss of kidney function at concentrations of 10, 50, 100 and 250 mg/kg/day for 5 days. For the study of IR animals were distributed in three groups: SHAM (n=10) (control, without clamping, with unilateral nephrectomy) who received reperfusion 5% glucose solution (vehicle), IR (n= 9) (IR unilateral nephrectomy) and IR- GCSF (n = 9) (IR injury associated with G-CSF 100 mg/kg for 3 days). Ischemia was achieved by clamping the renal artery for 40 minutes followed by reperfusion. The animals were placed in metabolic cages for analysis of parameters of renal function and subsequently euthanized with an overdose of anesthetic for blood and organs of interest. The results were normalized and the ANOVA-1 followed via a post hoc Tukey was used, the values are presented as mean \pm SEM and considered significant when $p < 0.05$. At the end of the treatment the amount of leukocytes of the animals was 10370 cells/dL (sham), 11775 cells/dL (IR) and 28800 cells/dL (IR- GSCF) ($p < 0.05$, vs. sham IR and IR-GCSF). The plasma creatinine values were 0.34 ± 0.02 , 0.43 ± 0.03 and 0.33 ± 0.02 mg / dL for animals in groups SHAM, IR and IR- GSCF, respectively ($p < 0.05$, vs IR IR-GCSF). The percentage area of collagen deposition in the medullary area was 16.22 ± 3.41 %, $32.99\% \pm 1.17$ and 20.0 ± 1.20 % for the SHAM, IR and IR- GSCF groups respectively ($p < 0.01$, IR vs IR-GCSF). There was even smaller amount of cells undergoing apoptosis and lower concentration of advanced oxidation protein products in treated animals when compared with the IR group. These results demonstrate the protective effect of G-CSF against renal injury in an experimental model of IR.

Keywords: ischemia, reperfusion, renal function, G-CSF, collagen

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Contagem de leucócitos presentes no sangue dos animais comparando os diferentes grupos.....página 30

Gráfico 2: Valores médios de creatinina plasmática dos animais dos grupos relacionados para a curva dose-respostapágina 31

Gráfico 3: Valores médios de creatinina urinária entre dos animais dos grupos relacionados para a curva dose-respostapágina 31

Gráfico 4: Valores médios de depuração de creatinina corrigida entre dos animais dos grupos relacionados para a curva dose-resposta.....página 32

Gráfico 5: Número de leucócitos por mm^3 de sangue durante os dias de estudo.....página 33

Gráfico 6: Valores de creatinina plasmática para os diferentes grupos.....página 34

Gráfico 7: Valores de concentração de uréia urinária nos diferentes grupos.....página 34

Gráfico 8: Valores de proteinúria encontrado para os diferentes grupos.....página 35

Gráfico 9: Valores de volume urinário para os diferentes grupos após 24hpágina 35

Gráfico 10: Representação das concentrações de proteínas oxidadas nos diferentes grupospágina 39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Revisão de literatura	13
1.1.1 Isquemia celular.....	13
1.1.2 Isquemia renal	14
1.1.3 Lesão tubular renal	14
1.2.1 Análise da função renal	16
1.1.4 Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF)	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3. METODOLOGIA.....	21
3.1 Animais	21
3.1.1 Grupos de animais.....	21
3.2 Procedimentos	22
3.2.1 Cirurgia	22
3.2.2 Gaiolas metabólicas.....	23
3.2.3 Sacrifício e coleta de órgãos.....	24
3.3 Dosagens Bioquímicas	24
3.3.1 Clearance de creatinina para avaliação da função renal	24
3.3.2 Dosagem de creatinina plasmática	24
3.3.3 Dosagem de creatinina urinária	25
3.3.4 Coleta de sangue e contagem leucocitária	25
3.4 Histologia	26
3.5 Teste de apoptose (Teste TUNEL)	26

3.6 Determinação de produtos de oxidação protéica avançada (<i>Advanced Oxidation Protein Products - AOPP</i>)	27
3.7 Análise Estatística.....	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Curva Dose-Resposta G-CSF	29
4.1.1 Contagem de leucócitos da curva de dose-resposta ao G-CSF	29
4.1.2 Avaliação bioquímica dos grupos da curva dose-resposta.....	30
4.2 Contagem de Leucócitos entre os grupos SHAM, IR e IR-GSCF.....	32
4.3 Comparação de parâmetros bioquímicos entre os animais SHAM, IR e IR-GSCF	33
4.4 Deposição de colágeno em relação à lesão isquêmica e ação do G-CSF.....	36
4.5 Número de células apoptóticas.....	38
4.6 Teste de Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas (AOPP).....	39
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO.....	49
7. REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

O termo isquemia refere-se à perda de suprimento sanguíneo pela redução do fluxo arterial de um determinado tecido, em que há comprometimento da oferta de oxigênio e de substratos metabólicos, incluindo a glicose (COTRAN et al., 2000). Reperusão é o termo utilizado para definir o reestabelecimento do fluxo sanguíneo após um período de isquemia (EVORA et al., 1996). A isquemia por si só, é bastante lesiva, mas a reperusão do tecido isquêmico pode levar a uma sequência de complicações, que podem aumentar as lesões teciduais e, associado às complicações sistêmicas, colocar em risco a vida do paciente (CALVERT et al., 2003).

Para definir estratégias terapêuticas adequadas e minimizar as consequências dos danos provocados pela isquemia/reperusão (IR) é essencial o entendimento dos mecanismos envolvidos no processo. A reação ao oxigênio, após a reperusão, implica em danos teciduais e inicia uma cascata de respostas celulares deletérias precedendo a inflamação, morte celular e por último, insuficiência do órgão (FONDEVILA et al., 2003). Um dos modelos de isquemia/reperusão (IR) mais estudados é a oclusão temporária da artéria renal (ARAÚJO et al., 2002). Os danos causados pela hipóxia nas células tubulares representam o primeiro evento em casos de insuficiência renal aguda. Além da perda da polaridade celular, há ainda produção de radicais livres, entrada de cálcio e ativação de genes para proteção ou regeneração celular (BREZIS & EPSTEIN, 1993). Inicialmente as lesões por IR exibem lesão isquêmica com perda de células endoteliais, o que compromete o lúmen vascular e a microcirculação, o que afeta a estrutura e o funcionamento de células tubulares epiteliais (YAMAMOTO et al., 2002). Lesões renais agudas são um problema frequente na prática clínica, principalmente para pacientes cirúrgicos e em estado crítico. Provocam aumento significativo da mortalidade, da duração do internamento e dos custos hospitalares (CHERTOW et al., 2005; LIANGOS et al., 2009)

De acordo com Kerr (2003) e Forterre e colaboradores (2004), os exames primários mais apropriados para diagnóstico inicial de uma disfunção renal são uréia e creatinina séricas. Apesar disso, ainda afirmam que a uréia não é um indicador

inteiramente específico de lesão renal, além de efeitos pré-renais também aumentarem valores desse indicador. Entretanto, essas substâncias normalmente não aumentam até que mais de 60% dos néfrons estejam sem função, ou seja, trata-se de um marcador específico, mas de baixa sensibilidade.

Di Bartola (1997) descreveu que a quantificação da proteína na urina é uma avaliação da função glomerular e/ou tubular. Para Fonterre e cols. (2004) e Price e cols. (2005), a detecção de aumento na excreção de proteínas tem valor diagnóstico ou prognóstico na detecção inicial e confirmação de doença renal, e a quantificação da proteinúria pode ter valor considerável na avaliação da eficácia terapêutica e progressão da doença. Levando em consideração a oscilação de volume urinário e da concentração de solutos em uma micção, é sugerido que a avaliação seja feita no volume urinário total de 24 horas (FINCO, 1995).

O G-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos), glicoproteína produzida principalmente por células da linhagem monócitos/macrófago, clinicamente é utilizado em situações de neutropenia, devido à quimioterapia, com intuito de regular a produção de neutrófilos. Também foi demonstrado o efeito protetor do G-CSF sobre a lesão tubular renal de camundongos induzida pela cisplatina. Além disso, estudos demonstram a capacidade protetora e regenerativa do G-CSF em modelos animais de isquemia cardíaca, renal e cerebral (OHTSUKA et al., 2004).

Considerando o que foi exposto anteriormente, o objetivo desse trabalho foi avaliar a função renal, os aspectos histológicos e o efeito antiapoptótico do tratamento com G-CSF em ratos Wistar submetidos à isquemia/reperfusão renal.

1.1 Revisão de literatura

1.1.1 Isquemia celular

O termo isquemia refere-se à redução do suprimento de oxigênio e nutrientes para as células, em geral devido à diminuição ou interrupção no fluxo sanguíneo, como ocorre na obstrução mecânica do sistema arterial. Além da falta de oxigênio, a produção de energia está comprometida pela falta de substrato para a produção de energia, após os substratos glicolíticos locais terem sido exauridos. Uma vez diminuída a tensão de oxigênio intracelular, há uma interrupção na fosforilação oxidativa, depleção de adenosina trifosfato (ATP), falência da bomba de sódio e potássio, resultando em edema celular. Verifica-se também entrada de cálcio intracelular, com seus efeitos deletérios. Há perda progressiva de glicogênio e diminuição de síntese protéica. Caso a isquemia continue, a depleção ATP piora, causando mais deterioração, sucedendo perda do padrão ultraestrutural celular, com formação de bolhas na superfície celular. Uma vez que o suprimento de oxigênio seja reestabelecido, tais alterações são reversíveis. Porém, se a isquemia persistir, a lesão torna-se irreversível, ocorrendo necrose ou morte celular (JEONG et al., 2004).

Ao se reestabelecer o fluxo sanguíneo para os tecidos isquêmicos, pode ocorrer uma lesão adicional, acarretando no aumento da lesão e morte celular. Este processo é conhecido como lesão por isquemia/reperfusão (IR) e tem sua importância clínica porque pode piorar o dano celular, após terapias que reestabelecem o fluxo sanguíneo. Dentre os mecanismos propostos para a explicação da lesão por IR estão a produção de radicais livres de oxigênio, a ação de citocinas intensificando a resposta inflamatória e a ativação do sistema complemento. Radicais livres são moléculas que possuem um elétron livre na camada externa, sendo reativos e extremamente instáveis e, durante a reperfusão, há aumento na geração de radicais livres de oxigênio nas células endoteliais, parenquimatosas e nos leucócitos. Este aumento é resultado do dano mitocondrial, da ação de oxidases nestas células e da redução na concentração de antioxidantes causadas pela hipóxia. O efeito lesivo dos radicais livres se dá pela peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares, pela fragmentação do DNA, com

consequente inativação do material genético, e do óxido nítrico (BEAVO J A., 1995; SHIN, BAE e LEE. 2006; GUPTA, KOVAR e MEIBOHM; 2005).

1.1.2 Isquemia renal

A lesão isquêmica renal é um frequente problema clínico associado com alta mortalidade. A lesão endotelial resulta em edema celular e aumento da expressão de moléculas de adesão celular. Soma-se a esses eventos a ativação leucocitária, levando ao aumento na interação leucócito-endotelial, promovendo mais lesão e edema das células endoteliais, impedindo fisicamente o fluxo sanguíneo, contribuindo para a produção de fatores locais que promovem mais constrição (NEWAS MA, OYEKAN A O; 2001). Ocorre assim um aumento na liberação de solutos para o néfron distal causado pela perda de integridade da junção intracelular, implicando em menor reabsorção de sódio, e a perda de polaridade celular no túbulo proximal, com falência da bomba de sódio e potássio (KUKREJA et al., 2005).

Também ocorrem mudanças nas respostas arteriolas por parte das substâncias vasoativas devido às lesões endoteliais. As arteríolas dos rins pós-isquemia têm um aumento no tônus basal e na reatividade aos agentes vasoconstrictores, e uma resposta vasodilatadora reduzida quando comparada com arteríolas de rins normais. O óxido nítrico (NO) é um vasodilatador que diminui a expressão de endotelinas e sua atividade no endotélio vascular, efeito que pode ser protetor contra a lesão renal isquêmica. Normalmente, o NO gerado pelas células endoteliais tem uma importante função vasodilatadora, mas sua produção pela enzima óxido nítrico sintetase endotelial é inibida na isquemia (MOORAN, JK. 1999).

1.1.3 Lesão tubular renal

Severos distúrbios metabólicos ocorrem devido à depleção de ATP, que ocorre durante a isquemia nas células tubulares e endoteliais. Em princípio, essas

células são protegidas da lesão isquêmica pelas altas concentrações intracelulares de glicina, pela diminuição do pH e pela possibilidade de glicólise como uma alternativa de gerar ATP (MOORAN JK, 1999). Os segmentos tubulares distais são mais glicolíticos que os segmentos mais proximais e, com isso, têm um maior potencial para sobreviver à lesão isquêmica (BREMER et al., 2005). Os nucleotídeos guanosínicos têm efeito pleiotrópico na promoção da sobrevivência tubular. Os efeitos vasodilatadores no fator atrial natriurético e do NO são mediados pelo GMPc. Do ponto de vista bioquímico, há depleção de ATP, acúmulo de cálcio intracelular, ativação de proteases, que causa ruptura do citoesqueleto, ativação de fosfolipases, que lesa a membrana celular, geração de radicais livres e ativação de caspases, que induz a apoptose (ALPERS CE, 2009). Somada a esses eventos há a expressão de citocinas e moléculas de adesão, recrutando leucócitos que participam da reação inflamatória. Com o tempo, as células lesadas desprendem-se das membranas basais e causam obstrução tubular, que associado com o vazamento do fluido para o interstício, resulta em edema intersticial, pressão intratubular elevada e mais lesão (ALPERS CE, 2009).

Estudos em modelos animais de IR permitem que situações clínicas possam ser estudadas em bancada, numa tentativa de, no isolamento de variáveis não abordáveis no humano, identificar mecanismos fisiopatológicos e respostas fisiológicas às manipulações medicamentosas (HEYMAN SN, ROSENBERG C, ROSEN S. 2010).

Grandes estudos epidemiológicos têm sugerido que a ocorrência de lesão renal aguda está aumentando com o passar dos anos (WAIKAR et al., 2006; XUE et al., 2006; BAGSHAW SM, GEORGE C, BELLOMO R., 2007). O envelhecimento da população, uma maior frequência de comorbidades, intervenções diagnósticas e terapêuticas de diferentes tipos, o aumento da prevalência da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e tratamentos relacionados, transplantes mais frequentes de órgãos não-renais, e as intervenções diagnósticas e terapêuticas mais agressivas podem contribuir para este fenômeno (LAMEIRE N, Van BIESEN W, VANHOLDER R., 2006) Outra possível justificativa para esse crescimento é o aumento da prevalência de pacientes com diabetes que estão cada vez mais sendo tratados com inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores dos receptores da

angiotensina e antagonistas da aldosterona , que todos aumentam o risco para lesão renal aguda , especialmente durante episódios de desidratação. (STIRLING et al., 2003; McGUIGAN J, ROBERTSON S, ISLES C. 2005). O modelo de IR renal consiste no clampeamento da artéria renal ou do pedículo renal por um período variado de 15 a 60 minutos com subsequente reperfusão, mimetizando um cenário clínico prático, como por exemplo o de um transplante renal. A aplicabilidade e a viabilidade desse modelo são resultantes da similaridade da resposta inflamatória, congestão medular e lesão tubular apresentada quando comparados com dados obtidos por meio de biópsia renal em pacientes com lesão renal aguda (HEYMAN SN, ROSENBERGER C, ROSEN S. 2010).

1.2.1 Análise da função renal

Os rins têm como uma de suas funções a filtração glomerular. A ultrafiltração passiva do plasma pela membrana glomerular permite ao rim a regulação da quantidade total de sal e água do organismo, bem como equilibrar o total de eletrólitos e eliminar os produtos do metabolismo protéico (SHOSKES, 2007).

Clearance é a quantidade de plasma que é purificado desta substância por unidade de tempo. Para aferir a taxa de filtração glomerular pode-se calcular o *clearance* de algum produto ou substância que encontre no plasma e é filtrado pelo glomérulo. Existem algumas substâncias que podem ser utilizadas para mensurar a taxa de filtração glomerular. Uma dessas substâncias é a inulina, porém a inulina é uma substância exógena que deve ser infundida constantemente durante o período em que o clearance será calculado.

A creatinina plasmática é o marcador mais usado de função renal (SHOSKES, 2007). Embora a creatinina seja produzida em uma taxa constante, há uma variação nessa taxa em cada indivíduo. Fatores como idade, sexo e massa corpórea influenciam na taxa absoluta de creatinina. Dessa forma percebe-se que não há um valor definitivo para normalidade, que deve ser individualizado para cada caso, mas a relação com a filtração glomerular é relativamente constante. Geralmente, com

50% de perda de filtração glomerular, há duplicação do valor de creatinina plasmática.

Outro marcador importante de função renal é a uréia plasmática. A produção de uréia e sua excreção são muito variáveis e fatores como dieta, lesão tecidual e estado de hidratação interferem em seu valor final. Isoladamente a uréia plasmática não é um marcador definitivo de função renal e por isso deve ser analisado em conjunto com outros parâmetros.

A cistatina C plasmática é outro marcador apesar de ainda não ser utilizado de maneira regular. É uma proteína que pode ser encontrada em células nucleadas e que apresenta uma taxa constante de produção, não sofrendo alterações com dieta.

1.1.4 Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF)

As citocinas são moléculas mensageiras solúveis e de curta ação do sistema imunológico. Esse termo inclui as linfocinas, monocinas e vários polipeptídios que regulam as respostas imunológica, inflamatória e reparadora do indivíduo. A maioria das citocinas tem um amplo espectro de efeitos, e algumas são produzidas por vários tipos celulares. Atualmente esse grupo molecular é classificado em cinco categorias: citocinas que medeiam a imunidade natural; citocinas que regulam o crescimento, ativação e diferenciação de linfócitos; citocinas que ativam as células inflamatórias; as citocinas que afetam os movimentos dos leucócitos também chamadas de quimiocinas; e citocinas que estimulam a hematopoiese. Muitas das citocinas que estimulam a hematopoiese são derivadas de linfócitos ou de células estromais que estimulam o crescimento e produção de novas células sanguíneas atuando sobre células tronco hematopoéticas (TAKANO et al., 2006). Existem vários membros dessa família denominados como fatores estimuladores de colônias (CSF), pois foram detectados inicialmente por sua capacidade de promover o crescimento *in vitro* de colônias de células hematopoéticas da medula óssea. Dentre os mais conhecidos membros desse grupo, encontram-se o GM-CSF (fator estimulador de

crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos), G-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos) e ligante c-kit (SCF).

O G-CSF é uma glicoproteína produzida principalmente por células da linhagem monócitos/macrófago, mas pode ser produzida por células de origem mesodérmica, como endotélio, fibroblasto e células mesoteliais (ZHANG et al., 2004). Sua ação é mediada pelo receptor G-CSFR expresso na superfície da membrana em células da linhagem hematopoiética, tais como: monócitos, neutrófilos maduros, algumas linhagens linfóides, progenitor mielóide e mesmo algumas linhagens de células leucêmicas (AVALOS, 1996). Esse receptor também foi encontrado em células de origem não hematopoiética, como as células endoteliais e miócitos cardíacos (LI et al., 2006). O aumento da expressão do G-CSFR foi observado em camundongos tratados com G-CSF, tanto nos animais controles quanto naqueles com lesão renal (LI et al., 2008). A concentração plasmática normal do G-CSF em humanos é de cerca de 40 pg/mL, podendo esta atingir níveis que ultrapassam 2.000 pg/mL em determinadas condições como infecção (KAWAKAMI et al., 1990). Também foram observados aumentos nas concentrações de G-CSF em camundongos submetidos à isquemia/reperfusão renal (ZHANG et al., 2004). De modo que a produção tecidual local pode desempenhar uma possível ação protetora no rim com lesão por isquemia/reperfusão.

O G-CSF é um fármaco liberado pelo FDA e pelo Ministério da Saúde no Brasil, sendo inclusive administrado a milhões de pacientes em todo o mundo, e é bem tolerado pelo organismo humano. Esse fármaco é utilizado em situações de neutropenia, devido à quimioterapia principalmente, com intuito de regular a produção de neutrófilos. Iwasaki et al., demonstraram no ano de 2005 o efeito protetor do G-CSF sobre a lesão tubular renal de camundongos induzida pela cisplatina. O G-CSF vem sendo utilizado para mobilização de células tronco hematopoiética da medula óssea para a circulação periférica em casos de transplantes hematopoiéticos (NISHIDA & HAMAOKA, 2006). Além disso, estudos demonstram a capacidade protetora e regenerativa do G-CSF em modelos animais de isquemia cardíaca, renal e cerebral (OHTSUKA et al., 2004; TAKANO et al., 2006; NISHIDA et al., 2004; TOTH et al., 2008).

Estudos anteriores demonstraram que há diferenciação de células-tronco hematopoiéticas em células epiteliais tubulares renais após lesão renal, o que sugere a possibilidade de que o reforço de mais células-tronco hematopoiéticas (CTH) para a circulação periférica realizado pelo G-CSF pode acelerar a regeneração tubular (LIN et al., 2003). No entanto, essa possibilidade é ainda controversa, uma vez que estudos recentes não demonstraram diferenciação de células-tronco hematopoiéticas em células epiteliais tubulares renais (CETR) durante a reparação dos rins pós isquemia (DUFFIELD et al., 2005; DEKEL et al., 2005). Em modelos experimentais de ratos na condição de falência renal aguda, Iwasaki e colaboradores em 2005, além de Fang e colaboradores também em 2005 demonstraram que o tratamento com G-CSF aumentou significativamente o número de CETR derivadas da medula óssea e sugeriu que CTHs potencializadas pelo G-CSF teriam uma maior contribuição na regeneração de túbulos renais lesados (IWASAKI et al., 2005; FANG et al., 2005). Desse modo entende-se que o efeito do G-CSF reforçando CTHs pode, eventualmente, melhorar a regeneração tubular. Em alguns casos o efeito benéfico do G-CSF para lesão renal não parece ser dependente apenas do aumento no número de CETR originárias da medula óssea e também por outros mecanismos ainda não totalmente elucidados.

O G-CSF poderia atuar no reparo das lesões do tecido renal provocados pela isquemia/reperfusão pela mobilização de células-tronco da medula óssea, aumentando o número de células-tronco hematopoiéticas no local da lesão e consequente diferenciação em células tubulares renais e/ou pela mobilização de células T e assim melhorando a resposta anti-inflamatória do evento isquêmico e seus efeitos consequentes (NISHIDA, HAMAOKA; 2006). Nesse sentido foi proposto para esse estudo a avaliação dos efeitos do G-CSF e sua capacidade de diminuir os danos provocados pela isquemia/reperfusão renal, principalmente no que diz respeito aos parâmetros bioquímicos (como creatinina e uréia), em relação à formação de espécies reativas de oxigênio e também na diminuição de células em estado apoptótico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da administração do G-CSF em modelo animal de isquemia e reperfusão renal.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a função renal através da quantificação dos níveis plasmáticos e urinários de creatinina, uréia, proteinúria e volume urinário nos ratos IR e tratados com G-CSF;
- 2- Avaliar a deposição de colágeno nos rins dos animais dos grupos SHAM, IR e IR tratados com G-CSF;
- 3- Quantificar o número de células em apoptose dos rins dos animais dos grupos SHAM, IR e IR tratados com G-CSF;
- 4- Avaliar o efeito do G-CSF na redução da formação de espécies reativas de oxigênio através do estudo de produtos de oxidação avançada de proteínas.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados ratos da raça Wistar, adultos, machos, pesando entre 150 e 250 g. Todos os animais tiveram livre acesso à água e alimentos e permaneceram em condições ambientais controladas, com ciclos alternados de dia e noite durante todo o experimento. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 050/2013) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Os estudos de função renal foram realizados junto ao Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) e os estudos histológicos foram conduzidos no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR), do Departamento de Morfologia (CCS-UFES).

3.1.1 Grupos de animais

A) Estudo de efeitos dose-resposta:

Animais (n = 6-10) foram separados aleatoriamente para o estudo das diferentes doses de G-CSF: Controle (recebeu solução veículo de glicose 5%) e os grupos tratados nas doses de 10, 50, 100 e 250 µg de G-CSF/kg/dia de peso animal por 5 dias consecutivos.

B) Estudo do efeito do G-CSF frente à lesão do tipo isquemia/reperfusão:

1) Grupo controle (SHAM): Animais submetidos ao procedimento cirúrgico de isolamento arterial no rim esquerdo e nefrectomia direita, sem que houvesse constrição da artéria renal esquerda. Esses animais receberam solução veículo (glicos 5% via subcutânea);

2) Grupo Isquemia/Reperfusão (IR): Animais submetidos ao procedimento cirúrgico de isolamento arterial no rim esquerdo e nefrectomia direita, com constrição da artéria renal esquerda por 40 minutos. A esse grupo de animais foi administrado solução veículo contendo glicose a 5% por 3 dias consecutivos.

3) Grupo Isquemia/Reperfusão tratado com G-CSF (IR-GCSF): Animais submetidos ao procedimento cirúrgico de isolamento arterial no rim esquerdo e nefrectomia direita, com constrição da artéria renal esquerda por 40 minutos. Ao final desse tempo houve administração de G-CSF na dose de 100 µg/kg de animal via subcutânea. Os animais receberam o fármaco por 3 dias consecutivos, com início logo em seguida ao procedimento de constrição.

3.2 Procedimentos

3.2.1 Cirurgia

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados com uma solução composta por cloridrato de cetamina 10mg/mL (Quetamina-Vetnil®) e Cloridrato de xilazina 2g/100mL (Rompun®- Bayer), obtendo-

se ao final uma mistura na proporção 9 partes de cetamina para 1 parte de xilazina (9:1) administrada por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 1mL/kg de animal.

Uma vez estabelecido de uma condição anestésica satisfatória, os ratos foram colocados em posição dorsal sobre mesa cirúrgica apropriada para pequenos animais, sendo que suas 4 patas foram fixadas com fita adesiva para melhor imobilização dos mesmos. Imediatamente efetuou-se uma tricotomia da região abdominal, seguida de higienização a fim de preparar a região para o procedimento cirúrgico. Iniciou-se a cirurgia com corte da camada de pele do animal, cuja extensão do corte foi do final do abdômen até próximo ao esterno e o corte da musculatura do abdômen teve extensão idêntica ao corte da pele. Logo após houve mobilização dos órgãos/vísceras para algodão embebido em salina, feito no sentido oposto ao rim ao qual se pretendia acessar. Uma vez acessado o rim houve isolamento dos componentes do hilo renal, principalmente artéria e veia renal, necessário para que o clampeamento fosse feito de maneira adequada na artéria renal. Esse clampeamento foi feito usando fio de algodão passado pela artéria renal isolada e tracionada por pinça hemostática. Essa constrição durou 40 minutos em animais do tipo isquemia/reperfusão (IR) tratados ou não com G-CSF para a produção da condição isquêmica. Passados os 40 minutos houve liberação do clampeamento arterial renal para reestabelecimento do fluxo renal (reperfusão) no órgão, sendo que em seguida houve nefrectomia unilateral direita para retirada do órgão. Para os animais do tipo Sham houve todas as etapas do procedimento cirúrgico, excetuando-se a constrição da artéria renal. Para o grupo SHAM foi administrado solução veículo de glicose na concentração 5% (p/v).

3.2.2 Gaiolas metabólicas

Após as cirurgias, os animais foram acondicionados em caixas individuais em biotério por um período de 72 horas, correspondentes aos 3 dias de tratamento. Em seguida foram colocados em gaiolas metabólicas para mensuração do volume em 24 horas e coleta de amostra urinária.

3.2.3 Sacrifício e coleta de órgãos

Depois do período em gaiola metabólica os animais foram anestesiados e submetidos a uma toracotomia para coleta de amostras sanguíneas por meio de punção cardíaca. Após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas para separação do soro a ser utilizado em análises bioquímicas. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados de acordo com as recomendações estabelecidas para utilização de animais em estudos com a finalidade científica.

3.3 Dosagens Bioquímicas

3.3.1 Clearance de creatinina para avaliação da função renal

A avaliação da função renal foi feita seguindo a metodologia do *clearance* de creatinina a partir da mensuração da creatinina plasmática e urinária. Essa mensuração foi realizada através do método de Jaffé (DOREA et al.,1997).

3.3.2 Dosagem de creatinina plasmática

Iniciou-se a mensuração da creatinina plasmática consistiu na desproteinização do plasma. Neste processo, 0,5 mL de plasma diluído em 1,5 mL de água destilada (1:5) recebeu 0,25 mL de ácido sulfúrico 0,75N. A solução final foi homogeneizada e centrifugada durante 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante (1,5) foi retirado para a etapa seguinte.

Ao sobrenadante foram adicionados 0,3 mL de hidróxido de sódio 0,75N e 0,3 mL de ácido pícrico 0,036 M. A solução foi mantida em repouso por 20 minutos em

temperatura ambiente após a homogeneização. A leitura para a dosagem da creatinina foi feita em espectrofotômetro na faixa de absorvância de 520 nm sendo que os resultados foram expressos em mg/mL.

3.3.3 Dosagem de creatinina urinária

A dosagem de creatinina urinária reuniu 0,05 mL da amostra de urina diluída em 5 mL de água destilada (1:100), acrescentando-se 1 mL de hidróxido de sódio a 0,75N e 1 mL de ácido pícrico a 0,036M a solução. Os mesmos procedimentos descritos anteriormente para medir a creatinina plasmática foram realizados para a leitura da creatinina urinária.

O *clearance* de creatinina foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Creatinina Urinária (mg/mL)} \times \text{Fluxo Urinário (mL/min) de 24horas}}{\text{Creatinina plasmática (mg/mL)}}$$

Os valores do *clearance* de creatinina foram expressos em mL/min e foram corrigidos em função do peso de cada animal, uma vez que a massa corporal interfere nos valores de creatinina.

3.3.4 Coleta de sangue e contagem leucocitária

Para a coleta de sangue os animais foram imobilizados manualmente de modo a deixar a pata traseira em condições para que uma pequena área fosse utilizada. Houve tricotomia da região para que a veia safena lateral ficasse exposta e, uma vez que a área estivesse devidamente higienizada com álcool 70%, houve

puncionamento do sangue com uma agulha (BD[®], Brasil) 13x4,5 26G 1/2 e uma amostra de sangue era coletada com pipeta automática. Uma alíquota de 20 µm (microlitros) de sangue foi adicionada a um microtubo (Eppendorf[®]) contendo 380 µm de ácido acético a 2%. Uma vez realizada a homogeneização da solução, uma alíquota dessa solução foi colocada em câmara de Neubauer (Tiefe 0,0025mm³ – New Optics[®]) e analisada em microscópio ótico (Motic[®] BA210), onde foi realizada a contagem dos leucócitos totais.

3.4 Histologia

Após serem submetidos à eutanásia, em todos os animais houve a retirada do rim esquerdo para análise microscópica. A fixação das amostras foi realizada com a utilização de 10% de paraformaldeído neutra para um mínimo de 24 horas. Amostras do rim direito e esquerdo foram seccionadas longitudinalmente em dois fragmentos. Para cada amostra, havia dois cortes histológicos de 5 µm cada, posteriormente corados com hematoxilina e eosina (HE) e picosirius, sendo este último uma coloração específica para fibras colágenas. Utilizando-se o programa Image J foi quantificada a deposição de colágeno nas regiões cortical e medular dos rins dos animais pertencentes aos diferentes grupos.

3.5 Teste de apoptose (Teste TUNEL)

Para estimar a quantidade de células apoptóticas foi utilizado o método TUNEL (Terminal Deoxinucleotidyl Transferase (TdT) – Mediated dUTP Nick-End Labeling) que consiste na ligação de TdT a grupos 3'-OH livres de fragmentos de DNA, o que evidencia a perda de integridade genômica. Para iniciar o teste houve desparafinização e hidratação dos cortes, com aquecimento a 60°C, seguido de lavagem em xileno e hidratação por concentrações crescentes de etanol e água bi-distilada. Em seguida os cortes histológicos foram tratados com tampão citrato

0,1M, pH 6, e levados para irradiação em microondas. Após essa etapa ocorreu a marcação das lâminas com solução enzimática e solução de marcação (Kit Roche®). Uma vez adicionada a Mistura Reativa de TUNEL na amostra, foi feita incubação por 60 minutos em atmosfera umedecida, no escuro, para que houvesse a ação do reagente. Houve em sequência a adição de substrato diaminobenzidina (DAB) e, ao final do processo, as amostras foram contra-coradas com hematoxilina e fixadas com lamínula para análise em microscópio trinocular (Olympus® AX70) acoplado a uma câmera digital (Axiocam Erc5s, Zeiss®). Cada corte teve 10 campos capturados em um aumento de 400 vezes e as células foram contadas como apoptóticas de acordo com a coloração diferencial do método de TUNEL corado com diaminobenzidina (DAB). O número de células apoptóticas foi determinado pela média de células apoptóticas totais a cada 10 campos entre os diferentes grupos.

3.6 Determinação de produtos de oxidação protéica avançada (*Advanced Oxidation Protein Products - AOPP*)

Para a determinação dos valores plasmáticos de AOPP foram utilizadas alíquotas de 40 µL de soro dos animais diluídas em 160 µL de tampão fostafo (PBS) numa leitora de microplacas de acordo com Witko-Sarsat et al., (1996). Em seguida foram adicionados 20 µL de ácido acético glacial ultrapuro. A leitura das amostras foi feita no comprimento de onda de 340 nm sendo que as análises foram feitas em triplicatas. Os valores obtidos foram comparados a uma curva de calibração feita previamente com Cloramina T (Sigma®, St Louis, MO, EUA) na presença de iodeto de potássico.

3.7 Análise Estatística

Para a análise estatística e geração dos gráficos utilizou-se o *software* GraphPad Prism versão 6.01. Para eliminar redundâncias e inconsistência nos dados obtidos foi feita a normalização dos mesmos segundo teste de Normalização do *software* GraphPad Prism versão 6,01. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para uma via seguido do pós-teste de Tukey, onde houve comparação de médias dos grupos estudados. Os resultados foram apresentados como média e erro padrão da média e os valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Curva Dose-Resposta G-CSF

Foi feita uma relação entre a dose do fármaco G-CSF e a resposta fisiológica dos animais em diferentes doses para avaliar se o fármaco poderia interferir negativamente no tratamento dos animais, representado no gráfico 1.

4.1.1 Contagem de leucócitos da curva de dose-resposta ao G-CSF

A contagem de leucócitos foi feita em 3 momentos: antes do tratamento com o G-CSF (dia 1), ao terceiro dia de tratamento (dia 3) e ao quinto dia (dia 5) de tratamento (último dia de administração do fármaco). No dia 1 de tratamento os animais apresentaram uma média de 10050 ± 995 EPM, 9687 ± 710 , 10200 ± 309 , 12188 ± 561 e 14595 ± 2082 leucócitos/dL de sangue para os grupos Controle, 10 μg , 50 μg , 100 μg e 250 μg respectivamente. Ao terceiro dia de tratamento os grupos Controle, 10 μg , 50 μg , 100 μg e 250 μg apresentaram uma média de 10800, 12300, 16000 ± 1342 , 21357 ± 1414 e 23720 ± 1936 leucócitos/dL de sangue, respectivamente. No dia 5 de tratamento as médias de leucócitos foram 9880, 14375 ± 872 EPM, 19670 ± 1764 , 28589 ± 3708 e 31740 ± 5122 leucócitos/dL de sangue para os grupos Controle, 10 μg , 50 μg , 100 μg e 250 μg respectivamente.

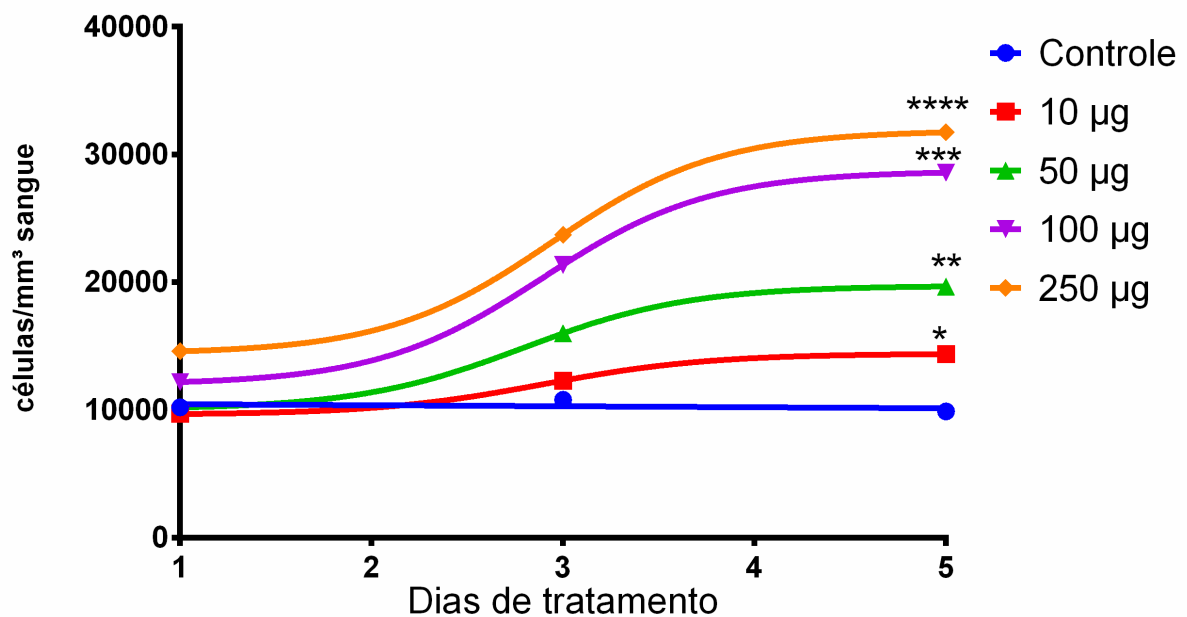


Gráfico 1: Contagem de leucócitos presentes no sangue dos animais comparando os diferentes grupos. Controle (solução glicose 5%); Doses de G-CSF (10, 50, 100 e 250 µg/kg animal) * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,05$ e **** $p < 0,05$.

4.1.2 Avaliação bioquímica dos grupos da curva dose-resposta.

Foi feita uma relação entre os parâmetros bioquímicos e as diferentes doses de G-CSF para os diferentes grupos estudados na curva dose-resposta. Além do grupo Controle que recebeu veículo (glicose 5%) as doses de G-CSF foram 10, 50, 100 e 250 µg/kg animal em que os parâmetros de creatinina plasmática, creatinina urinária, uréia plasmática, proteinúria e volume urinário foram mensurados.

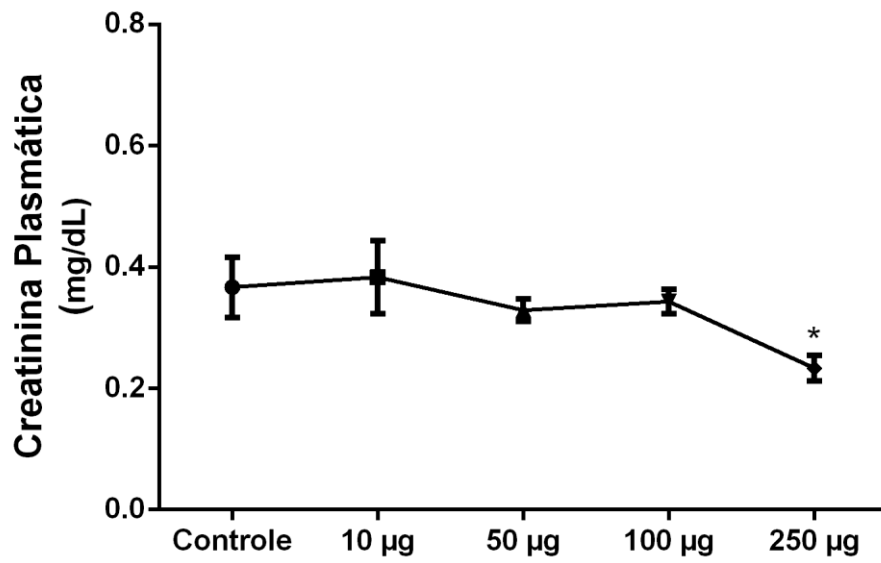


Gráfico 2: Valores de creatinina plasmática dos animais dos grupos relacionados para a curva dose-resposta. *p<0,05.

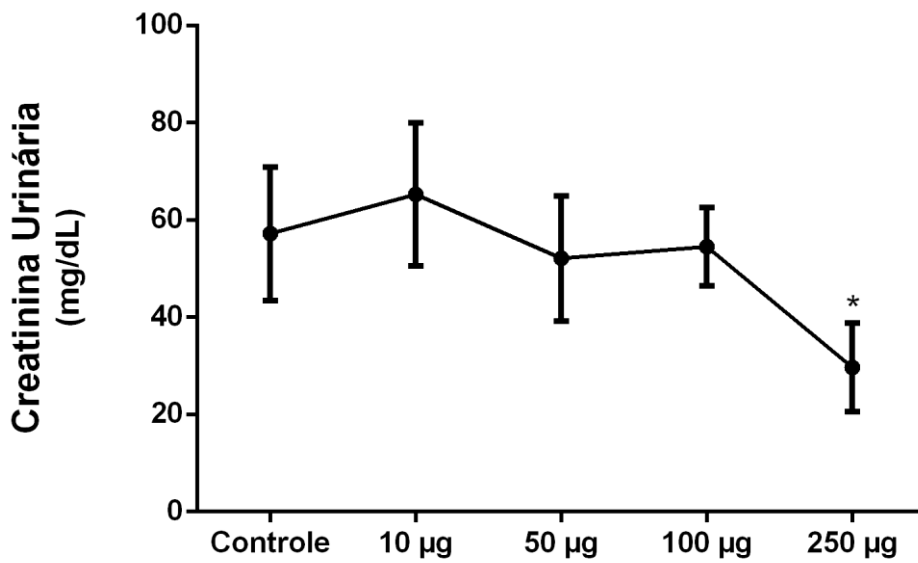


Gráfico 3: Valores de creatinina urinária entre dos animais dos grupos relacionados para a curva dose-resposta. *p<0,05.

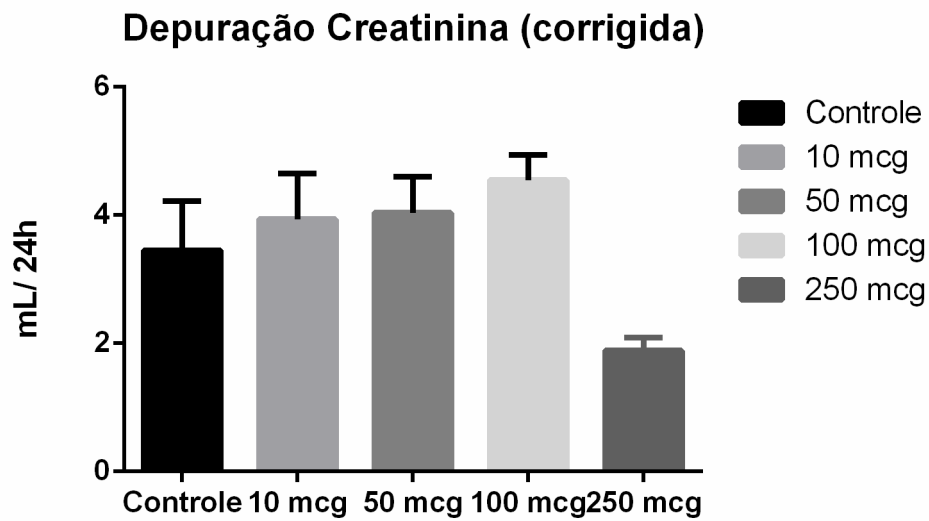


Gráfico 4: Valores de depuração de creatinina corrigida entre dos animais dos grupos relacionados para a curva dose-resposta. * $p < 0,05$ (vs Controle). Correção feita utilizando o peso dos animais como parâmetro.

ANIMAL	Uréia Plasmática (mg/dL)	Volume Urinário (mL/24h)	Proteinúria (mg/dL)
Controle	36.9 ± 1.9	13.4 ± 0.9	22.2 ± 14.9
10 µg	36.8 ± 1.8	15.8 ± 1.5	25.7 ± 11.9
50 µg	37.7 ± 0.8	14.2 ± 0.4	30.4 ± 2.0
100 µg	42.8 ± 2.1	15.7 ± 0.8	52.9 ± 3.2*
250 µg	40.9 ± 0.9	13.9 ± 1.3	79.9 ± 7.49**

Tabela 1: Valores de uréia plasmática, volume urinário e proteinúria dos animais dos grupos relacionados para a curva dose-resposta. Valores de média e erro padrão médio. * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$.

4.2 Contagem de Leucócitos entre os grupos SHAM, IR e IR-GSCF.

Foi feita a contagem de leucócitos antes, durante e ao final do tratamento nos três grupos: SHAM, IR e IR-GSCF. Antes do tratamento os animais não apresentaram diferenças significativas no total de leucócitos circulantes (SHAM: 10215 células/dL; IR: 11595 células/dL e IR-GSCF: 9846 células/dL) em média. Na coleta realizada no terceiro dia houve aumento na contagem total dos leucócitos dos animais tratados com G-CSF enquanto nos demais grupos não houve elevação significativa. Ao final do tratamento (dia 5) os animais dos grupos SHAM e IR apresentaram 10370 células/dL e 11775 células/dL respectivamente enquanto os animais do grupo IR-GCSF apresentaram 28800 células/dL em média.

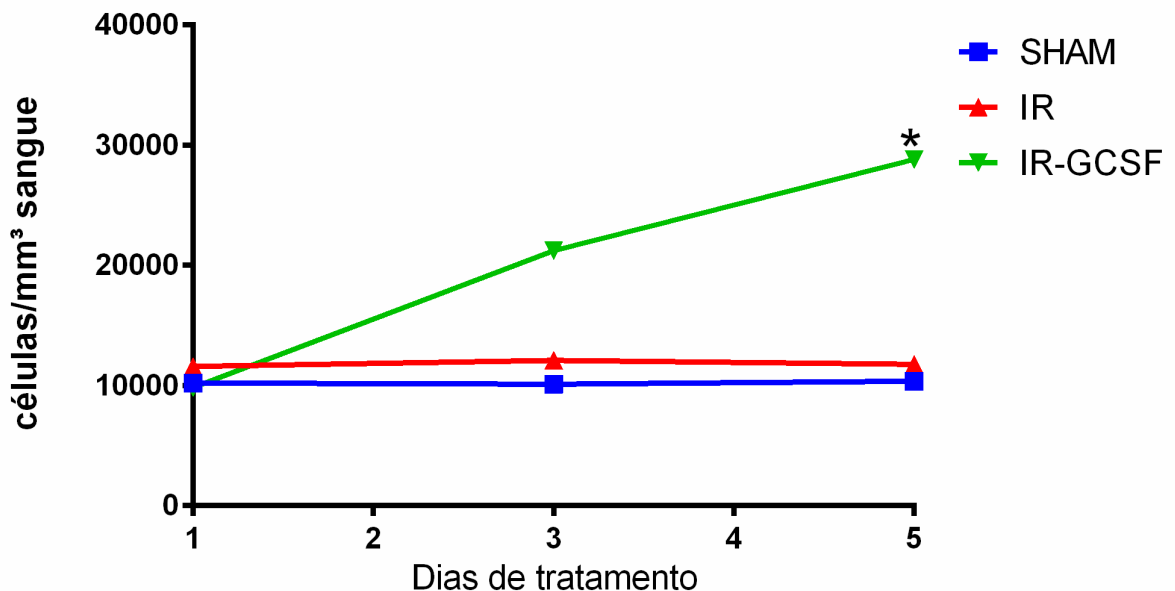


Gráfico 5: Número de leucócitos por mm³ de sangue durante os dias de estudo. * $p < 0,05$ VS Grupos controle e intragrupo. SHAM (“falso operado”), IR (Isquemia/reperfusão) e IR-GCSF (Isquemia/reperfusão tratado com G-CSF 100 µg/kg).

4.3 Comparação de parâmetros bioquímicos entre os animais SHAM, IR e IR-GSCF

Os valores médios de creatinina plasmática foram de 0,34 mg/dL \pm 0,016; 0,43 \pm 0,026 e 0,33 \pm 0,025 para os animais dos grupos SHAM, IR e IR-GSCF respectivamente. Já os valores de creatinina urinária foram de 25,00 mg/dL \pm 4,34; 38,10 \pm 2,29 e 17,00 \pm 1,99 para os animais dos grupos SHAM, IR e IR-GSCF respectivamente.

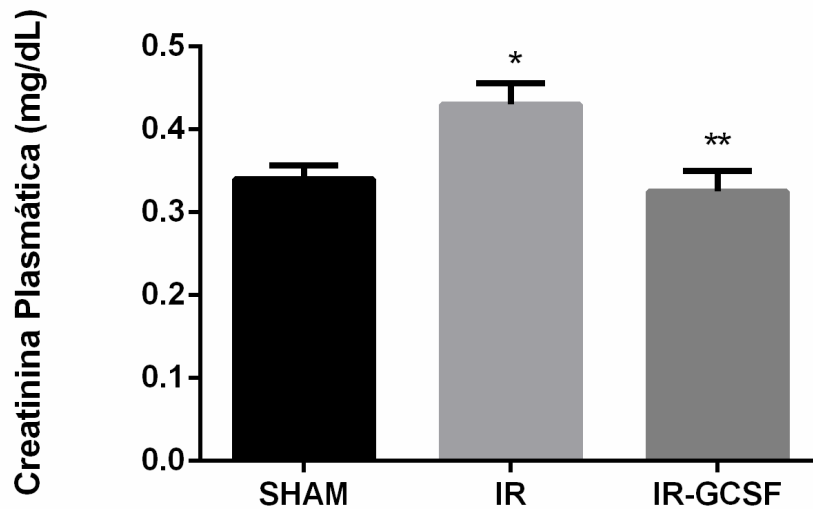


Gráfico 6: Valores de creatinina plasmática para os diferentes grupos. * $p < 0,05$ SHAM vs IR; ** $p < 0,05$ IR vs IR-GCSF.

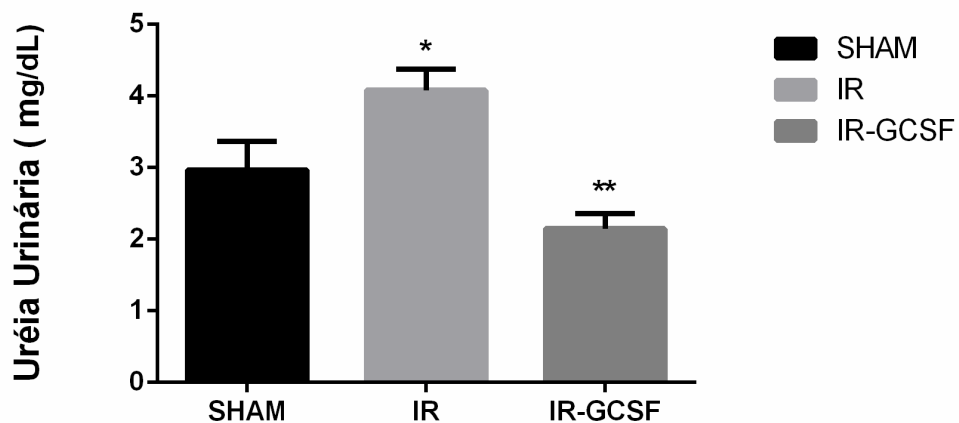


Gráfico 7: Valores de concentração de uréia urinária nos diferentes grupos. * $p < 0,05$ SHAM vs IR; ** $p < 0,05$ IR vs IR-GCSF.

Com relação à proteinúria dos animais dos grupos SHAM, IR e IR-GCSF os valores encontrados foram $22,65 \pm 12,15$; $39,46 \pm 2,69$ e $22,29 \pm 1,38$, respectivamente.

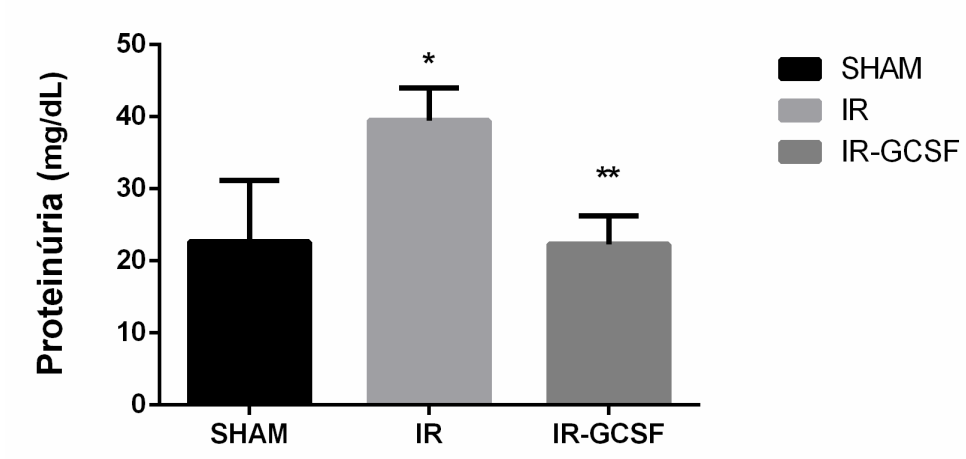


Gráfico 8: Valores de proteinúria encontrado para os diferentes grupos; * $p < 0,05$ SHAM vs IR ; ** $p < 0,05$ IR vs IR-GCSF

O volume urinário dos animais permaneceu praticamente constante, com médias de $16,8 \pm 0,80$ para o grupo SHAM, $15,10 \pm 0,60$ para o grupo IR e $14,50 \pm 1,13$ para o grupo IR-GCSF.

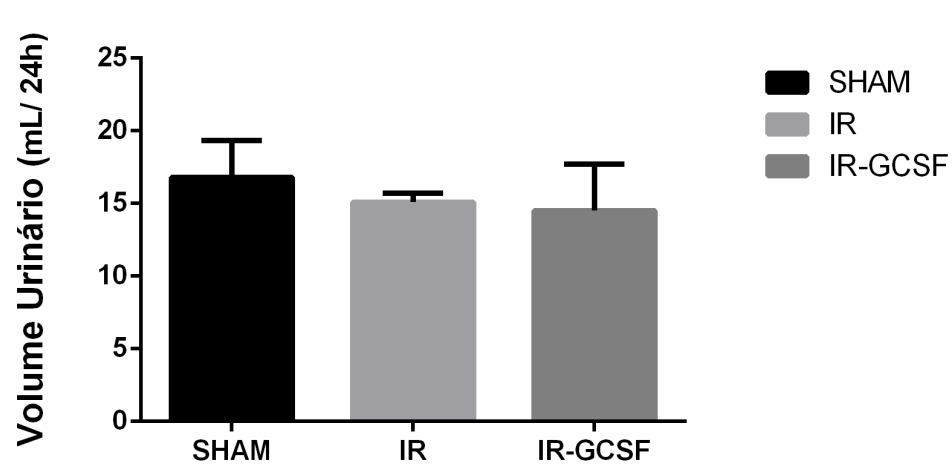


Gráfico 9: Valores de volume urinário para os diferentes grupos após 24h

4.4 Deposição de colágeno em relação à lesão isquêmica e ação do G-CSF

Para avaliar o reparo tecidual frente à lesão por isquemia/reperfusão foi feita a comparação entre a deposição de colágeno nas regiões cortical e medular dos animais dos diferentes grupos. Considerando a região cortical o grupo SHAM apresentou 10,84% ($\pm 0,84$ EPM) o grupo IR 17,21% ($\pm 0,95$) e o IR-GSCF 15,78% ($\pm 1,19$). Para a região medular os valores de deposição de colágeno foram de 16,22% ($\pm 3,41$ EPM), 32,99% ($\pm 1,17$) e 20,22% ($\pm 1,18$). Passados 5 dias após o evento isquêmico, foi observada diferença estatística significativa entre a deposição de colágeno na região cortical entre os animais dos grupos SHAM e IR mas não houve diferença entre os grupos IR e IR-GSCF.

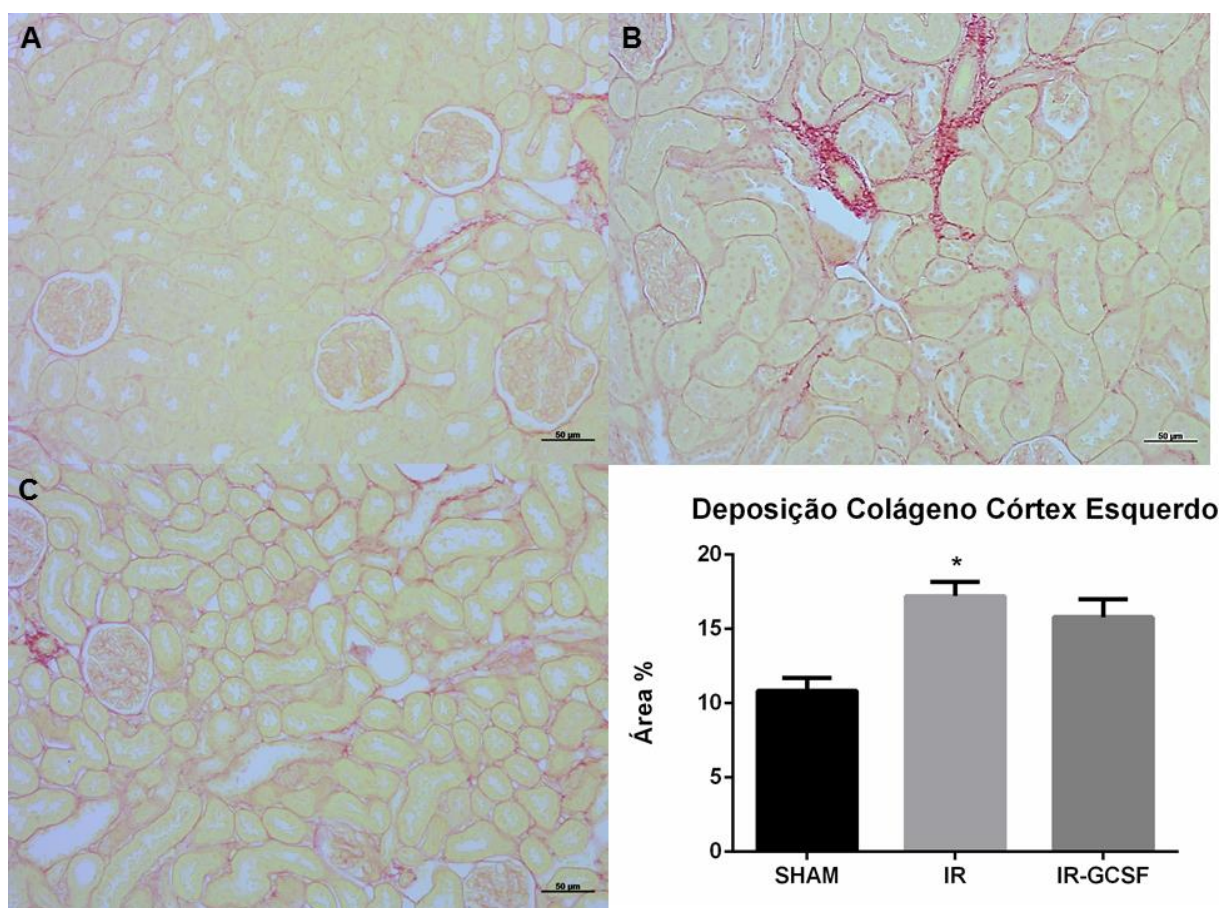


Figura 1: Deposição de colágeno CORTICAL. Coloração histológica por picrosírius. (A) SHAM, (B) IR e (C) IR-GSCF. Aumento 200x. No gráfico há a comparação de deposição de colágeno cortical entre os grupos SHAM, IR e G-CSF (IR). * $p < 0,05$ IR vs SHAM.

Quando comparadas as regiões medulares, houve diferença significativa entre os grupos SHAM vs IR e entre os grupos IR vs IR-GSCF, indicando que o G-CSF foi capaz de reduzir a deposição de colágeno nessa região após o evento de isquemia/reperfusão.

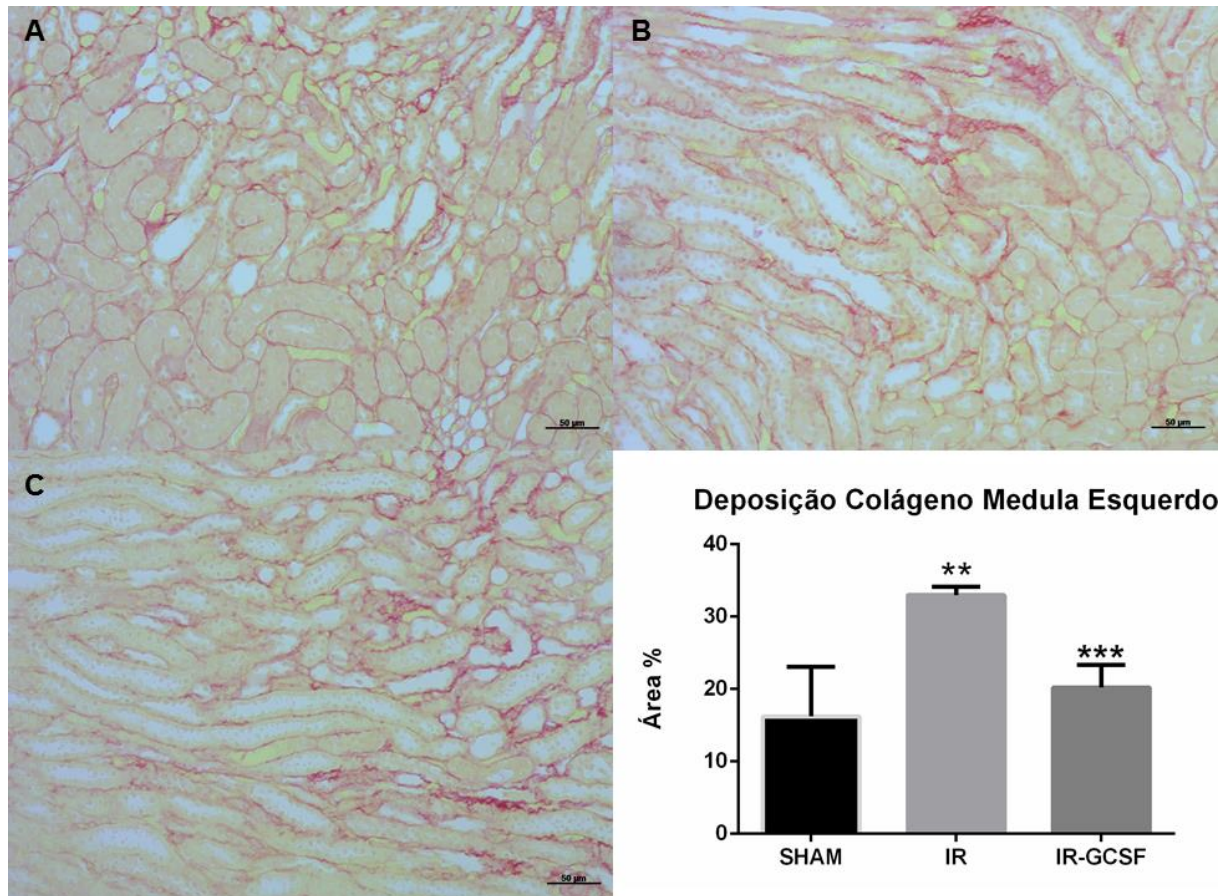


Figura 2: DEPOSIÇÃO COLÁGENO MEDULAR. Coloração histológica por picrosirius. (A) SHAM, (B) IR e (C) IR-GSCF. Aumento 200x. O Gráfico de barras mostra a área percentual da deposição de colágeno medular entre os grupos SHAM, IR e G-CSF (IR); ** $p < 0,05$ IR vs SHAM e *** $p < 0,05$ IR vs IR-GSCF.

4.5 Número de células apoptóticas

Os grupos SHAM, IR e IR-GCSF apresentaram respectivamente uma média de 5,7 ($\pm 1,32$), 200,3 ($\pm 21,28$) e 90 ($\pm 10,06$) células apoptóticas a cada 10 campos analisados. O procedimento de isquemia/reperfusão aumentou o número de células apoptóticas, o que ficou demonstrado quando comparados os grupos SHAM com o IR. O G-CSF foi capaz de diminuir o número de células quando comparados os grupos IR e IR-GCSF.

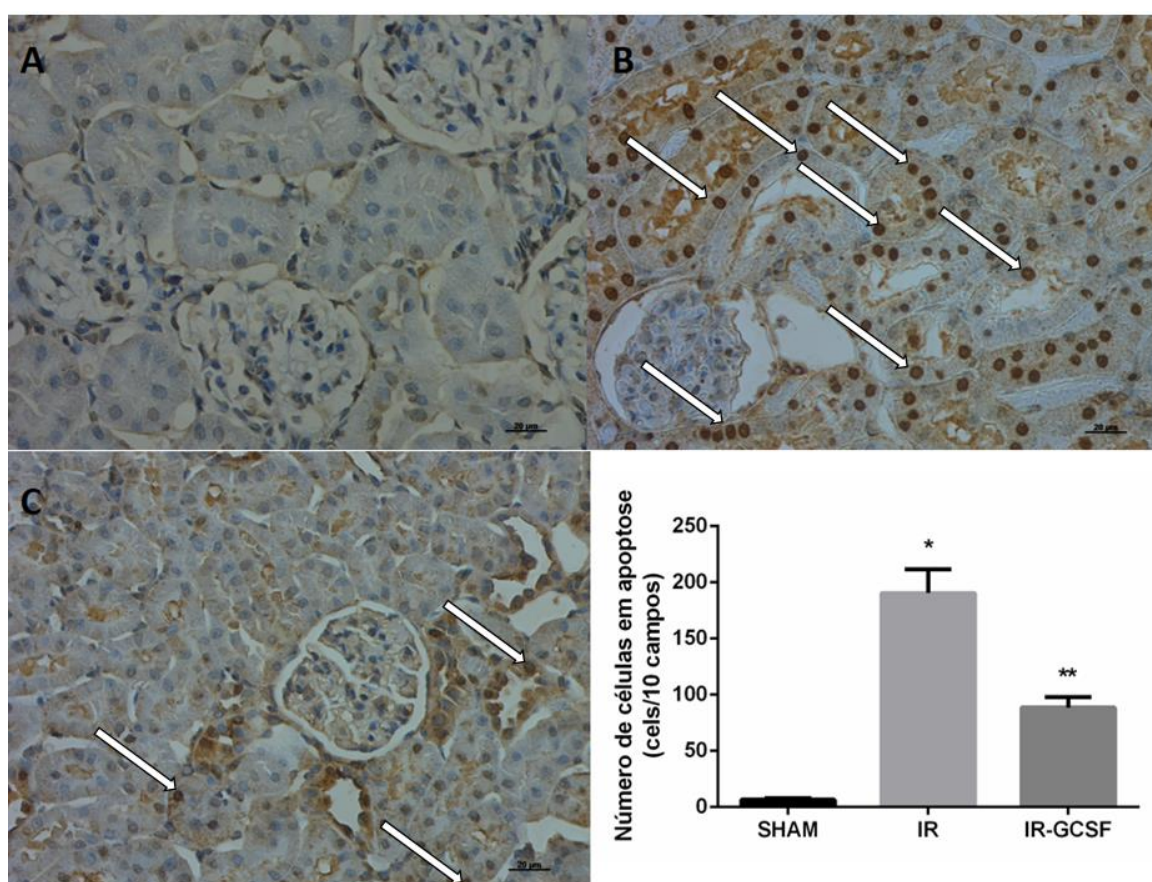


Figura 3: Imagem típicas do tecido renal utilizados na quantificação de células apoptóticas pelo método TUNEL. Contraste feito com Hematoxilina. (A) SHAM, (B) IR e (C) IR-GSC. Gráfico representando o número de células apoptóticas/10 campos (magnificação de 400x); * SHAM vs IR ; ** IR vs IR-GSCF. Setas indicam células em apoptose.

4.6 Teste de Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas (AOPP)

Os dados preliminares do presente estudo evidenciaram diferença significativa nos níveis médios de produtos avançados de oxidação protéica (AOPP). Foi possível observar que houve aumento significativo de proteínas oxidadas no grupo IR comparado ao grupo SHAM, mostrando que o evento isquêmico gera produtos protéicos oxidados. Também foi possível observar que o grupo IR-GCSF teve uma redução significativa na formação dessas proteínas oxidadas, quando comparado ao grupo IR.

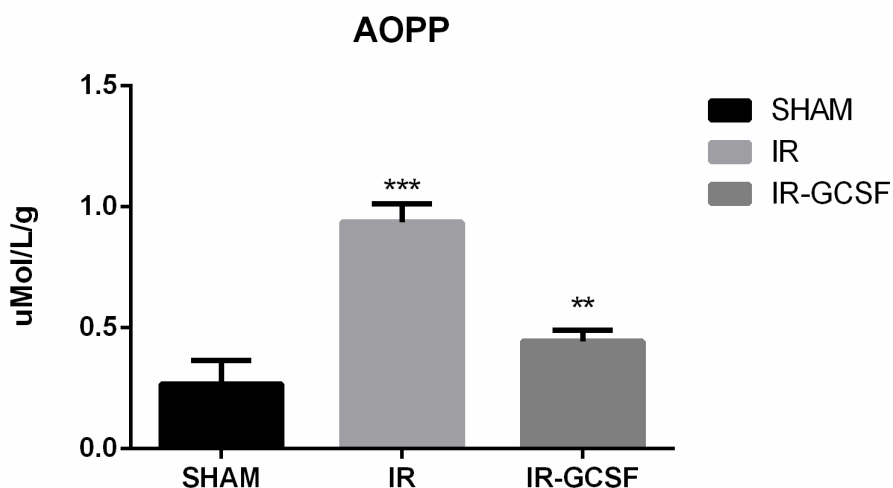


Gráfico10: Representação das concentrações de proteínas oxidadas nos diferentes grupos; ** $p < 0,05$ IR vs SHAM e *** $p < 0,05$ IR vs IR-GSCF.

5. DISCUSSÃO

As lesões provocadas por isquemia/reperfusão (IR) podem provocar danos que podem levar à insuficiência renal aguda (IRA). A IRA é caracterizada pela rápida perda da capacidade renal em excretar resíduos metabólicos, concentrar urina, conservar eletrólitos importantes e manter o equilíbrio hídrico corporal. Esse tipo de lesão renal é considerada uma síndrome inflamatória, ou seja, ela provoca uma resposta inflamatória que atua diretamente no rim, induzindo uma lesão tecidual e, de maneira sistêmica, afeta órgãos à distância (PAUL LC, de FIJTER J, BOOM H 1999; CHANDRAKER et al., 1997). Diversos estudos têm demonstrado que o evento da IR está associado com a peroxidação lipídica, que leva à destruição oxidativa de membranas celulares e essa destruição conduz à produção de toxinas, aldeídos reativos do metabolismo e morte celular (LAND W, MESSMER K, 1996; CHEESEMAN KH, 1993; PINCEMAIL J et al., 1993). Dentre os metabólitos aldeídicos o malonildialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal são os mais importantes (ESTERBAUHER H, SCHAUR RJ, ZOLLNER H, 1991; DAVENPORT A, HOPTON M, BOLTON C, 1995). Os múltiplos caminhos bioquímicos que são ativados pela lesão celular severa, e que levam à necrose celular incluem: depleção das reservas energéticas celulares (depleção de ATP), aumento do cálcio citosólico livre, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a ativação de várias enzimas incluindo fosfolipases, proteases e nucleases. Mudanças típicas de apoptose ocorrem tais como condensação celular e de seu núcleo, fragmentação do DNA, condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos, encolhimento (tamanho) da célula, etc. (BONEGIO R & LIEBERTHAL W, 2002).

No presente trabalho foi feita em laboratório a reprodução do modelo de isquemia/reperfusão para simular os eventos clínicos que acarretam a má circulação renal e seus efeitos deletérios, sendo que o evento isquêmico provoca um dano tecidual que pode ser reduzido pela diminuição do tempo de isquemia, pela diminuição da resposta inflamatória ou pela diminuição do número de células em estado apoptótico. O modelo experimental mimetizando a lesão renal por isquemia/reperfusão já foi bem estabelecido na literatura e, apesar de sua relativa facilidade em execução, induz uma lesão extremamente severa, causando uma

extensa necrose tecidual e elevação dos níveis de produtos a serem eliminados pelos rins.

Um fator importante na determinação da lesão é o tempo de isquemia. Um tempo de isquemia maior do que 60 minutos pode causar lesões irreversíveis, com morte celular (KENNEDY SE, ERLICH JH, 2008). O tempo de 40 minutos adotado nesse trabalho provoca uma isquemia tecidual moderada em que pode haver recuperação após a reperfusão. A interrupção aguda do fluxo sanguíneo no rim não necessariamente reflete de forma fiel uma situação de baixo débito sanguíneo, para o qual existem mecanismos compensatórios para a manutenção da pressão de perfusão renal até certo limite. A chegada de sangue rico em oxigênio na região isquêmica gera uma intensa produção de radicais livres (principalmente EROs) com consequente dano tecidual. Existem outras situações clínicas de reduzido débito, como o choque hipovolêmico e algumas situações cirúrgicas em que o pedículo renal normalmente é ocluído por certo período de tempo, pode também levar ao quadro de isquemia/reperfusão e consequente dano tecidual.

Na busca por fármacos ou estratégias clínicas para minimizar os efeitos deletérios da lesão por IR, vários estudos têm sido realizados. Jeong et al., (2004) demonstraram que a isquemia renal leva ao aumento da resistência vascular, justificada pela perda na capacidade do endotélio vascular em produzir e liberar óxido nítrico (NO), ou pelo desequilíbrio entre a produção de NO e endotelina-1, essencial para a função vascular na regulação da perfusão de órgãos. Trabalhos experimentais utilizando NO e monóxido de carbono, apresentaram efeito protetor contra a lesão por isquemia/reperfusão (JEONG et al., 2004; HOSGOOD et al., 2008). Sener e cols (2006) utilizaram o fármaco montelucaste, antiinflamatório utilizado na prática clínica para o tratamento de asma, para avaliar seu efeito protetor em casos de isquemia/reperfusão renal onde foi demonstrado efeito benéfico do montelucaste. Altintas e cols (2012) testaram o dexpantenol, conhecido também como vitamina B5, também utilizando o modelo experimental de IR renal onde houve efeito protetor após lesão isquêmica. Uma possível explicação para o efeito protetor apresentado pela vitamina B5 seria a sua atividade antioxidante, inibindo assim os efeitos nocivos provocados pelas espécies reativas de oxigênio. Além disso Karadeniz e cols (2013) testaram a halofuginona, fármaco com comprovada

atividade antiparasitário, nesse mesmo modelo de IR renal em ratos onde também houve efeito protetor para o tecido renal frente à lesão isquêmica. Desse modo, a perspectiva de que a terapia utilizando o G-CSF possa prevenir ou reduzir o dano ao tecido renal provocado por esse tipo de lesão torna-se atraente do ponto de vista clínico, sendo que os efeitos da administração de G-CSF exógeno no curso das lesões renais agudas têm sido analisados em modelos experimentais de falência renal aguda. Segundo Tögel e cols (2004), o tratamento com G-CSF apresentou um efeito favorável no curso da falência renal aguda e resultou na diminuição da lesão comparado com murinos controle que sofreram o mesmo tipo de lesão.

Não foi encontrada na literatura uma dose ideal estabelecida para utilização do fármaco G-CSF em casos de lesão isquêmica. Dessa forma foi feita uma avaliação do tipo curva dose-resposta, para mensurar a resposta da população estudada a partir de doses pré-estabelecidas, importante para que fosse estabelecida uma dose do fármaco suficientemente eficaz para gerar uma resposta fisiológica benéfica e assim evitar que o próprio fármaco se comportasse como um agente deletério no tratamento. A curva dose-resposta representa a relação entre a dose e a proporção da população em estudo que responde com um efeito quantitativo.

A eficácia da administração do G-CSF foi realizada indiretamente através da contagem dos leucócitos circulantes. Foi observado um aumento gradual no total de leucócitos circulantes em relação ao aumento progressivo das diferentes doses dos grupos analisados. De acordo com os dados obtidos nesse estudo as doses de 10, 50 e 100 μg de G-CSF/kg animal não apresentaram diferenças significativas em relação à função renal dos animais (creatinina plasmática, uréia plasmática, *clearance* de creatinina). A partir da dose de 250 μg há um decréscimo no *clearance* de creatinina e aumento nos valores de uréia plasmática, indicando um prejuízo da função renal provocado pelo próprio fármaco. Nessa dose o fármaco passa a contribuir negativamente para a preservação da função renal dos animais. Vale lembrar que a correta administração do fármaco permite a otimização da terapêutica e auxilia na diminuição dos custos ao longo da pesquisa.

Ao se considerar a proteção renal, geralmente pensa-se na preservação da estrutura dos néfrons e na preservação da função renal, sendo que os indicadores

de função renal mais empregados na prática clínica são o doseamento plasmático de creatinina e de uréia. Esses indicadores bioquímicos permitem inferir se houve redução da filtração glomerular, com conseqüente acúmulo de compostos nitrogenados. Os níveis séricos de creatinina e a concentração sanguínea da uréia são dois importantes fatores para se avaliar o Índice de Filtração Glomerular (IFG), índice que expressa o volume de flúido filtrado pelos glomérulos por unidade de tempo. Estes níveis podem estar elevados ou diminuídos em determinadas situações (GUYTON AC, 1997; MITCH WE, 2001). O cálculo de *clearance* de creatinina permite quantificar o grau da função renal e assim avaliar de que modo o G-CSF foi capaz de interferir nesse parâmetro. Grande parte da creatina produzida pelo organismo é filtrada pelos rins e excretada por eles, tornando-se assim um indicador mais fiel da função renal (MITCH WE, 2001).

No presente trabalho, a análise da extensão do dano renal foi realizada através das concentrações plasmáticas e urinárias de creatinina, uréia bem como a proteinúria. Pode-se observar que verificar que o evento isquêmico renal causou um decréscimo importante da função renal. Há uma correlação entre a redução da taxa de filtração glomerular e os níveis plasmáticos de creatinina e uréia, o que permite a utilização desses parâmetros bioquímicos como marcadores funcionais de lesão renal (FRIEDEWALD JJ, RABB H. 2004). Os dados obtidos demonstraram uma capacidade de proteção significativa da função renal dos animais isquêmicos. Ao analisar os valores de creatinina e uréia plasmática entre os grupos SHAM, IR e IR-GCSF foi possível verificar que houve aumento nos valores de uréia plasmática dos animais submetidos a IR e que houve elevação nos valores de creatinina plasmática desse mesmo grupo. Foi feita uma relação entre a taxa de filtração glomerular (creatinina sérica) e o débito urinário com a gravidade da lesão renal, sendo que elevações estatisticamente significantes nesses parâmetros foram considerados como indicadores de lesão renal.

Também houve maior proteinúria nos animais submetidos ao processo isquêmico, indicando dano tecidual renal. Altas doses de G-CSF, como a de 250 µg/kg utilizada na curva dose-resposta, poderiam reduzir os níveis plasmáticos de creatinina, como encontrado no presente trabalho, sendo necessários estudos futuros para elucidar o modo pelo qual esse mecanismo ocorre. Os animais do grupo

IR-GCSF tiveram seus valores de creatinina plasmática e uréia próximos aos do grupo SHAM, demonstrando que houve proximidade dos valores médios desses indicadores entre os grupos provocados pela intervenção farmacológica pelo G-CSF. Resposta semelhante a da creatinina plasmática também foi obtida pela comparação entre a uréia plasmática dos grupos SHAM e IR-GCSF. A uréia do organismo é proveniente da ingestão alimentar na sua maioria, formando-se no fígado e excretada pelo rim. Percebe-se que os níveis séricos de uréia aumentaram no grupo IR e que o no grupo IR-GCSF houve redução significativa desse parâmetro. Rins submetidos ao processo de IR exibem um déficit funcional que também inclui uremia, conforme demonstrado em estudos prévios (JABLONSKI et al., 1983; WILLIAMS et al., 1997). A elevação dos níveis séricos da uréia nos grupos IR e IR-GCSF pode ser explicada ou pela lesão tecidual renal causada pela isquemia renal de 40 minutos seguida de reperfusão deste órgão, causando maior dano tecidual, diminuindo assim a capacidade dos rins de filtração da uréia que se acumulou no sangue, ou por uma não alteração da função renal, elevando a reabsorção de sódio e água a serem filtrados, elevando assim a concentração de uréia no líquido tubular e elevando, como consequência, a reabsorção da uréia.

A proteinúria é um dos parâmetros a ser considerado na avaliação da extensão do dano tubular renal sendo que valores elevados de proteinúria indicam maior dano tubular. Foi observado também que o evento isquêmico elevou os valores médios de proteinúria dos animais do grupo IR e que o tratamento com G-CSF reduziu significativamente a proteinúria dos animais do grupo IR-GCSF.

Nesse trabalho a função renal foi avaliada 5 dias após o evento IR, com 3 dias de tratamento e considerando o quinto dia como dia de sacrifício dos animais. Segundo relatos encontrados na literatura do tema tratado nesse trabalho (SABBADINI et al., 2009; RUBSTEIN et al., 2009) na fase inicial do evento isquêmico, cerca de 48 horas após a IR em específico, a taxa de IFG, poderia ser mínimo, após períodos similares de isquemia. Tögel e cols (2004) em estudo usando a ciclofosfamida, droga antineoplásica utilizada no tratamento quimioterápico e de doenças autoimunes, junto com G-CSF constatou piora da função renal em ratos submetidos ao processo de IR. Nesse estudo a ciclofosfamida foi aplicada no dia 1 após isquemia e o G-CSF foi administrado na dose de 125 µg/kg duas vezes ao dia

(por 3 dias consecutivos) 4 dias após o evento isquêmico. A exposição do tecido renal após IR à ciclofosfamida poderia provocar maiores danos renais devido a toxicidade do fármaco e assim a ação protetora do G-CSF ficaria comprometida. Vale destacar que a ciclofosfamida apresenta comprovada ação citotóxica, interferindo negativamente no metabolismo de células hepáticas e renais, além de possuir efeitos carcinogênicos e teratogênicos (de JONGE et al., 2005). Assim o G-CSF não necessariamente seria o agente causador da expansão dos danos no evento isquêmico pois a ação tóxica da ciclofosfamida sobre o tecido renal inclusive sobre o material genético dessas células, poderiam piorar a lesão renal aguda.

Como consequência deletéria do evento de IR tem-se também a fibrose renal provocada pela presença de citocinas inflamatórias. A fibrose renal é caracterizada pela síntese excessiva de tecido conectivo, e o colágeno é o componente principal em lesões fibróticas. Quantidades aumentadas de colágeno dos tipos I, III e IV acompanham o processo de fibrose renal, sendo que a expressão mais baixa de colágeno tipo I em rins normais torna-se particularmente aumentada após lesões renais (PINES M, NAGLER A, 1998). No presente trabalho observou-se através da quantificação da deposição de colágeno nas regiões cortical e medular que o G-CSF é capaz de reduzir essa deposição. Observa-se que os animais submetidos à IR acabam por apresentar maior deposição de colágeno nas regiões cortical e medular quando comparados aos animais do grupo SHAM. O G-CSF apresentou redução significativa dessa deposição apenas para a região medular do grupo IR-GCSF. Isso pode ser justificado pela maior susceptibilidade da região medular ao evento isquêmico quando comparada a região cortical, devido a um menor fluxo sanguíneo nessa região, que leva à uma lesão celular mais prologanda e também uma maior morte celular nesse segmento renal (DAGHER et al., 2003). O número de microvasos no interior da faixa externa medula declina depois da lesão isquêmica, potencialmente facilitada pela reduzida atividade de fatores angiogênicos e regulação positiva de inibidores da angiogênese (BASILE et al., 2008). Esta redução do número de vasos está associada com a hipoxia crônica, que leva a um aumento da lesão tubular e fibrose tubulointersticial (BASILE, DP; 2007).

A apoptose é reconhecidamente uma das maiores causadoras de morte celular durante o evento IR e pode ainda impactar na função renal independente da

inflamação. A isquemia resulta em apoptose e necrose e a restauração do fluxo sanguíneo paradoxalmente potencializa a resposta inflamatória e agrava os danos teciduais (AYDIN Z, van ZONNEVELD AJ, de FIJTER JW, et al., 2007). A apoptose tubular renal é uma das principais contribuintes na patofisiologia da IR renal (DEVARAJAN P, 2006). Os eventos apoptóticos iniciam-se com a ativação de caspases e clivagem de proteínas prosseguindo para a a ativação de enzimas que quebram o ácido nucléico (DNA) e também com a expressão de citocinas que atraem mais macrófagos e assim há expansão dos danos e maior ativação de células para o estado apoptótico. Por outro lado, sabe-se que o impedimento da apoptose em sua fase inicial aumenta a sobrevivência tecidual renal após IR (DAEMEN MA, van't VEER C, DENECKER G, et al., 1999). Em estudos prévios foi observado principalmente a formação de células em estado apoptótico na região medular (medula externa), considerada a área mais susceptível aos danos provocados pela lesão do tipo IR (SCHRIER RW, WANG W, POOLE B, et al., 2004). Fármacos vêm demonstrando um efeito antiapoptótico em casos de IR, em parte pela diminuição da apoptose (KELLY KJ, SUTTON TA, WEATHERED N, et al., 2004; HU H, CHEREAU C, GOBEAUX C, et al., 2011). O G-CSF mostra-se também um ativador de vias de sobrevivência celular e uma via antiapoptótica conhecida é a regulação da STAT-3 e Bcl2, famílias de protooncogenes capazes de promover a sobrevivência celular (HARADA M, 2005; FERRER I, PLANAS AM, 2005).

A avaliação da atividade antiapoptótica do fármaco foi feita através do método terminal deoxinucleotidil transferase mediado por dUTP final de marcação (método TUNEL) em que as células em estado apoptótico apresentaram marcação mais pronunciada do que aquelas que não se encontravam nessa mesma condição. Foi possível observar a formação de células apoptóticas nos grupos IR e IR-GCSF sendo que, quando observada apenas a região cortical, o G-CSF não apresentou redução significativa da apoptose nessa região. Em se tratando da região medular, área mais susceptível aos efeitos nocivos da IR, houve significativa redução da formação de células apoptóticas no grupo IR-GSCF quando comparado ao grupo IR. Há, portanto, uma ação antiapoptótica do G-CSF contribuindo positivamente para a recuperação do tecido renal após a lesão por IR. Com relação à apoptose, sabe-se que há um equilíbrio entre proteínas antiapoptóticas (ex.: Bcl-2 e Bcl-x) e proteínas

pró-apoptóticas (ex.: Bax e Bad) sendo que o G-CSF favorece o equilíbrio no sentido das proteínas antiapoptóticas.

Vários processos estão relacionados à patogênese da lesão induzida pelo evento isquêmico privando as células de oxigênio, que incluem distúrbios do metabolismo do cálcio celular, a ativação de fosfolipases, a perda de volume das células e a geração de radicais livres (GRANGER DN, KORTHIUS RJ, 1995). Normalmente as EROs geradas durante a isquemia/reperfusão são consideradas para produzir danos celulares por meio de uma ativação direta sobre as células-alvo, no entanto, também é confirmado que as EROs também podem atuar como moléculas de transdução de sinal para regular a transcrição de genes e ativar fatores de vias apoptóticas (HALLORAN et al., 1997). Durante o evento isquêmico, neutrófilos são ativados a induzir lesão tecidual por meio da produção de metabólitos reativos de oxigênio e proteínas citotóxicas (ex. Proteases, mieloperoxidases) no líquido extracelular, que constituem a cascata inflamatória provocada pela isquemia/reperfusão (K.KETTLE AJ, WINTERBOUN CC, 1997). Macrófagos que se infiltram têm sido associados à lesão renal, e o bloqueio ou diminuição da infiltração de macrófagos e monócitos demonstrou ser protetora em casos de lesão renal isquêmica (VILANUEVA et al., 2007; WANG Z et al., 2012) Embora os mecanismos exatos que levam à ativação dos macrófagos em renal de isquemia-reperfusão ainda são desconhecidos, acredita-se que a ativação dos macrófagos é um passo crítico, resultando não só na patogênese da necrose tubular mas também produzindo citocinas pró-inflamatórias que acabam participando de processos de reparação e regeneração tecidual.

Os produtos de oxidação proteica (AOPP) têm sido considerados novos marcadores de oxidação e dano às proteínas, podendo ser utilizados para estimar o dano oxidativo proteico (WITKO-SARSART et al., 1996; KELLY et al., 2002) A quantificação direta das espécies reativas de oxigênio (ex. peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, etc.) é bem difícil de ser executada na prática sendo que no presente trabalho foi feita a quantificação de proteínas oxidadas por EROs geradas durante o evento isquêmico. Pela análise dos produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) foi possível perceber que a isquemia/reperfusão aumenta consideravelmente a quantidade dessas proteínas oxidadas e que o tratamento com

G-CSF foi capaz de diminuir significativamente a formação desse mesmo tipo de proteína.

Na busca pelo entendimento da fisiopatologia da isquemia/reperfusão renal nota-se que vários mecanismos entrelaçados existem e que favorecem o dano renal. A reperfusão por si mesma não é garantia de que haverá retorno à condição de normalidade porque ela inicia os eventos que são responsáveis pela lesão de reperfusão. Uma variável crucial a ser considerada para a proteção é o tempo ao qual o órgão é exposto à isquemia, sendo que quanto menor esse tempo, menores os danos isquêmicos. Uma segunda variável é a deposição de colágeno nas regiões cortical e medular do rim como consequência do efeito inflamatório desse tipo de lesão, sendo que uma menor deposição de colágeno garante uma maior preservação das estruturas envolvidas na função renal. A terceira variável é a redução do número de células apoptóticas sendo que foi observado que o G-CSF é capaz de reduzir a ativação de células para o estado apoptótico e assim atenuar os efeitos deletérios desse tipo de lesão sobre as células renais. Como última variável tem-se a redução do total de proteínas oxidadas, redução essa provocada pelo G-CSF, uma vez que o evento isquêmico é capaz de gerar maior quantidade de espécies reativas de oxigênio. O somatório dos efeitos protetores do G-CSF no modelo experimental de isquemia/reperfusão renal apontam para um futuro promissor do fármaco na terapêutica das lesões isquêmicas renais encontradas na prática clínica.

6. CONCLUSÃO

Após a análise das informações geradas nesse estudo foi possível concluir que o G-CSF restaurou os valores de creatinina e uréia plasmática dos animais do grupo IR-GCSF para valores próximos aos dos animais SHAM. O tratamento com G-CSF reduziu a deposição de colágeno, principalmente na região medular, o que ajudou a preservar a função renal dos animais submetidos a IR. Através do efeito anti-apoptótico do fármaco, houve redução do número de células apoptóticas, reduzindo assim a extensão da lesão isquêmica provocada pela IR. Assim como, a redução da formação de espécies reativas de oxigênio no grupo IR-GCSF comprovado indiretamente pela diminuição da formação de produtos avançados de oxidação de proteínas quando comparado ao grupo IR. Dessa forma o G-CSF se apresenta como uma potencial opção terapêutica nos casos de isquemia/reperfusão renal.

7. REFERÊNCIAS

Altintas R, Parlakpınar H, Beytur A, Vardi N, Polat A, Sagir M, Odabas GP Protective effect of dexpanthenol on ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. **Kidney Blood Press Res** 2012 36:220–230

Araújo W.M., Júnior S.T., Costa R.S., Ferreira R.A., Pozza M.L., Mazzeto AVALOS B. R. (1996) Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. **Blood** 88:761–777.

Aydin Z, van Zonneveld AJ, de Fijter JW, et al.,. New horizons in prevention and treatment of ischaemic injury to kidney transplants. **Nephrol Dial Transplant** 2007; 22:342.

Bagshaw SM, George C, Bellomo R for the ANZICS Database Management Committee. Changes in the incidence and outcome for early acute kidney injury in a cohort of Australian intensive care units. **Crit Care** 2007; 11:R68

Basile DP, Fredrich K, Chelladurai B, Leonard EC, Parrish AR. Renal ischemia reperfusion inhibits VEGF expression and induces ADAMTS-1, a novel VEGF inhibitor. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2008; 294(4):F928–F936.

Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. **Kidney Int**. 2007; 72(2):151–156.

Beavo JA, Nucleotide Phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. **Physiol Rev**. 1995; 75:725-43

Begley CG, Lopez AF, Nicola NA, Warren DJ, Vadas MA, Sanderson CJ, et al.,. Purified colony-stimulating factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive microassay for colony-stimulating factors. **Blood**. 1986; 68(1):162-6.

Bonegio R & Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension** 2002; 11: 301–308.

Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. **J Am Soc Nephrol**. 2003; 14 (8):2199-210

Calvert J.W., Zhou C., Nanda A. & Zhang J.H. 2003. Effect of hyperbaric oxygen on apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. **J. Appl. Physiol**. 95(5):2072-80.

Chandraker A, Takada M, Nadeau KC, Peach R, Tiney NL, Sayegh MH. CD28-b7 blockade in organ dysfunction secondary to cold ischemia/reperfusion injury. **Kidney Int**. 1997; 52 (6) 1678-1684

Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. **Molec Aspects Med**. 1993; 14:191-7.

Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW: Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. **J Am Soc Nephrol** 16: 3365– 3370, 2005

Cotran R.S., Kumar V. & Collins T. 2000. **Robins: Patologia estrutural e funcional**. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, p.1-26

Daemen MA, van't Veer C, Denecker G, et al. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. **J Clin Invest** 1999; 104:541.

Dagher PC, Herget-Rosenthal S, Ruehm SG, Jo S-K, Star RA, Agarwal R, Molitoris BA: Newly developed techniques to study and diagnose acute renal failure. **J Am Soc Nephrol** 14: 2188–2198, 2003

Davenport A, Hopton M, Bolton C. Measurement of malondialdehyde as a marker of oxygen free radical production during renal allograft transplantation and the effect on early graft function. **Clin Transplant**. 1995; 9:171-5

de Jonge ME, Huitema AD, Rodenhuis S, Beijnen JH. . Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. **Clin Pharmacokinet** 2005;44(11):1135-64

Dekel B, Shezen E, Even-Tov-Friedman S, Katchman H, Margalit R, Nagler A, Reisner Y: Transplantation of human CD34+CD133+ hematopoietic stem cells into ischemic and growing kidneys suggests role in vasculo- genesis but not

Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol** 2006; 17:1503.

DiBartola S.P. 1997. Abordagem clínica e avaliação laboratorial da afecção renal, p.2355-73. In: Etiinger S.J. & Feldman E.C. (Eds), **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. Editora Manole, São Paulo.

Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, Bonventre JV: Res- toration of tubular epithelial cells during re- pair of the postischemic kidney occurs inde- pendentlly of bone marrow-derived stem cells. **J Clin Invest** 2005; 115: 1743–1755.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry of hydroxynonenal, malonedialdehyde and related aldehydes. **Free Radic Biol Med**. 1991; 11:81-128.

Evora P.R.B., Pearson P.J., Seccombe J.F. & Schaff H.V. 1996. Atualização: Lesão de isquemia e reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. **Arqs Bras. Cardiol**. 4(66):239-245.

Fang TC, Alison MR, Cook HT, Jeffery R, and Wright NA, Poulosom R: Proliferation of bone marrow-derived cells contributes to re- generation after folic acid-induced acute tu- bular injury. **J Am Soc Nephrol** 2005; 16: 1723–1732.

Ferrer I, Planas AM. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. **J Neuropathol Exp Neurol**. 2003; 62(4):329-39.

Filler G, Bökenkamp A, Hofmann W, Le Bricon T, Martinez-Brú C, Grubb A. Cystatin C as a marker of GFR - history, indications, and future research. **Clin Biochem.** 2005; 38:1–8.

Finco D.R. 1995. Urinary protein loss, p.211-215. In: Osborne C.A. & Finco D.C. (Eds), **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Editora Williams and Wilkins, Philadelphia.

Fondevila C., Busuttill R.W. & Kupiec-Weglinski J.W. 2003. Hepatic ischemia/reperfusion injury-a fresh look. **Exp. Molecul. Pathol.** 74(2):86-93.

Forterre S., Raila J. & Schweigert F.J. 2004. Protein profiling of urine from dogs with renal disease using Protein Chip analysis. **J. Vet. Diagn. Invest.** 16:271-277.

Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. **Kidney Int.** 2004; 66(2): 486-491

Granger DN, Korthuis RJ. Physiological mechanisms of post- ischemic tissue injury. **Annu Rev Physiol** 1995;57:311e32.

Gupta M, Kovar A, Meibohm B. The clinical pharmacokinetics of phosphodiesterase-5 inhibitors for erectile dysfunction. **J Clin Pharmacol.** 2005; 45: 987-1003

Guyton AC. **Tratado de fisiologia médica**. 9ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 1997.

Halloran PF, Homik J, Goes N, Lui SL, Urmson J, Ramassar V, et al.,. “The injury response”: a concept linking nonspecific injury, early rejection and long term transplant outcomes. **Transplant Proc** 1997;29:79e81.

Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, et al.,. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. **Nat Med.** 2005; 11(3):305-11.

Heyman SN, Rosenberger C, Rosen S. Experimental ischemia-reperfusion: biases and myths - the proximal vs. distal hypoxic tubular injury debate revisited. **Kidney Int.** 2010; 77(1):9-16.

Hosgood SA, Bagul A, Kaushik M, Rimoldi, Gadepalli RS, Nicholson ML. Application of nitric oxide and carbon monoxide in a model of renal preservation. **Br J. Surge**, 2008; 95: 1060-7

Hoste EAJ, Schurges M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem? **Crit Care Med** 2008; 36 (4 suppl): S146-51

Hu B, Yasui K. Effects of colony-stimulating factors (CSFs) on neutrophil apoptosis: possible roles at inflammation site. **Int J Hematol.** 1997; 66(2):179-88.

Hu H, Che ´reau C, Gobeaux C, et al., Clopidogrel protects from cell apoptosis and oxidative damage in a mouse model of renal ischemia-reperfusion injury. **J Pathol** 2011; 225:265.

Iwasaki M, Adachi Y, Minamino K, Suzuki Y, Zhang Y, Okigaki M, Nakano K, Koike Y, Wang J, Mukaide H, Taketani S, Mori Y, Takahashi H, and Iwasaka T, Ikehara S: Mobilization of bone marrow cells by G-CSF res- cues mice from cisplatin-induced renal failure, and M-CSF enhances the effects of G-CSF. **J Am Soc Nephrol** 2005; 16: 658– 666

Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Virrey CS, Marshall VC, Tange J. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. **Transplantation.** 1983; 35:198-204.

Jeong GY, Chung KY, Lee WJ, Kim YS, Sung SH. The effect of a nitric oxide donor on endogenous endothelin-1 expression in renal ischemia-reperfusion injury. **Transplant Proc.**; 2004 36:1943-5

K Kettle AJ, Winterbourn CC. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. **Redox Rep** 1997; 3:3e15

Karadeniz Cerit K, Karakoyun B, Yuksel M, et al. The antifibrotic drug halofuginone reduces ischemia/reperfusion-induced oxidative renal damage in rats. **J Pediatr Urol** 2012.

Kelly CJ, Speirs A, Gould GW, Petrie JR, Lyall H, Connell JM. Altered vascular function in young women with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.** 2002;87(2):742-6.

Kelly KJ, Sutton TA, Weathered N, et al.,. Minocycline inhibits apoptosis and inflammation in a rat model of ischemic renal injury. **Am J Physiol Renal Physiol** 2004; 287:F760

Kennedy SE, Erlich JH. Murine renal ischemia reperfusion injury. **Nephrology** 2008;13:390e6.

Kerr M.G. 2003. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária: bioquímica clínica e hematologia.** Editora Roca, São Paulo, p.87-128.

Kribben A, Herget-Rosenthal S, Pietruck F, et al., [Acute renal failure—a review]. **Dtsch Med Wochenschr.** 2003; 128(22):1231–1236.

Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. The changing epidemiology of acute renal failure. **Nat Clin Nephrol** 2006; 2:364-377

Land W, Messmer K. The impact of ischemia/ reperfusion injury on specific and non-specific, early and late chronic events after organ transplantation. **Transplant Rev.** 1996; 10:108-11.

Levey AJ. Measurement of renal function in chronic renal disease. **Kidney Int** 1990; Vol. 38, No.1, (July 1990), pp. 167-184

Li, Y.; Wu, J.; Shou, Z.; He, Q.; Zhang, P.; Han, F.; Li, H.; Chen, J. Pretreatment with Granulocyte colony-stimulating factor attenuated renal ischaemia and reperfusion injury via activation of PI3/Akt signal pathway. **Nephrology**, 1-9, 2008.

Liangos O, Kolyada A, Tighiouart H et al. Interleukin-8 and acute kidney injury following cardiopulmonary bypass: a prospective cohort study. **Nephron Clin Pract** 2009; 113: c148–c154

Lin F, Cordes K, Li L, Hood L, Couser WG, Shankland SJ, Igarashi P: Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. **J Am Soc Nephrol** 2003; 14: 1188–1199

McGuigan J, Robertson S, Isles C. Life threatening hyperkalaemia with diarrhoea during ACE inhibition. **EmergMed J** 2005; 22:154-155

Mitch WE. Insuficiência renal aguda. In: Gildman L, Bennett JC. Cecil: **Tratado de Medicina Interna**. 21 ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2001

Nafar M, Parvin M, Sadeghi P, Ghoraishian M, Soleimani M, Tabibi A, Nouralizadeh A, Amir Khanlou S, Barzi F, Alipour B: Effects of stem cells and granulocyte colony stimulating factor in reperfusion injury. **Iran J Kidney Dis** 2010, 4:207-213

Newas MA, Oyekan AO. Vascular responses to endothelin-1, angiotensin-II, and U46619 in glycerol-induced acute renal failure. **J Cardiovasc Pharmacol**. 2001; 38: 569-77

Nishida M, Hamaoka K. How does G-CSF act on the kidney during acute tubular injury? **Nephron Exp Nephrol**, 2006; 104: e123-e128.

Paul LC, de Fijter J, Boom H. Prolonged cold ischemia, late graft dysfunction, and cyclosporine in renal transplantation. **Transplantation** 1999; 68(7): 925-926

Pincemail J, Delfraigne JO, Franssen C, Bonnet P, Deby-Dupont G, Pirenne J, Deby C, Lamy M, Limet M, Merisse M. Evidence for free radical formation during human kidney transplantation. **Free Radic Biol Med.** 1993; 15:343-8.

Pines M, Nagler A. Halofuginone: a novel antifibrotic therapy. **Gen Pharmacol** 1998; 30:445e50.

Price C.P., Newall R.G. & Boyd J.C. 2005. Use of protein:creatinine ratio measurements on random urine samples for prediction of significant proteinuria: A systematic. **Clin. Chemistry** 51(9):1-11.

Rubinstein I, Abassi Z, Milman F, Ovcharenko E, Coleman R, Winaver J, Better OS: Hyperbaric oxygen treatment improves GFR in rats with ischaemia/reperfusion renal injury: a possible role for the antioxidant/oxidant balance in the ischaemic kidney. **Nephrol Dial Transplant** 24: 428-36, 2009.

S.A., Alves P., Cologna A.J. & Martins A.C.P. 2002. Animal model of ischemic injury, and chlorpromazina protector effect, evaluate by TC-99M-MAG3 dynamic renal scan. **Acta Cirúr. Bras.** 17(3):15-19.

Sabbatini M, Uccello F, Serio V, Troncone G, Varone V, Andreucci M, Faga T, Pisani A: Effects of mycophenolate mofetil on acute ischaemia-reperfusion injury in rats and its consequences in the long term. **Nephrol Dial Transplant** 25: 1443-50,

Schrier RW, Wang W, Poole B, et al. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **J Clin Invest** 2004; 114:5.

Sener G, Sehirli O, Velioglu-Ogunc A, Cetinel S, Gedik N, Caner M, Sakarcan A, Yegen BC (2006) Montelukast protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Pharmacol Res** 54:65–71.

Stirling C, Houston J, Robertson S, *et al.* Diarrhoea, vomiting and ACE inhibitors: An important cause of acute renal failure. **J Hum Hypertens** 2003; 17: 419-423

Takano, H.; Qin, Y.; Hasegawa, H.; Ueda, K.; Niitsuma, Y.; Oshtsuka, M.; Komuro, I. Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. **J Mol Med**, 84: 185 – 193, 2006.

Tögel F, Isaac J, Westenfelder C: Hematopoietic stem cell mobilization-associated granulocytosis severely worsens acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1261–1267.

Villanueva S, Cespedes C, Gonzalez AA, et al. Effect of ischemic acute renal damage on the expression of COX-2 and oxidative stress-related elements in rat kidney. **Am J Physiol Ren Physiol** 2007; 292:F1364.

Waikar SS, Curhan GC, Wald R, McCarthy EP, Chertow GM. Declining mortality in patients with acute renal failure, 1998 to 2002. **J Am Soc Nephrol** 2006; 17:1143-1150

Wang Z, Schley G, Turkoglu G, et al. The protective effect of prolyl-hydroxylase inhibition against renal ischaemia requires application prior to ischaemia but is superior to EPO treatment. **Nephrol Dial Transpl** 2012; 27:929.

Welte K, Platzer E, Lu L, Gabilove JL, Levi E, Mertelsmann R, et al.,. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1985; 82(5):1526-30.

Williams P, Lopez H, Britt D, Chan C, Ezrin A, Hottendorf R. Characterization of renal ischemia- reperfusion injury in rats. **J Pharmacol Toxicol Methods**. 1997; 37:1-7

Witko-Sarsat, V.; Friedlander M.; Capeillere-Blandin, C.; Nguyen-Khoa, T. Nguyen, A.T.; Zingraff, J; Jungers, P.; Descamps-Latscha, B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.*, New York, v. 19, n, 5 p. 1304-13, 1996

Xue JL, Daniels F, Star RA, et al. Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001. **J Am Soc Nephrol** 2006; 17:1135-1142

Yamamoto T, Tada T, Brodsky SV, et al. Intravital videomicroscopy of peritubular capillaries in renal ischemia. **Am J PhysiolRenal Physiol**. 2002; 282(6):F1150–F1155.

Zhang, Y.; Woodward, V. K.; Shelton, J. M.; Richardson J. A.; Zhou, X. J.; Link, D.; Kielar, M. L, Jeyarajah, D. R.; Lu, C. Y. Ischemia- reperfusion induces G-CSF gene expression by renal medullary thick ascending limb cells in vivo and in vitro. **Am J Renal Physiol**, 286: F1193 – F1201, 2004



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 050/2013, relativo ao projeto de pesquisa intitulado "**Efeitos do G-CSF em modelo experimental de isquemia/reperfusão renal.**", que tem como responsável o (a) docente **Breno Valentim Nogueira**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 20/12/13.

Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA / UFES

Prof. Dr. Douglas Severo Silveira
CRMV-ES 0689/Matricula 01546810
Presidente CEUA-UFES

Vitória (ES), 20 de dezembro de 2013.