

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

ISABELA BASTOS BINOTTI ABREU DE ARAUJO

**ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE HIPÓXIA RENAL EM MODELO
DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO TRATADO COM FATOR
ESTIMULADOR DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS**

VITÓRIA

2014

ISABELA BASTOS BINOTTI ABREU DE ARAUJO

**ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE HIPÓXIA RENAL EM MODELO
DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO TRATADO COM FATOR
ESTIMULADOR DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS**

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

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães

VITÓRIA

2014

ISABELA BASTOS BINOTTI ABREU DE ARAUJO

**ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE HIPÓXIA RENAL EM MODELO DE
ISQUEMIA/REPERFUSÃO TRATADO COM FATOR DE ESTIMULADOR
COLÔNIA DE GRANULÓCITOS**

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 26 de Junho de 2014.

Profa. Dra. Christina Maeda Takyia.
Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Prof. Dr. Domink Lenz
Instituição: Universidade Vila Velha (UVV)

Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti
Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Co-orientador
Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães
Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo

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

VITÓRIA

2014

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, por toda proteção, amparo e por todo o amor.

À Universidade Federal do Espírito Santo, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e ao grupo do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR), pela oportunidade de cursar este mestrado, pelos auxílios financeiros e pelo projeto que me incentivou a pensar no futuro.

Às professoras Doutoras Christina Maeda Takyia e Adriana Madeira Álvares da Silva-Conforti pela gentileza em aceitar o nosso convite para apreciação do trabalho, e a esta última meu registro especial de carinho e respeito por todo o trabalho na área da HIF, que agora é minha paixão.

Aos professores Doutores Breno Valentim Nogueira e Marco Cesar Cunegundes Guimarães por me aceitarem no laboratório, pelas lições a respeito de trabalho em equipe e principalmente por permitirem que eu estudasse esta nossa proposta tão inovadora. Meus agradecimentos, respeito e reconhecimento.

Aos colegas do laboratório que tanto ajudaram na elaboração das amostras, nas longas horas de microtomia e, claro, nos momentos da diversão. E um obrigado especial aos meninos que foram essenciais: Christiane Facco, Ingrid Augusto, Thaísa Santos, Wanderson Keijok, Lohayne Simões, Tadeu Caliman, Jairo Oliveira e ao queridíssimo cirurgião de pequenos animais, Vinicius Rodrigues.

Às técnicas do departamento de Morfologia: Lucienne Bessoni e Sueli Broseguini pelas ajudas ao meu desespero e também às descontrações.

Aos novos amigos que foram conquistados durante esta caminhada: Carolina Mayumi, Daniela Camporez, Lucas Maia, Marcelo Santos, Gustavo Amorim,

Eduardo Passamai, Marcela Nagib, Ludimila Forechi, Rebeca Machado, Cláudia Torres.. Foi um prazer conhecê-los! E pena que é pouco espaço para demonstrar o carinho que tenho por todos.

Aos antigos, mas não menos importantes, amigos que torceram e agüentaram toda choramingação: Gabriela Cavati, Gabriela Tonini, Renato Gracciano, Suzanny Mendes, Lumena Chaves, Ingrid da Fonseca, Geiza Louredo, Rodolpho Cassani, Diogo Ortolan e a mais alguns que com certeza esqueci os nomes! Mas saibam, amo todos e sem vocês teria sido sem graça esta jornada.

Aos professores que tanto me incentivaram desde sempre: Fabiane Intra, Edson Paiva, Cristiane Krüger, Giuliano Capucho, Érika Takagi; e aos recém conhecidos que foram tão solícitos quando eu desesperava: ao Marcos Pacheco pelas caronas e também pelas consultorias, e por extensão à fofa da Paula; à Flávia Errera pelo apoio e torcida tão sincera; ao Dominik Lenz (especialmente pelas vezes que eu ligava sem lembrar que era feriado, final de semana ou muito tarde da noite! Agradeça à Denise também pela compreensão), à Paula Vassallo pelas oportunidades; ao Hélder Mauad e à Márcia Cunha, este casal tão simpático e gentil; ao querido Dumith Chequer, que foi minha inspiração à pesquisa; e ao Dr. Georg Breier, que me aceitou e ajudou a pensar no meu futuro doutorado, junto, novamente, com o muitíssimo querido Dr. Lenz.

Às queridas Kárita e Katarina, por todo carinho, gentileza e profissionalismo admirável durante os atendimentos intermináveis e, claro, todo carinho.

Aos meus pais que não somente ajudaram em tudo durante estes dias difíceis, mas deram todo o suporte para que eu continuasse pesquisando, ao meu irmão Renato que nos amamos a nossa maneira e ao meu pequeno Luca "Luquinha": vocês são minha essência. Aos meu tios, primos e avós que sentem orgulho de ter uma futura mestre. Amo todos!

E dedico ao meu querido e recém-falecido tio Zé, que foi tão impulsionador quanto qualquer outro, e a minha eterna e saudosa Vovó Rita.

Enfim, a todos que contribuíram, minha sincera gratidão e meu carinho.

“Science goes where your mind imagine it” (Judah Folkman)

"I do not think there is any thrill that can go through the human heart like that felt by the inventor as he sees some creation of the brain unfolding to success..

Such emotions make a man forget food, sleep, friends, love... Everything."

(Nikola Tesla)

RESUMO

ARAUJO, I. B. B. A. **ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE HIPÓXIA RENAL EM MODELO DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO TRATADO COM FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS**, 2014, 94f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Espírito Santo.

O rim demonstra uma capacidade singular em reparar-se após danos locais, no entanto, depois de acometido, as chances de desenvolvimento de lesões renais elevam-se. A patofisiologia da isquemia/reperfusão (IR) é complexa porque há ocorrência simultânea de danos celulares e inflamação. O decréscimo na quantidade de oxigênio requer um sistema capaz de evitar seus efeitos prejudiciais e uma maquinaria molecular HIF (*Hypoxia Inducible Factor*), um complexo, atua como fator de transcrição de diversos genes desde os da regulação da proliferação celular e apoptose até a sinalização para angiogênese. O Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (G-CSF) é uma glicoproteína conhecida pela sua capacidade de promover a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células estimulando a recuperação aos efeitos advindos da IR. Com o intuito de observar as influências dessas proteínas foi realizada uma análise semi-quantitativa de amostras renais submetidas ou não à IR, usando-se descrições microscópicas morfológicas e imuno-histoquímicas, com os cálculos e gráficos estatísticos foram feitos no *software* GraphPad Prism[®]. Das análises morfológicas, constatou-se que as lesões características de IR foram observadas em espécimes não tratados: bolhas em epitélio tubular; vacuolização citoplasmática, distalzação tubular e congestão luminal. De forma análoga, foi encontrada nos tratados, contudo em estágios menos avançados e em animais controle, não foi houve esta diferença tissular. As análises de microscopia eletrônica demonstraram alteração na barreira filtrante com concomitante perda de outras características glomerulares. Aos animais controle foi

observada a arquitetura típica, ao passo que para os animais tratados notou-se conservação da barreira. A presença de HIF-1 α nos rins contralaterais demonstrou-se significante quando comparadas às amostras isquêmicas e tratadas ($p < 0,05$). Já a ocorrência da mesma proteína em rins isquêmicos não apresentou qualquer diferença. Analisando-se a proteína VEGF foi comprovado que em rins contralaterais não há diferença estatística, contudo nos rins esquerdos há significância entre os três grupos ($p < 0,05$). Já a correlação entre estas duas proteínas não se mostrou estatisticamente significante. Em relação às atividades de proliferação e morte celulares, todos os três grupos foram significantes entre si ($p < 0,05$). Ao que concerne o tratamento, foi demonstrada a atividade protetora do medicamento e uma possível interação molecular com a HIF, enquanto que a ativação desta proteína corrobora sua rota metabólica já previamente descrita.

Palavras-chave: Isquemia/reperfusão renal, hipóxia, angiogênese, G-CSF, proliferação e morte celular.

ABSTRACT

ARAUJO, I. B. B. A. **IMMUNOHISTOCHEMISTRY ANALYSIS OF KIDNEY HYPOXIA IN ISCHEMIC/REPERFUSION MODEL TREATED WITH GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR**, 2014, 94f. Master's dissertation – Universidade Federal do Espírito Santo.

The kidney demonstrates a natural ability to repair itself after damage locations, however, after affected the chances of developing kidney damage increases. The pathophysiology of ischemia/reperfusion (IR) is complex because there are simultaneous occurrence of cell damage and inflammation. The decrease in amount of oxygen requires a system capable of avoiding its adverse effects and molecular machinery HIF (Hypoxia Inducible Factor), a complex, acts as a transcription factor for a number of genes since the regulation of cell proliferation and apoptosis by signaling to angiogenesis. The Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) is a glycoprotein known for its ability to promote the survival, proliferation and differentiation of cells stimulating the recovery effects resulting from the IR. In order to observe the influence of these proteins a semi-quantitative analysis of kidneys samples submitted or not to IR was performed using morphological microscopic descriptions and immunohistochemical, with statistical calculations and graphics were done in GraphPad Prism[®] software. Morphological analysis demonstrated characteristic IR lesions in untreated specimens: bubbles in tubular epithelium; vacuolization, tubular distalization and distal luminal congestion. Similarly, it was found in treated, but in less advanced stages and in control animals, there were no tissue differences. Analyses of electron microscopy showed changes in the filtering barrier with concomitant loss of glomerular other features. In control animals the typical architecture was observed, while for the treated animals was noted preservation of barrier. The presence of HIF-1 α in the contralateral kidneys showed

significant when compared with ischemic and treated samples ($p < 0.05$). The incidence of the same protein in ischemic kidneys showed no difference. Analyzing the VEGF protein was proven that in contralateral kidneys no statistical difference, however, in the ischemic kidney there is significance within the three groups ($p < 0.05$). The correlation between these two proteins was not statistically significant. In relation to cell proliferation, cell death activity, all three groups were statistically significant ($p < 0.05$). As regard the treatment was demonstrated the protective activity of the drug and possible molecular interaction with HIF, while activation of this protein confirms its metabolic pathway previously described.

Key words: renal ischemia/reperfusion, hypoxia, angiogenesis, G-CSF, cellular proliferation, cell death.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático de lesão por isquemia em células tubulares renais.....	17
Figura 2: Domínios das subunidades α e β da proteína da HIF-1.....	19
Figura 3: Sensor à oxigênio, expressão gênica e respostas adaptativas à hipóxia.	20
Figura 4: Formação da circulação funcional a partir de progenitores endoteliais....	22
Figura 5: Vias extrínseca e intrínseca da apoptose.....	24
Figura 6: Digrama simplificado ilustrando biomarcadores do ciclo celular.....	26
Figura 7: Representação esquemática da hematopoiese.....	27
Figura 8: Representação esquemática da via ativada por G-CSF.....	29
Figura 9: Determinação da intensidade integrada para os marcadores imunohistoquímicos citoplasmáticos, VEGF e HIF-1 α	44
Figura 10: Determinação da área celular ocupada por cada núcleo marcado em reações para a proteína de proliferação celular, Ki67, e células em estágio de morte, por TUNEL.....	45
Figura 11: Fotomicrografias comparativas de cortes em parafina do córtex renal de animais do grupo 1 (SHAM), coloração por H&E.....	48
Figura 12: Fotomicrografias comparativas de cortes em parafina do córtex renal de animais do grupo 2 (IR), coloração por H&E.....	50
Figura 13: Fotomicrografias comparativas de cortes em parafina do córtex renal de animais do grupo 2 (IR), coloração por Tricrômico de Gômori.....	51

Figura 14: Fotomicrografias comparativas de cortes em parafina do córtex renal de animais do grupo 3 (IR+GCSF), coloração por H&E	53
Figura 15: Fotomicrografias comparativas de cortes em parafina do córtex renal de animais do grupo 3 (IR+GCSF), coloração por Tricrômico de Gômori.....	54
Figura 16: Eletromicrografias demonstrando parte da barreira de filtração glomerular.....	56
Figura 17: Fotomicrografias de marcações por HIF-1 α e valores de sua expressão (intensidade integrada) em rins contralaterais.....	57
Figura 18: Fotomicrografias de marcações por HIF-1 α e valores de sua expressão (intensidade integrada) em rins isquêmicos.....	58
Figura 19: Fotomicrografias de marcações por VEGF e valores de sua expressão de (intensidade integrada) em rins contralaterais.....	59
Figura 20: Fotomicrografias de marcações por VEGF e valores de sua expressão de (intensidade integrada) em rins isquêmicos.....	60
Figura 21: Gráficos de correlação entre os marcadores citosólicos HIF-1 α e VEGF dos rins isquêmicos dos três grupos.....	61
Figura 22: Fotomicrografias de núcleos positivamente marcados pela técnica de TUNEL e sua respectiva área em processo de morte celular, em rins isquêmicos	62
Figura 23: Fotomicrografias de núcleos positivamente marcados por Ki67 e sua respectiva área em processo de proliferação celular, em rins isquêmicos.....	63

LISTA DE SIGLAS

- HIF** Fator Indutor de Hipóxia-1 (do inglês *Hypoxia Inducible Factor*)
- ARNT** Receptor nuclear translocador aril hidrocarbono (do inglês *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*)
- bHLH-PAS** Fatores de transcrição Hélice-Alça-Hélice (do inglês *basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim*)
- ODD** domínio de Degradação Dependente de Oxigênio (do inglês *Oxygen-Dependent Degradation*)
- PHD** Domínio Prolil Hidroxilase (do inglês *Prolyl Hydroxylase Domain*)
- pVHL** Proteína von Hippel-Lindau
- FIH** Fator Inibidor da HIF (do inglês *Factor Inhibitor of HIF*)
- VEGF** Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*)
- G-CSF** Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (do inglês *Granulocyte Colony Stimulating Factor*)
- PCNA** Proteína de Proliferação Celular Associada ao Núcleo (do inglês *Proliferation Cell Nuclear Antigen*)
- TBST** Solução Salina de Tris com Tween (do inglês *Tris Buffered Saline with Tween*)
- IHQ** Imuno-histoquímica
- DPX** *p-xylene-bis (N-pyridinium bromide)*
- DAB** Diaminobenzidina-tetrahidrocloro (do inglês *3,3'-Dimaminobenzidine*)
- TUNEL** Marcação de região terminal mediado por deoxinucleotidil transferase dUTP (do inglês *TdT-mediated dUTP nick end labeling*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO	16
2.1 Aspectos da isquemia e reperfusão tecidual renal.....	16
2.2 Hipóxia.....	18
2.3 Hipóxia e Angiogênese	21
2.4 Hipóxia e Morte e Proliferação Celular	23
2.5 Hipóxia e uso de Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (G-CSF) 	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Considerações Éticas.....	31
4.2 Características da amostra e cuidados dispensados aos animais	31
4.3 Constituição dos grupos de animais	32
4.4 Procedimentos cirúrgicos.....	33
4.5 Eutanásia e coleta dos espécimes renais isquêmicos.....	34
4.6 Estudo morfológico	35
4.6.1 Fixação das amostras renais	35
4.6.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	41
4.7 Análise Semi-quantitativa	43
4.7.1 Análise Morfológica Descritiva	43
4.7.2 Análise dos Marcadores Imuno-Histoquímicos.....	43
4.8 Análise Estatística	46

5. RESULTADOS.....	47
5.1 Cirurgia	47
5.2 Descrição Morfológica por Microscopia de Luz.....	47
5.3 Descrição Morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão	55
5.4 Expressão Citoplasmática de HIF-1α.....	57
5.4.1 HIF-1α em Rim Contralateral	57
5.4.2 HIF-1α em Rim Isquêmico	58
5.5 Expressão Citoplasmática de VEGF	59
5.5.1 VEGF em Rim Contralateral.....	59
5.5.2 VEGF em Rim Isquêmico.....	60
5.6 Correlação entre HIF-1α e VEGF.....	61
5.7 Morte Celular detectada por TUNEL.....	62
5.8 Proliferação Celular por Ki67.....	63
6. DISCUSSÃO	64
6.1 Progressão das Alterações Morfológicas	64
6.2 Hipóxia, sua Proteína Indicativa e Angiogênese.....	68
6.3 Hipóxia, G-CSF, Efeitos proliferativos e Morte Celular	71
7. CONCLUSÕES	72
8. REFERÊNCIAS.....	73
9. ANEXO.....	92

1. INTRODUÇÃO

O rim controla o centro de parâmetros homeostáticos corporais tais como balanço eletrolítico, pH sanguíneo, conteúdo de água, além de, obviamente, eliminar substâncias tóxicas e produtos finais metabólicos (DEVARAJAN, 2006).

Qualquer alteração que cause a perda de nutriente e/ ou oxigênio, por mais breve que seja, é o suficiente para desequilibrar eventos moleculares intrínsecos de cada célula renal. Eventos isquêmicos, diretos - interrupção circulatória - ou indiretos - resposta secundária a outros órgãos, causam um ambiente hipóxico e alteram o funcionamento de proteínas (AN et al., 2013).

A primeira resposta é a modificação do sítio catalítico de proteínas sensíveis à normóxia, as prolin hidroxilase 2 (PHD2), e como adaptação celular, o Fator Induzível por Hipóxia (HIF), especificamente sua subunidade citoplasmática - 1α , cujo acúmulo no citosol, posterior migração para o núcleo com demirização com a subunidade β , formam o complexo ativador de hipóxia (HIF-1 $\alpha\beta$) (SEMENZA, 2014).

O complexo atua como fator de transcrição de diversos genes, os quais estão envolvidos em processos como: inflamação; função de matriz; aumento de oxigênio disponível por aumento na população celular responsável – via eritropoietina – e metabolismo de ferro; tônus vascular; redução no consumo de oxigênio promovendo o metabolismo anaeróbico e inibição do ciclo de Krebs; regulação da proliferação celular e apoptose; e provavelmente a rota mais importante, a sinalização para angiogênese (SEMENZA et al., 1997).

Uma vez acionada a rota de angiogênese, via produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e conjugação com seu respectivo receptor (VEGFR), a mudança na arquitetura tissular é efeito da ativação de cascatas em diferentes rotas, resultando em *up-regulation* de genes envolvidos em mediação de degradação celular, remodelamento de matriz, migração e posterior proliferação celular,

ocasionando aumento na permeabilidade vascular e sobrevivência à hipóxia (SENGER; DAVIS, 2011).

A sobrevivência depende não somente da capacidade do tecido em ativar determinadas cascatas moleculares, mas também da célula em retornar ao estado proliferativo. Embora haja nas diferentes fases do ciclo celular (G_0 , G_1 , S, G_2 e M) diversas proteínas, a pKi-67 exerce fator preponderante como indicador de atividade mitótica (SCHOLZEN et al., 2002).

Como a maioria dos tecidos sofre um constante processo de renovação celular graças ao equilíbrio entre proliferação e morte das células, a apoptose é também um mecanismo de defesa, que é ativado sempre que ocorre uma invasão por agentes patogênicos, ou ainda quando as células sofrem ação indireta por outros agentes.

O fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) é uma glicoproteína produzida principalmente por células da linhagem monócitos/ macrófago, e clinicamente é utilizado em situações de neutropenia severa congênita (TOUW, 2007).

Também foi demonstrado o efeito protetor do G-CSF sobre a lesão tubular renal induzida em camundongos. 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; TÖGEL et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2012).

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

2. REVISÃO

2.1 Aspectos da isquemia e reperfusão tecidual renal

A oxigenação de todos os tecidos depende do balanço entre a disponibilidade de oxigênio e seu respectivo consumo, e um decréscimo qualquer na quantidade de oxigênio requer um sistema capaz de evitar seus efeitos prejudiciais (ZEPEDA et al., 2013).

A lesão de reperfusão é um termo usado para descrever as alterações, funcionais e estruturais, as quais se tornam aparentes durante o restabelecimento do fluxo após um período de isquemia. Quando o fluxo sanguíneo tissular é interrompido, uma série de processos metabólicos e enzimáticos é afetada (BONVENTRE; WEINBERG, 2003).

As reservas de ATP são rapidamente reduzidas, há um acúmulo de lactato, a célula torna-se acidótica e são ativadas proteases intracelulares. Além disso, o aumento da permeabilidade capilar causa edema tissular, tendo em vista a reversibilidade deste processo relaciona-se diretamente com a duração da isquemia.

Embora o benefício da reperfusão seja inquestionável, a restauração do aporte de oxigênio, as lesões se exacerbam pelo fato dessas células já estarem metabolicamente comprometidas (LAMEIRE; VANHOLDER, 2004; FEITOSA et al., 2005).

Proeminentes alterações morfológicas incluem intumescimento celular, perda de bordas em escova de túbulos proximais, áreas focais de dilatação tubular bem como debris celulares em seu lúmen, perda celular e algumas áreas de regeneração celular (RACUNSEN, 2001). Como efeitos deletérios, temos: necrose de células irreversivelmente lesadas, acentuado edema celular (*cell swelling*) e restauração não uniforme do fluxo para todas as porções do tecido (Figura 1) (DEVARAJAN, 2006).

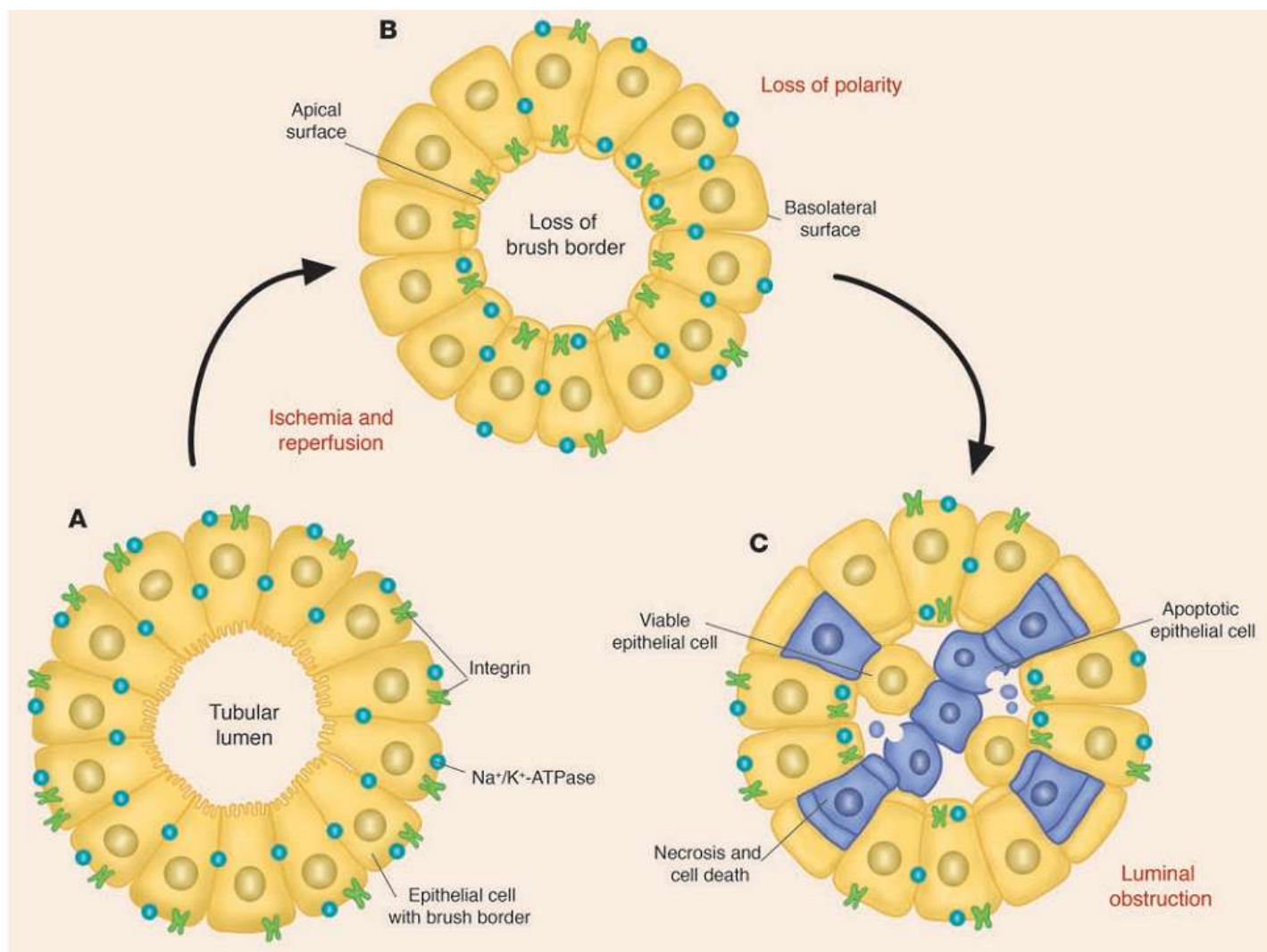


Figura 1: Desenho esquemático de lesão por isquemia e reperfusão em células tubulares renais.

Ocorridos os eventos de isquemia e reperfusão (A→B), mudanças morfológicas ocorrem em túbulos proximais, incluindo perda de polaridade, de borda em escova e redistribuição de integrinas e bomba de sódio e potássio (Na⁺/K⁺-ATPase) para a porção apical celular (B). Cálcio e espécies reativas de oxigênio podem interagir nesta via de mudanças morfológicas em adição à subsequente morte celular resultado tanto de processo necrótico quanto apoptótico. Assim, ambas as células, viáveis ou não, são expelidas para o lúmen tubular formando redes de aglomerados celulares causando obstrução luminal (C) e contribuindo para redução da taxa de filtração glomerular. Figura modificada de Schreir et al., 2004.

2.2 Hipóxia

A hipóxia é um componente importante de várias doenças, incluindo acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, doenças renais agudas, doenças inflamatórias e a progressão de tumores sólidos (RANTANEN et al., 2008; HÖLSCHER et al., 2011; KUNZE et al., 2012). Esta baixa tensão de oxigênio tem sido demonstrada em vários tecidos normais, inflamados e tumorais (SEMENZA 1999; DEHNE; BRUNE, 2009) e pode prejudicar o metabolismo, uma vez que células necessitam de suprimentos adequados de oxigênio para a obtenção de energia (SEMENZA, 2012a).

Desta forma, há uma necessidade de controle da homeostase do oxigênio para manutenção da fisiologia e bioquímica celular, essenciais para a sobrevivência da célula, assim, as concentrações de oxigênio devem ser rigidamente controladas (SEMENZA, 2009; SEMENZA, 2012b).

Neste contexto, células de mamíferos desenvolveram uma maquinaria molecular para determinar a sobrevivência celular sob condições de hipóxia ou de entrada em apoptose (BRUIC; MCKNIGHT, 2001; EPSTEIN et al., 2001). Um mecanismo básico de detecção de baixa tensão de O₂ preservado é a via responsiva dependente de oxigênio, a qual compreende o Complexo HIF (*Hypoxia Inducible Factor*). Este complexo transcricional é um heterodímero proteico composto por duas subunidades, HIF-1 α e HIF-1 β , esta também conhecida como ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), ambas pertencentes à família de proteínas bHLH-PAS (*basic helixloop-helix-Per-ARNT-Sim*) (KAELIN; RATCLIFFE, 2008).

A subunidade HIF-1 β é constitutivamente expressa, com níveis de mRNA e de proteína constantes na célula, ao passo que a expressão da subunidade HIF-1 α é constantemente suprimida na presença de O₂ (SEMENZA et al., 1997). Sua transcrição e síntese proteica são constitutivas e particularmente não são afetadas pelo teor de oxigênio (WANG; SEMENZA, 1993), porém a presença do oxigênio atua

na regulação da HIF-1 α por modificações pós-traducionais, como hidroxilação e ubiquitinação sendo sinalizada para degradação via sistema proteossomal (BRAHIMI-HORN et al., 2005).

A proteína HIF-1 α possui domínios como o PAS (*Per-ARNT-Sim*), o qual interage com o domínio PAS da HIF-1 β para dimerização (CHOWDHURY et al., 2008). Existem também outros dois domínios localizados na porção N-terminal (*N-TAD*) e na C-terminal (*C-TAD*), os quais atuam na ativação da transcrição gênica. Tanto na porção N-terminal como na C-terminal existe o importante domínio ODD (*Oxygen-dependent degradation*) que atua na mediação da estabilidade da HIF-1 α de acordo com a disponibilidade de oxigênio, uma vez que neste domínio estão localizados sítios para a hidroxilação dependente de oxigênio (Figura 2) (PUGH et al., 1997; RUAS et al., 2002).

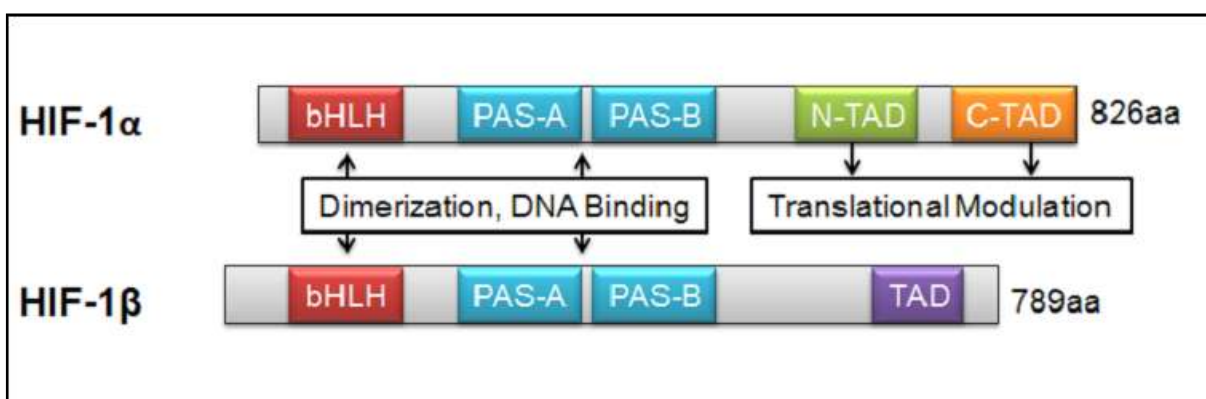


Figura 2: Domínios das subunidades α e β da proteína HIF-1.

Os domínios bHLH e PAS da HIF-1 α mediam a dimerização com a proteína HIF-1 β e a ligação do complexo ao DNA. Os domínios N-TAD e C-TAD são requeridos para hidroxilação da proteína HIF-1 α e também para a ativação da transcrição gênica. As interações proteína-proteína são indicadas por setas para os dois sentidos. Modificado de Sitkovsky; Lukashev (2005).

Em geral, a abundância de subunidade 1 α é primariamente regulada pela família de prolil hidroxilases chamadas PHD1, PHD2 e PHD3 (BRACKEN et al., 2003; KAELIN; RATCLIFFE, 2008), porém existe uma gama de outras proteínas com funções reguladoras da HIF-1 α (DEHNE; BRUNE, 2009) como a OS-9, SSAT-2, Fator Inibidor da HIF (FIH) (BAEK et al., 2005).

Sob condições de normóxia, a proteína PHD utiliza o oxigênio como co-fator enzimático e transfere um grupo hidroxila para o domínio ODD da HIF-1 α , ligando o radical hidroxilil aos resíduos de prolina 482 e 564 (SEMENZA, 2009; KAELIN; RATCLIFFE, 2008). Após a hidroxilação, há reconhecimento deste conjunto proteico

pela proteína supressora tumoral von Hippel-Lindau (pVHL), que recruta um complexo ubiquitina ligase para marcar a proteína HIF-1 α e promover sua degradação proteossomal pelo complexo 26S (Figura 3A) (BAEK et al., 2005). Algumas proteínas podem ainda estabilizar a supressão da expressão da HIF-1 α por meio de interações proteicas como a proteína OS-9 que se liga à PHD e à HIF-1 α facilitando a hidroxilação. Já a proteína SSAT2 estabiliza a interação entre a pVHL e a HIF-1 α , facilitando sua ubiquitinação (SITKOVSKY; LUKASHEV, 2005) e o FIH, no resíduo de asparagina, hidroxila a porção C-terminal da HIF-1 α impedindo sua interação com co-ativadores essenciais (CBP/p300) para a atividade transcricional do complexo HIF-1 (SITKOVSKY; LUKASHEV, 2005; KAELIN; RATCLIFFE, 2008).

Em condições de hipóxia, a atividade da proteína PHD decresce e a degradação da HIF-1 α é reduzida. Uma vez estabilizada, esta é translocada para o núcleo e se dimeriza com a subunidade HIF-1 β , formando o complexo HIF-1 transcricionalmente ativo, o qual irá reconhecer a região genômica Elementos Responsivos à Hipóxia, chamada HRE (*hypoxia response elements*), ativando a transcrição de seus diversos genes alvo (Figura 3B) (SEMENZA, 1999; SCHARTE, 2003).

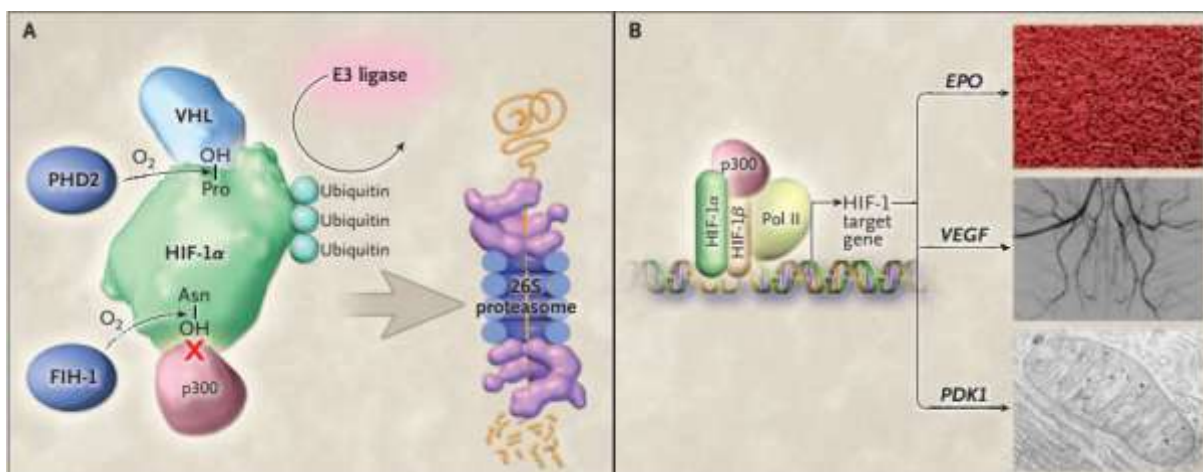


Figura 3: Sensor à oxigênio, expressão gênica e respostas adaptativas à hipóxia.

(A) Em células devidamente oxigenadas, o domínio prolil-hidroxilase 2 (PHD2) usa o oxigênio para hidroxilar o fator induzível por hipóxia-1 α (HIF-1 α) no resíduo de prolina (Pro-OH). A proteína Von Hippel-Lindau (pVHL) liga-se à HIF-1 α , sítio já hidroxilado anteriormente, e recruta a ubiquitina E3 ligase. O complexo de poliubiquitinação da HIF-1 α sinaliza a proteína para degradação pelo complexo proteossomal 26S. O fator inibidor da HIF (FIH) também usa a molécula de oxigênio para hidroxilar a HIF-1 α no resíduo de asparagina (Asn-OH). Uma vez hidroxilado este sítio, não é possível a complexação da proteína coativadora p300, e assim evita a ativação da transcrição gênica. **(B)** Em condições de hipóxia, as reações de hidroxilação dos resíduos Pro e Asn são inibidas, e a HIF- α (este processo também estende-se à isoforma HIF-2 α) rapidamente acumula-se no citosol, e dimeriza-se com a subunidade nuclear HIF-1 β , recrutando a p300, ligando-se ao sítio elemento responsivo à hipóxia (HER). Assim, é ativada a transcrição, pela RNA polimerase II (RNA Pol II), de centenas de genes, tais como o da eritropoietina (EPO) – hormônio que estimula a produção de eritrócitos; o do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) – fator angiogênico que estimula a formação de vasos sanguíneos; e da piruvato desidrogenase quinase-1 (PDK1), que inibe a conversão do piruvato a acetil coenzima A, por oxidação mitocondrial (eletromicrografia à direita e abaixo). Adaptado de Semenza, 2011.

2.3 Hipóxia e Angiogênese

Em essência, o processo de angiogênese pode ser definido como uma resposta do organismo à falta de oxigênio nos tecidos, podendo ocorrer em diversas situações, fisiológicas ou patológicas, do desenvolvimento embrionário ao crescimento tumoral (COULTAS et al., 2005; SENGER; DAVIS, 2011).

A diminuição da perfusão renal e da oferta de oxigênio durante a isquemia leva a alterações vasculares e tubulares. As alterações vasculares decorrem da vasoconstrição pré-glomerular (secundária à ativação do feedback tubuloglomerular), da perda da autorregulação renal, do aumento da atividade simpática, da resposta exacerbada a agentes vasoconstrictores como endotelina, adenosina e angiotensina II, e da resposta diminuída a agentes vasodilatadores com acetilcolina, óxido nítrico e bradicinina.

Além disso, pela diminuição da oferta de oxigênio existe lesão estrutural das células musculares lisas e principalmente endoteliais. Células endoteliais lesadas expressam moléculas de adesão como P-selectina, ICAM (*intercelluar adhesion molecule-1*), as quais liberam mediadores inflamatórios como TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), interleucinas acarretando prejuízo à microcirculação e leucotaxia. O infiltrado inflamatório é responsável pela produção de outros mediadores inflamatórios, amplificando a lesão da microcirculação e consequente lesão celular (BONVENTRE; YANG, 2011; SCHRIER et al., 2004).

Em condições de hipóxia, as células respondem produzindo fatores de crescimento (VEGF – fator de crescimento endotelial vascular) e citocinas (IL -8) que sinalizam às células endoteliais para saírem de seu estado basal, se desprenderem da parede do vaso e iniciarem um processo de migração para a produção de novos vasos sanguíneos. Este é um processo coordenado, que em apenas algumas células endoteliais respondem ao estímulo de VEGF; pois se todas as células respondessem simultaneamente, haveria um colapso local do vaso sanguíneo com possíveis danos ao tecido (COULTAS et al., 2005; PUGH; RATCLIFFE, 2008).

Dois subtipos de células endoteliais respondem ao estímulo por VEGF e coordenam o processo migratório: as células endoteliais de ponta (*tip cells*), responsáveis pela organização do processo angiogênico, e as células endoteliais que seguem as células de ponta (*stalk cells*). O processo de migração das células endoteliais termina quando ramificações migrando de lados opostos encontram-se através das células *tip*, reestabelecendo o fluxo sanguíneo, a homeostase no tecido e o estado quiescente das células endoteliais (Figura 4) (HSU et al., 2014).

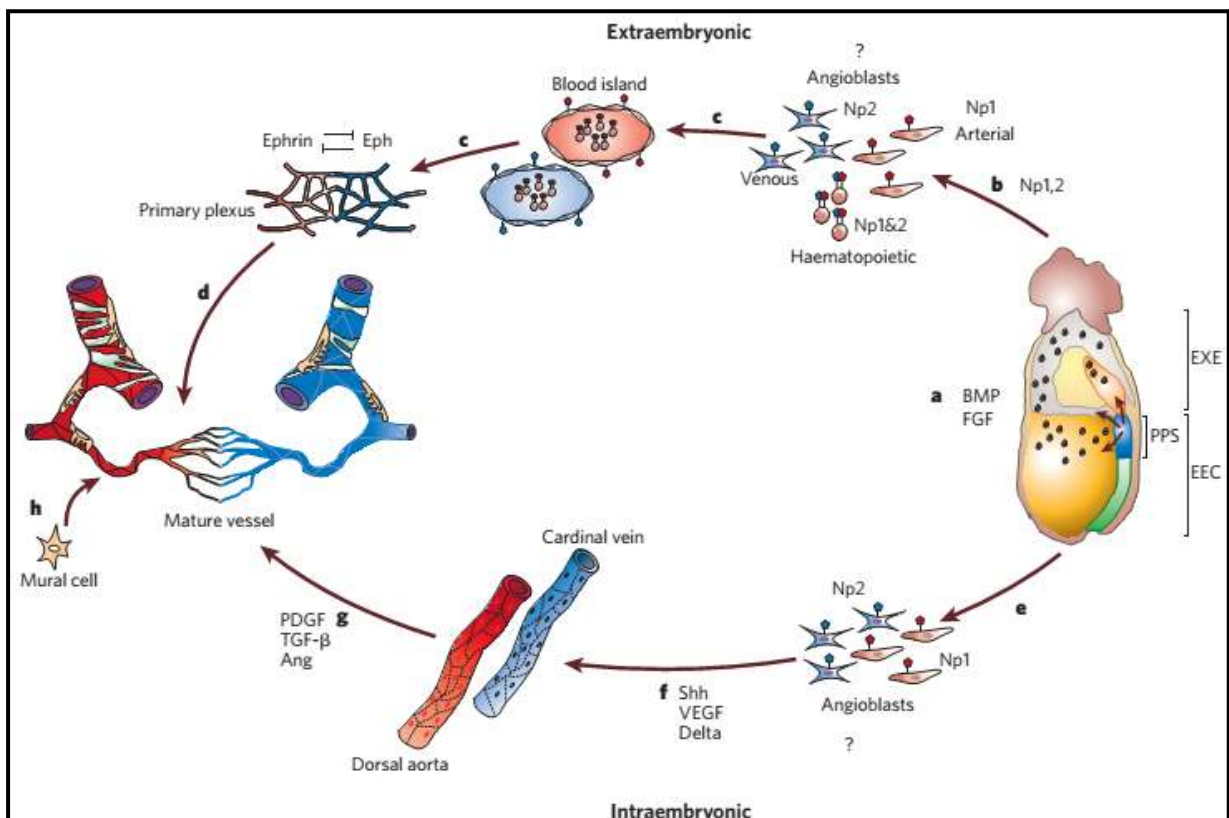


Figura 4: Formação da circulação funcional a partir de progenitores endoteliais.

(a) Progenitores vasculares aparentam ser responsivos ao fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) e à proteína óssea morfogênica 4 (BMP4), na linha posterior primitiva (PPS), atuando como receptor para o fator de crescimento endotelial-2 (VEGFR-2)/Flk-1 nas células mesodermiais. (b) Células positivas para Flk-1, na linha primitiva, são capazes de originarem tanto sangue quanto endotélio (hemangioblastos), porém são restritas as suas respectivas funções (hematopoéticas ou angiogênicas) após migrarem para os locais da camada extra-embriônica (ectoderme extra-embriônica – EXE, saco vitelínico e alantoide) e intra-embriônicas (ectoderme embriônica – EEC). (c) No saco vitelínico, estas progenitoras agregam-se em ilhas de sangue e então fundem-se para gerar o plexo capilar primário. (d) Este plexo é remodelado ao longo das veias intra-embriônicas e formam uma circulação madura (g). (e) Angioblastos intra-embriônicos migram para vias diferentes antes de (f) agregarem-se diretamente na aorta dorsal ou veia cardinal, sem o plexo intermediário. (g) As veias primárias (plexo capilar, aorta dorsal e veia cardinal) então remodeladas, juntas com o plexo extra-embriônico, formam a vasculatura madura, sendo direcionadas pelas vias de sinalização de VEGF, Notch, angiopoietinas, receptores Tie. (h) Células murais (pericitos e células musculares lisas) proliferam-se e se diferenciam em resposta aos diversos fatores: fator de crescimento transformador-β (TGF-β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Ang: angiopoietinas; Eph: receptor da família Eph; Shh: Sonic hedgehog; Np: neuropilina.

Figura adaptada de Coultas et al., 2005.

2.4 Hipóxia e Morte e Proliferação Celular

A lesão de isquemia/reperfusão potencializa a inflamação pela produção de citocinas e leva o aumento da expressão das moléculas de adesão por células endoteliais hipóxicas (ANAYA-PRADO et al., 2002), as quais recrutam leucócitos polimorfonucleares para o tecido reperfundido (FAN et al., 1999).

A ativação da via do complemento pode contribuir para a lesão de IR, anticorpos IgM se depositam em tecidos isquêmicos e quando o fluxo é restabelecido as proteínas do complemento se ligam a esses anticorpos causando lesão celular e inflamação (REIDMAN; WARD, 2003).

Na morte celular, após a lesão de isquemia e reperfusão, coexistem a necrose e a apoptose. Na necrose, as membranas perdem sua integridade e o conteúdo intracelular geralmente extravasa, causando inflamação no tecido adjacente. Morfologicamente, as células necróticas apresentam um aumento da eosinofilia, o citoplasma pode apresentar vacúolos após a digestão das organelas citoplasmáticas; as alterações nucleares podem englobar a cariólise, cariorréxis e picnose, sendo que a picnose também ocorre na apoptose.

Na apoptose a membrana plasmática da célula permanece intacta e sua estrutura é alterada sendo fagocitada rapidamente, sem extravasamento do seu conteúdo e sem desencadeamento de reação inflamatória. As características morfológicas são: redução do tamanho celular, condensação da cromatina na periferia, formação de bolhas citoplasmáticas e corpos apoptóticos (DEVARAJAN, 2006).

Dentre as características moleculares mais específicas estão a degradação das proteínas, envolvendo a ativação de cisteíno-proteases chamadas caspases e a decomposição do DNA, em grandes pedaços e subsequente clivagem internucleossomal por endonucleases, em múltiplos de 180 a 200 pares de bases (VAUX; SILKE, 2003).

A apoptose é induzida por uma cascata de eventos moleculares que são iniciados por vários mecanismos e culminam na ativação das caspases. O início da apoptose ocorre por sinais de duas vias, extrínseca e intrínseca, que convergem para ativar as

caspsas. A via extrínseca, deflagrada por estímulos externos, através de receptores específicos na superfície celular, chamados de receptores de morte celular, que têm entre os mais descritos, os da família de receptores do fator de necrose tumoral e da proteína Fas (CD95). A via intrínseca, ou mitocondrial, é ativada por estímulos internos de estresse intracelular, tais como, lesão do DNA, perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas (Figura 5).

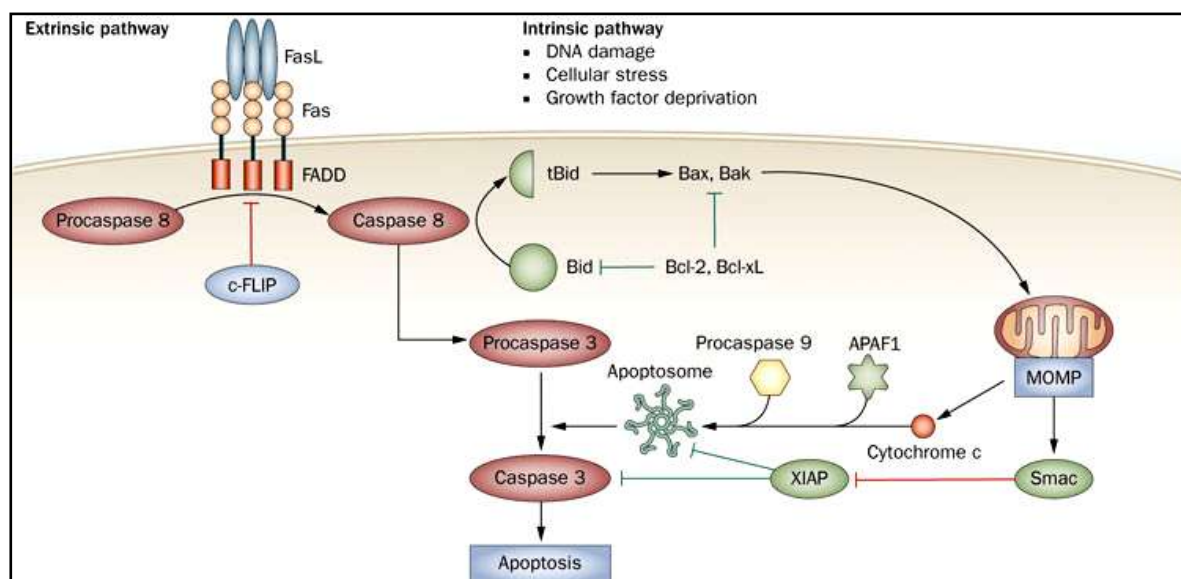


Figura 5: Vias extrínseca e intrínseca da apoptose.

A indução da apoptose pela via extrínseca depende do complexo FADD/ caspase 8 DISC formado pela ligação com os receptores de morte celular (Fas, TRAIL ou TNFR1). A caspase 8 ativada, gerada a partir da DISC eficiente, pode ser inibida pelas altas concentrações de c-FLIP e por vezes é suficiente para induzir a ativação da apoptose via caspase 3. Entretanto, a comunicação molecular cruzada entre as vias intrínseca e extrínseca pode ocorrer por meio da clivagem da Bid, que leva a ativação das proteínas pró-apoptóticas BH3 contendo Bcl-2, família de proteínas da Bax e Bak, intimamente relacionada na formação de MOMP. A via intrínseca da apoptose depende da formação da MOMP e do apoptossoma, resultando em ativação da caspase 3, etapa irreversível, e, por fim, a apoptose. Esta via é mais relacionada à regulação pelo balanço entre proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas da família Bcl-2, as quais incluem Bcl-2, Bax, Bak, e também entre a atividade de proteínas inibidoras da apoptose.

Abreviações: APAF1 – fator apoptótico protease de ativação 1; DISC – complexo de sinalização morte induzida; FADD – proteína Fas-associada com domínio para morte; cFLIP – proteína inibitória celular FLICE-like; Fas-L – Fas ligante; MOMP – permeabilização da membrana externa mitocondrial; Smac – ativador secundário da caspase derivado da mitocôndria; TRAIL – fator ligante de necrose tumoral relacionado à indução de apoptose; TNFR1 – receptor do fator de necrose tumoral 1; XIAP – proteína inibidora de apoptose ligada ao X.

Figura adaptada de Ramaswamy et al., 2011.

Alguns pesquisadores relatam que após a lesão de isquemia e reperfusão, em modelos experimentais, ocorre uma indução da proliferação celular como parte do processo de reparo que se segue à lesão de isquemia e reperfusão (DEVARAJAN, 2006; GUO; CANTLEY, 2010).

A proliferação celular pode ser definida como o aumento do número de células resultante da complementação do ciclo celular que engloba uma cascata de eventos, processados de maneira ordenada, assegurando a duplicação fiel dos componentes celulares em uma seqüência lógica e a divisão destes componentes em duas células filhas (LEVINE et al., 1994).

Existem pelo menos quatro fases distintas no ciclo celular: o período antes da síntese de DNA (G1), a fase de síntese de DNA (S), o período após a replicação do DNA (G2) e a fase mitótica (M) que culmina na divisão celular (RABENHORST et al., 1994).

A aplicação de marcadores de proliferação celular, a exemplo o uso do PCNA (antígeno nuclear de células proliferativas) e do Ki- 67 (antígeno nuclear associado ao ciclo celular), asseguram não só uma medida mais acurada da quantidade de células em proliferação, mas por estarem expressas nos vários estágios do ciclo celular, como a possibilidade de investigação de maneira simplificada, rápida e pouco dispendiosa (ARISAWA et al., 1999).

O anticorpo Ki-67 reconhece um antígeno que está associado ao núcleo celular e que, em células continuamente ciclizantes, é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 (GERDES et al.,1984), com uma vida média de uma hora e que sua expressão antigênica aumenta com a progressão do ciclo celular, alcançando um pico nas fases G2 e M (SCHOLZEN; GUERDES, 2000; SCHOLZEN et al., 2000) (Figura 6).

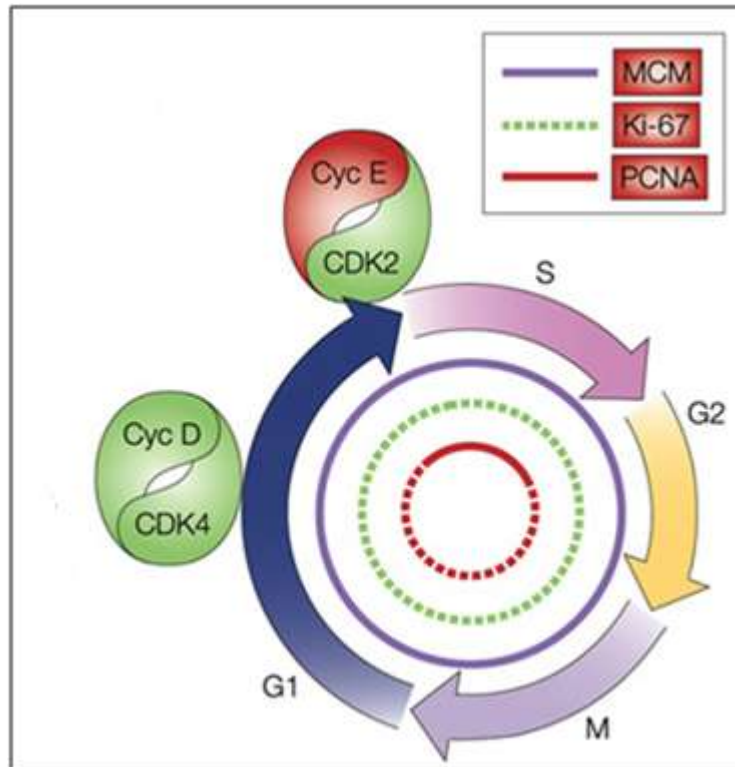


Figura 6: Digrama simplificado ilustrando biomarcadores do ciclo celular.

Após o estímulo mitogênico, a ciclina D (Cyc D) se complexa com as CDK4 e CDK6, as quais atuam regulando a fase G1. Posteriormente, outras moléculas são requeridas para a progressão do ciclo celular, exemplo: ciclina E (Cyc E), para replicação do DNA - proteínas de manutenção micromossômica (MCMs), síntese de de DNA - antígeno nuclear associado à proliferação celular (PCNA) e de controle celular - inibidores de ciclina dependente de cinase (CKIs). A complexação da Cyc E com a CDK2 é essencial para a transição de G1 para a fase S.

A PCNA é um fator auxiliar para a DNA polimerase e abundante na fase S, ao passo que a Ki67 é detectada em todas as fases do ciclo celular, embora sua função exata não é inteiramente esclarecida durante o processo de divisão.

Figura adaptada de Baldwin et al., 2003.

2.5 Hipóxia e uso de Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (G-CSF)

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., 2007). Existem vários membros dessa família denominados como fatores estimuladores de colônias (CSFs), pois foram detectados inicialmente por sua capacidade de promover o crescimento *in vitro* de colônias de células hematopoéticas da medula óssea (AVALOS, 1996; SANGANALMATH et al., 2011) (Figura 7).

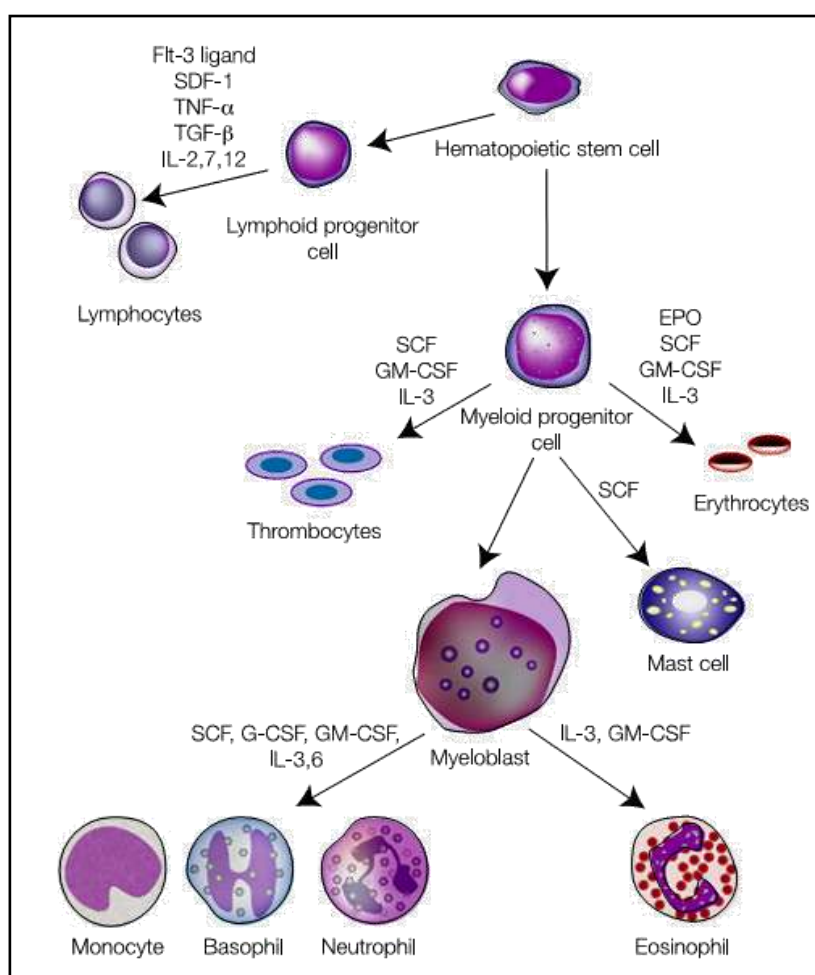


Figura 7: Representação esquemática da hematopoiese.

Células-tronco pluripotentes e progenitoras da medula óssea se dividem e diferenciam passando às etapas de formação de células vermelhas, plaquetas e células brancas.

Figura adaptada de Sanganalmath et al., 2011.

Dentre os mais conhecidos membros desse grupo, encontram-se o GM-CSF (fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos), o M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos) e G-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos) (AVALOS, 1996).

Em princípio, os CSFs poderiam regular o número de vários tipos de células sanguíneas inteiramente pelo controle seletivo da sobrevivência celular dessa via. Há evidências de que o controle da sobrevivência celular, na verdade, representa uma parte central na regulação do número de células sanguíneas, assim como ocorre para hepatócitos e muitos outros tipos de células (TAKANO et al., 2007).

O G-CSF é um polipeptídeo de 20 kDa produzido por vários tipos celulares, como células endoteliais vasculares (LENHOFF et al., 1999) e fibroblastos (FIBBE et al., 1988; KAUSHANSKY et al., 1988). Recentemente verificou-se que também é produzido por miócitos cardíacos (VANDERVELDE et al., 2007), células renais (LI et al., 2006) e sistema nervoso (SCHNEIDER et al., 2005).

Sob este ponto de vista, 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; GUO; CANTLEY, 2010; NOGUEIRA et al., 2012).

Estudos recentes mostraram que no sistema hemopoiético, as mutações que inibem a morte celular por causarem a produção excessiva do inibidor intracelular de apoptose Bcl2 promovem o desenvolvimento de câncer em linfócitos B. E também que há redução precoce da apoptose em animais que receberam tratamento com G-CSF, evidenciando significativa redução na apoptose de células do endotélio vascular (IWANAGA et al., 2004; HARADA et al., 2006) (Figura 8).

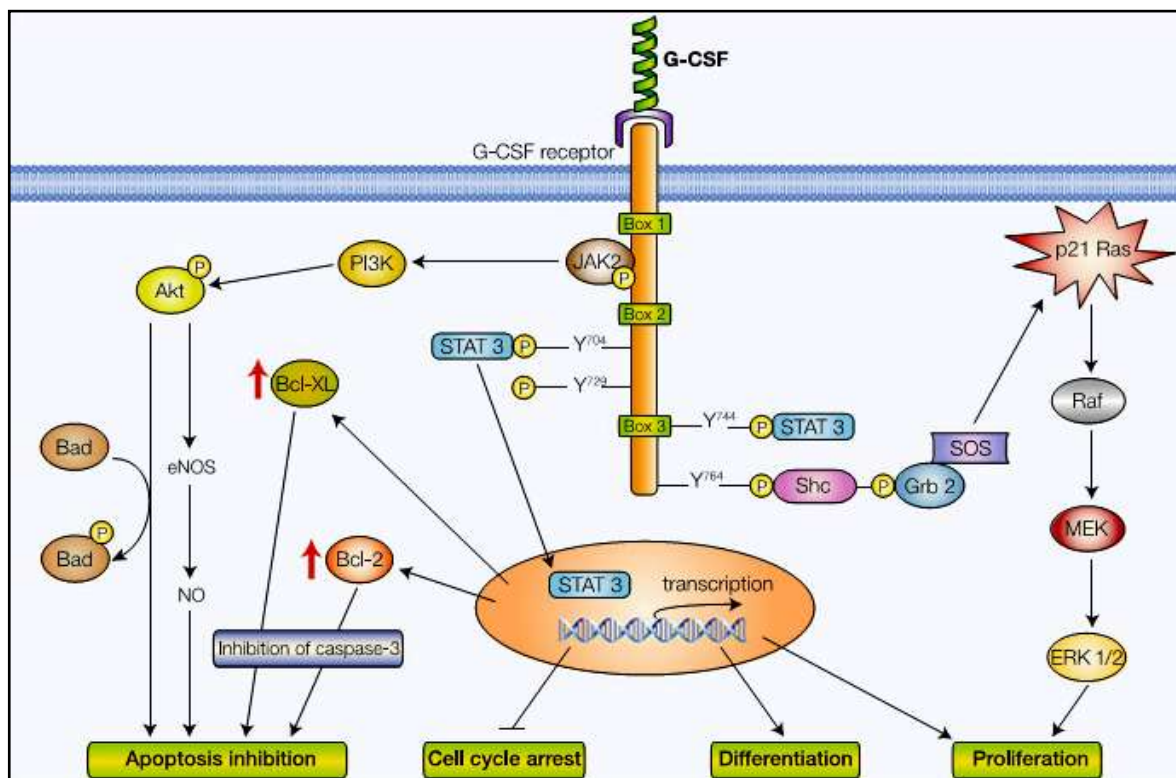


Figura 8: Representação esquemática da via ativada por G-CSF.

Sinalização intracelular desencadada pela complexação do G-CSF e seu receptor cuja ativação ativa as cascatas de JAK/STAT, MAPK e PI3-K/Akt, as quais estão envolvidas em inibição da apoptose, sobrevivência e diferenciação celulares.

Figura adaptada de Sanganalmath et al., 2011.

Outro efeito que tem sido relacionado ao G-CSF é a angiogênese. Em experimentos feitos *in vitro*, a exposição ao G-CSF mostrou migração de células endoteliais e formação de estruturas vasculares (LEE et al., 2005). Junto a isso, ainda foi evidenciado o potencial farmacológico do G-CSF frente à neutropenia idiopática, mielossupressão induzida por quimioterapia e recuperação da aplasia após transplante de medula óssea (TOUW, 2007).

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, possam ser identificados mecanismos fisiopatológicos e respostas fisiológicas às manipulações medicamentosas (HEYMAN et al., 2010).

Desta maneira, a proposta deste estudo é observar as alterações morfológicas renais em ratos submetidos à isquemia e reperfusão por meio da oclusão da artéria renal esquerda, no que diz respeito aos parâmetros de expressão das proteínas HIF-1 α , VEGF, Ki67 e células em vias de morte celular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito protetor do Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (G-CSF) em lesão hipóxica no modelo de isquemia/reperfusão (IR) renal.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Verificar o efeito protetor do G-CSF frente às lesões teciduais após IR;
- II. Avaliar a via de sinalização oxigênio-dependente do Fator Induzível por Hipóxia-1 α (HIF-1 α) como resposta à lesão induzida pela IR e sua possível correlação com o G-CSF;
- III. Analisar o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) como após a lesão isquêmica;
- IV. Quantificar o número de células em processo de morte celular por marcação da fragmentação do DNA;
- V. Quantificar o número de células sob efeito proliferativo celular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

Trata-se de um estudo experimental prospectivo que teve seu projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/ UFES, protocolo nº 050/2013 - ANEXO), seguindo os princípios éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e pela lei nº. 11.794/2008 que regulamenta o uso de animais em pesquisa no Brasil.

4.2 Características da amostra e cuidados dispensados aos animais

Foram utilizados 30 ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 150 e 200g, provenientes do Biotério de Produção Animal do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da UFES.

As gaiolas foram mantidas em ambiente climatizado (20 a 22°C) com ventilação e luminosidade (12 horas claro e 12 horas escuro) controladas. Os animais receberam ração própria para rato (Labina®, Purina) e água *ad libitum* em todas as fases do experimento.

4.3 Constituição dos grupos de animais

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em três grupos de acordo com a submissão ou não ao protocolo de isquemia/reperfusão (IR) (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição dos ratos em grupos de acordo com o protocolo (n=30)

Grupos	Número de animais	Órgão coletado	Momento da coleta do espécime	Número de tecidos coletados
1 - SHAM (falso operado)	10	Rim Direito	40 minutos após a cirurgia	n = 10
		Rim Esquerdo	3º dia posterior à cirurgia	n = 10
2 - IR (isquemia-reperfusão veículo)	10	Rim Direito	40 minutos após a cirurgia	n = 10
		Rim Esquerdo	3º dia posterior à cirurgia	n = 10
3 - IR-GCSF (isquemia-reperfusão tratado com G-CSF)	10	Rim Direito	40 minutos após a cirurgia	n = 8
		Rim Esquerdo	3º dia posterior à cirurgia	n = 8

Grupo 1 - controle (SHAM): Animais submetidos ao estresse do procedimento cirúrgico de isolamento arterial do rim esquerdo, os quais permaneceram nesta condição por 40 minutos, sem que houvesse constrição da artéria renal esquerda. Imediatamente ao final do tempo pré-estabelecido, realizou-se a nefrectomia do rim contralateral (direito).

Grupo 2 - Isquemia/ Reperfusão (IR): Animais submetidos ao procedimento cirúrgico de isolamento arterial do rim esquerdo, com constrição da respectiva artéria por 40 minutos. A nefrectomia do rim contralateral (direito) ocorreu posteriormente ao tempo determinado pelo protocolo experimental e a reperfusão sanguínea ocorria por 72 horas contínuas. A esse grupo foi administrada a solução veículo glicosada a 5%, por três dias consecutivos.

Grupo 3 - Isquemia/Reperusão tratado com Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (IR-GCSF): Animais submetidos ao procedimento cirúrgico de isolamento arterial no rim esquerdo, com constrição da respectiva artéria por 40 minutos. Subsequentemente à reperusão sanguínea, foi administrada a primeira dose de G-CSF, na concentração de 100 µg/kg via subcutânea, e posterior nefrectomia do rim contralateral. O tratamento com G-CSF (100 µg/kg/dia) foi mantido durante três dias consecutivos.

4.4 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram pesados (balança eletrônica) e anestesiados com solução composta por nove partes de cloridrato de cetamina (Quetamina-Vetnil[®]), na concentração de 10mg/ml, associada a uma parte de cloridrato de xilazina (Rompun[®] - Bayer), na concentração de 2g/ml, aplicados via intraperitoneal (IP), na dose de 1,0 ml/kg por animal.

Uma vez estabelecida a condição anestésica satisfatória, os ratos foram colocados em decúbito dorsal sobre mesa cirúrgica, apropriada para pequenos animais, com as patas fixadas para melhor imobilização. Imediatamente efetuou-se a tricotomia da região abdominal, seguida de antissepsia.

O procedimento cirúrgico consistiu em:

- incisão da camada epidérmica do animal, cuja extensão compreendeu do final do abdômen até próximo ao esterno, seguindo de maneira idêntica para o tecido muscular abdominal;
- acomodação dos órgãos viscerais para o lado direito/ contralateral, mantidos sobre uma gaze estéril embebida em solução salina, permitindo o acesso ao rim esquerdo, que uma vez livre para manuseio, houve isolamento dos

componentes do hilo renal: nervo, artéria e veia renais. Etapa necessária para que a constrição fosse feita de maneira adequada somente na artéria;

- a fim de simular o evento isquêmico: a constrição foi realizada usando-se fio de algodão perpassado pela artéria renal isolada e tracionada por pinça hemostática, a fim de garantir a parada do fluxo sanguíneo local. Ao fim do tempo estabelecido para isquemia, fez-se a retirada do fio constritor restabelecendo a reperfusão sanguínea local, para os animais dos grupos 2 e 3; ao passo que para os animais do grupo 1 todas as etapas do procedimento foram executadas, excetuando-se a constrição da artéria renal.

Todos os animais dos três grupos foram submetidos à imediata nefrectomia unilateral direita seguida de fixação da amostra renal contralateral para caracterização histológica e imuno-histoquímica (IHQ).

Ao final de cada procedimento cirúrgico, os animais foram acomodados em gaiolas individuais apropriadas, devidamente identificadas e havia ficha de anotação para acompanhamento individual dos animais.

4.5 Eutanásia e coleta dos espécimes renais isquêmicos

Os ratos foram submetidos à nova nefrectomia ao fim do 3º dia pós-operatório, para coleta do espécime renal esquerdo, seguido de eutanásia mediante sobredose de solução anestésica cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina. Uma parte do rim esquerdo foi fixada para estudo histológico convencional e a outra parte para análise morfológica ultraestrutural em microscopia eletrônica.

4.6 Estudo morfológico

4.6.1 Fixação das amostras renais

Os rins contralaterais foram usados como controle intrínseco dos rins remanescentes. Para ambos os espécimes foi aplicado o mesmo protocolo histológico: após nefrectomia, cada órgão foi longitudinalmente cortado e as distintas partes foram fixadas em dois diferentes tipos de solução.

Para análises em microscopia óptica (histoquímicas e imuno-histoquímicas), foi usada a solução de paraformaldeído a 4% tamponada em solução fosfato de sódio, pH 7,0; enquanto que para o estudo de microscopia eletrônica, usou-se solução Karnovsky – paraformaldeído a 1%, glutaraldeído a 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,2M.

Todos os procedimentos histológicos foram realizados no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR), do CCS/ UFES.

4.6.1.1 *Microscopia óptica*

4.6.1.1.1 Processamento histológico

Decorridas 48 horas após a fixação, as amostras identificadas foram alocadas em cassetes histológicos, para processamento histológico em um processador automático de tecidos – histotécnico (*LUPE®, Brasil - PT05*) em baterias de desidratação crescente em alcoóis (70%, 80%, 90% e 3 repetições de 100%), passagem em solução álcool-xilol (1:1), diafanização em xilol puro (3 repetições) e inclusão em parafina histológica. Todos os banhos duraram 1 hora cada, totalizando um protocolo de 12 horas de inclusão

O emblocamento do material foi realizado usando-se moldes histológicos de alumínio (dimensões 15 x 15 x 5 mm) e os blocos parafinizados foram armazenados em geladeira (4°C) até o momento da microtomia.

4.6.1.1.2 Cortes histológicos

Usando-se micrótomo rotativo manual (*Leica Biosystems, Germany*), foram montadas lâminas convencionais para histoquímica e lâminas silanizadas para IHQ (*Autofrost® - CancerDiagnostic, USA*) individualizada por espécime, as quais continham cortes de 4 µm de espessura. Uma vez preparada, a lâmina era armazenada em caixas histológicas, em freezer (-20°C), até a realização do protocolo de IHQ.

4.6.1.1.3 Colorações

Após retiradas do freezer, as lâminas foram mantidas em estufa a 65°C por 1 hora, a fim de desparafinizá-las. Em seguida, foram organizadas em acessórios de vidro (bercinhos) para coloração manual e início do processamento histoquímico.

A bateria de desparafinização química foi iniciada com o uso de xilol, por três sucessivas passagens, bateria de álcool PA e xilol (1:1) e três passagens em álcool PA – todos em tempos de cinco minutos cada. Em seguida, as lâminas foram lavadas por três minutos em água corrente e submetidas a dois procedimentos distintos de coloração. Hematoxilina-Eosina (HE) para análise morfológica geral descritiva e Tricômico de Gomori para análise descritiva específica de alterações de matriz extracelular.

Para coloração com HE, seguiu-se o protocolo de dez minutos em hematoxilina, trinta segundos em álcool-ácido, lavagem em água corrente por cinco minutos e passagem em eosina por dois minutos. Para coloração com Tricômico de Gomori, foi feita a passagem do material em hematoxilina por cinco minutos, lavagem em água corrente por cinco minutos e imersão das lâminas no corante por vinte minutos.

Posteriormente, as lâminas coradas com HE e Tricômico de Gomori foram submetidas à: lavagem em água corrente, passagem em álcool PA por três vezes, solução de álcool-xilol e baterias de xilol PA. Todas as passagens foram realizadas com o tempo de cinco minutos. A montagem final das lâminas foi feita em meio não-aquoso DPX [*p*-xylene-bis (N-pyridinium bromide)] (*Sigma-Aldrich, USA*).

4.6.1.1.4 Imuno-histoquímica (IHQ)

Após retiradas do freezer, as lâminas eram desparafinizadas em estufa a 65°C durante 24 horas, para início do protocolo. Em seguida, eram organizadas em acessórios de vidro (bercinhos) para coloração manual, até o momento da recuperação antigênica.

Concomitantemente, aquecia-se o tampão citrato, pH 6,0 (*Spring Bioscience*[®], *Germany*) em banho-maria, objetivando-se a temperatura entre 95 a 100°C, que uma vez alcançada, o bercinho era imerso na solução e permanecia por trinta minutos. Após esta etapa de recuperação, resfriava-se o conjunto tampão-lâminas, por dez minutos, à temperatura ambiente, seguida de lavagem em água deionizada.

Para a etapa seguinte, era feita a secagem individual de cada lâmina, demarcação dos cortes com caneta hidrofóbica (*Sigma-Aldrich, USA*), e bloqueio da peroxidase endógena, no escuro, com peróxido de hidrogênio 3%, em câmara úmida por dez minutos à temperatura ambiente. Seguia-se uma primeira lavagem com tampão de lavagem (TBST) por cinco minutos, bloqueio de proteínas endógenas (*Spring Bioscience*[®], *Germany*) por dez minutos e outra lavagem com TBST por dois tempos de três minutos cada.

Os anticorpos primários (VEGF, HIF-1 α e Ki67) foram diluídos em diluente de anticorpo comercial (*Spring Bioscience*[®], *Germany*) e incubados em câmara úmida à temperatura ambiente, no tempo e diluições conforme a Tabela 2.

Tabela 2: anticorpos primários usados em Imuno-hisotquímica.

Anticorpo	Descrição	Diluição	Tempo de incubação	Fabricante (n° catálogo)
VEGF	monoclonal	1:200	1 hora	Abcam (ab1316)
HIF-1 α	monoclonal	1:500	1 hora	Abcam (ab8366)
Ki67	monoclonal	1:100	1 hora e 30 minutos	Abcam (ab16667)

Decorrido o tempo de incubação, as lâminas foram lavadas em TBST, três tempos de três minutos cada e, para amplificar a visualização, foi aplicado o Polímero N-Histofine (*Nichirei, Japan*) conjugado com peroxidase durante trinta minutos, em câmara úmida. Seguiu-se uma última etapa de lavagem com TBST em três tempos de três minutos cada.

Para revelação da reação, foi utilizado o substrato-cromógeno diaminobenzidina-tetrahydrocloro (DAB líquido – *Spring Bioscience®*, *Germany*), preparado de acordo com as recomendações do fabricante, e mantido sobre o material por dez minutos, cujo excesso foi lavado durante cinco minutos em água corrente.

Para melhor detecção do marcador proteico, foi feita a contra-coloração com Hematoxilina de Harris durante trinta segundos, retirando-se o excesso do corante em água corrente e subsequente imersão das lâminas em água amoniacal, por um minuto, tornando o roxo mais azulado, facilitando a leitura da cor marrom.

Como etapa final do protocolo, fez-se a montagem das lâminas seguindo a ordem de desidratação dos tecidos em álcool PA (três passagens de dois minutos cada), passagem rápida em álcool-xilol (1:1) e em xilol (três passagens de dois minutos cada) e montagem em meio não-aquoso DPX (*Sigma-Aldrich, USA*).

Para controle negativo, omitiu-se o anticorpo primário, substituindo-o por diluente de anticorpo e os tecidos apresentaram somente a coloração azul, sem nenhuma marcação por DAB. Já para controle positivo, utilizou-se placenta humana para o VEGF, HIF-1 α e Ki-67.

4.6.1.1.5 Marcação de região terminal mediado por deoxinucleotidil transferase dUTP (TUNEL)

Após retiradas do freezer, as lâminas eram organizadas em acessórios de vidro (bercinhos) para coloração manual e mantidas em temperatura ambiente. Em seguida, eram submetidas a um pré-tratamento com uso de solução aquecida de tampão citrato, pH 6,0 (*Spring Bioscience*[®], *Germany*) em microondas, durante cinco minutos em potência média (380-450W). Após esta etapa, resfriava-se o conjunto tampão-lâminas, por cinco minutos, à temperatura ambiente, seguida de duas lavagens por solução de tampão fosfato (PBS) 0,1M.

Para a etapa seguinte, era feita a secagem individual de cada lâmina, demarcação dos cortes com caneta hidrofóbica (*Sigma-Aldrich*, *USA*). Seguia-se a aplicação da solução reativa de TUNEL (*Roche Diagnostics GmbH*, *Germany*), a qual consistia mistura solução de marcação com solução enzimática. O tempo de reação era de uma hora, em câmara úmida e escura, à temperatura ambiente. E seguiam-se três novas lavagens com PBS, um minuto cada.

Posteriormente, foi feita a aplicação do conversor POD (peroxidase - *Roche Diagnostics GmbH*, *Germany*), durante trinta minutos, em câmara úmida e no escuro à temperatura ambiente, em câmara úmida e no escuro. Outras lavagens com PBS foram realizadas, três tempos de três minutos cada.

Para revelação da reação foi utilizado o DAB líquido (*Spring Bioscience*[®], *Germany*), e mantido sobre cada espécime por dez minutos, cujo excesso foi lavado durante cinco minutos em água corrente.

Para melhor detecção, foi feita a contra-coloração com hematoxilina de Harris durante trinta segundos, retirando-se o excesso do corante em água corrente e subsequente imersão das lâminas em água amoniacal por um minuto.

Como etapa final do protocolo, fez-se a montagem das lâminas seguindo a ordem de desidratação dos tecidos em álcool PA (três passagens de dois minutos cada), passagem rápida em álcool-xilol (1:1) e em xilol (três passagens de dois minutos cada) e montagem em meio não-aquoso DPX (*Sigma-Aldrich, USA*).

Tanto para controle negativo quanto para o positivo foram usadas lâminas com amostra de placenta humana. Para o primeiro, foi aplicada somente a solução de marcação POD que, após todo processamento, o tecido apresentava somente a coloração azul, sem nenhuma marcação por DAB. Já para controle positivo, todos os passos descritos para a técnica de TUNEL foram executados.

4.6.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras, por animal, foram individualizadas em microtubos com solução Karnovsky, permanecendo por duas horas, à temperatura ambiente. Em seguida, foram armazenadas em 4°C até o dia seguinte para continuidade do processamento.

No dia subsequente, o material foi retirado da geladeira e mantido em bancada até atingir a temperatura ambiente. Era, então, submetido à lavagem em tampão cacodilato 0,1M, por 10 minutos, com três repetições.

Realizou-se a pós-fixação em solução de Tetróxido de ósmio 1% e Ferrocianeto de Potássio 1,25% (proporção de 1:1), durante uma hora, no escuro e em capela. Seguiu-se nova bateria de lavagem em tampão cacodilato 0,1M, uma vez por trinta minutos.

Outras etapas de lavagem foram realizadas: banhos em água destilada (três vezes, por trinta minutos cada), seguida de desidratação crescente em acetona (30%, 50%,

70%, 90%) uma vez cada por trinta minutos, e três repetições na concentração de 100%, por trinta minutos.

A infiltração no tecido pela resina sintética realizou-se à temperatura ambiente, em distintas baterias: mistura de acetona 100% e epon (2:1) durante doze horas, seguida de outra etapa de acetona 100% e epon (1:1) por seis horas, nova solução de acetona e epon (1:2) por doze horas, com troca por epon puro, doze horas, e uma substituição final por epon puro durante doze horas.

As amostras foram incluídas em resina pura, em forminhas apropriadas, mantidas em estufa à 60°C por um período de trinta e seis horas. Depois de polimerizados, os blocos foram seccionados em ultra-micrótomo (*RMC PowerTome, USA*). Cortes semi-finos (de 900nm de espessura) foram coletados e depositados em lâminas convencionais, as quais eram coradas com azul de toluidina 0,5%, analisadas ao microscópio óptico e fotodocumentadas a área cortical.

Os cortes ultrafinos (70nm) eram coletados em grades fendadas de cobre (*EMS, USA*) revestidas com formvar 0,5%, as quais passaram por contraste com acetato de uranila e citrato de chumbo durante quarenta e cinco e dez minutos, respectivamente. As grades foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL (*JEM-1400, USA*) para documentação.

4.7 Análise Semi-quantitativa

4.7.1 Análise Morfológica Descritiva

Para descrição morfológica, as lâminas de todos os animais foram analisadas em microscópio óptico convencional (*Carl Zeiss, Germany*) usando-se objetiva de 20x e, conforme aparecimento ou não de lesões ocorridas em processos isquêmicos, foram determinados os seguintes critérios de avaliação:

- Bolhas em porções apicais de epitélio tubular, fenômeno chamado de “*blebbing*”;
- Vacuolização citoplasmática, preferencialmente de túbulos proximais;
- Epitélio de túbulos proximal desnudado e achatado, denominado simplificação do epitélio tubular ou distalização;
- Células e/ ou núcleos celulares renais destacadas no lúmen tubular;
- Obstrução de luz de túbulos, preferencialmente em túbulos proximais.

4.7.2 Análise dos Marcadores Imuno-Histoquímicos

A leitura das lâminas foi realizada em fotomicroscópio óptico Olympus (*Olympus Corporation, Japan*) com câmera AxioCam (*Carl Zeiss MicroImaging, Germany*) acoplada, em objetiva de 40x com magnificação de 400x, sendo analisados 10 campos não consecutivos por lâmina.

A cada conjunto de fotos, imagens feitas pelo *software* AxioVision Imaging System 4.8 (*Carl Zeiss MicroImaging, Germany*), foi quantificada a intensidade predominante de marcação procedendo de forma distinta para os marcadores citoplasmáticos (VEGF e HIF-1 α) e nucleares (Ki67 e TUNEL) usando-se o programa CellProfiler e CellProfiler Analyst (*Imaging Platform, Broad Institute of MIT and Harvard, USA, KAMENSKY et al., 2011*).

Para os marcadores citoplasmáticos, foi realizada a determinação por intensidade integrada, medida em *pixel/ pixel* ou unidade arbitrária (ua), que consiste em somar todas as intensidades em *pixel* da foto e proceder a quantificação de cada cor, em função da predominância de uma cor sobre a outra.

O espectro do corante dos componentes celulares de interesse do núcleo (Hematoxilina – azul) e do marcador citoplasmático (DAB - marrom) eram posteriormente invertidos para escalas de cinza (Figura 9B e 5C, respectivamente). Assim mediu-se o quanto cada espectro contribuía para leitura, determinava-se a intensidade final combinada deste conjunto (Figura 9D) e então era dada uma tabela com os valores finais, em média e desvio padrão (REXHEPAJ et al., 2013).

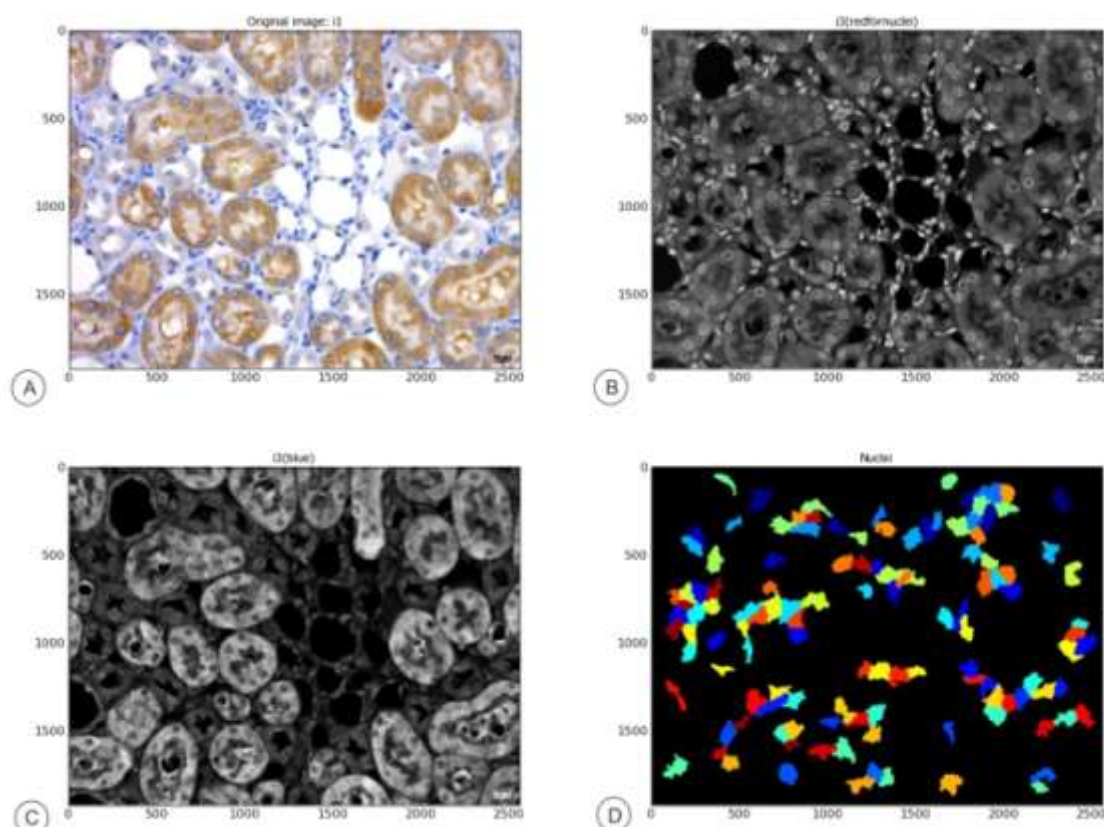


Figura 9: Determinação da intensidade integrada para os marcadores imunohistoquímicos citoplasmáticos, VEGF e HIF-1 α .

(A) Foto original reconhecida pelo programa, (B) inversão da coloração por Hematoxilina, nos núcleos, (C) inversão da coloração por DAB, nas regiões citosólicas, e (D) leitura da combinação espectral final.

Para os marcadores nucleares, o algoritmo programado usava-se do fator de formato (*format factor*) para examinar somente núcleos ovalados e cujo índice de separação compreendia o intervalo 0,35 a 1,0, garantindo que outros núcleos (a exemplo de células endoteliais) não fossem enquadrados nesta leitura. Desta forma, para quantificação dos núcleos, o programa procedia-se de forma similar a inversão de cores, porém destacava-se o marrom dos núcleos marcados *versus* o azul dos núcleos não marcados (Figura 10B). Foi, então, realizada uma estimativa de cada área celular (em porcentagem) ocupada por cada núcleo marcado, determinado pelo programa em *outlines* (Figura 10C), com exclusão de áreas não celulares, artefatos (Figura 10D). Assim mediu-se o quanto cada núcleo marcado contribuía para leitura dentro da população celular existente e então era dada uma tabela com os valores finais, em média e desvio padrão (Figura 10) (REXHEPAJ et al., 2013).

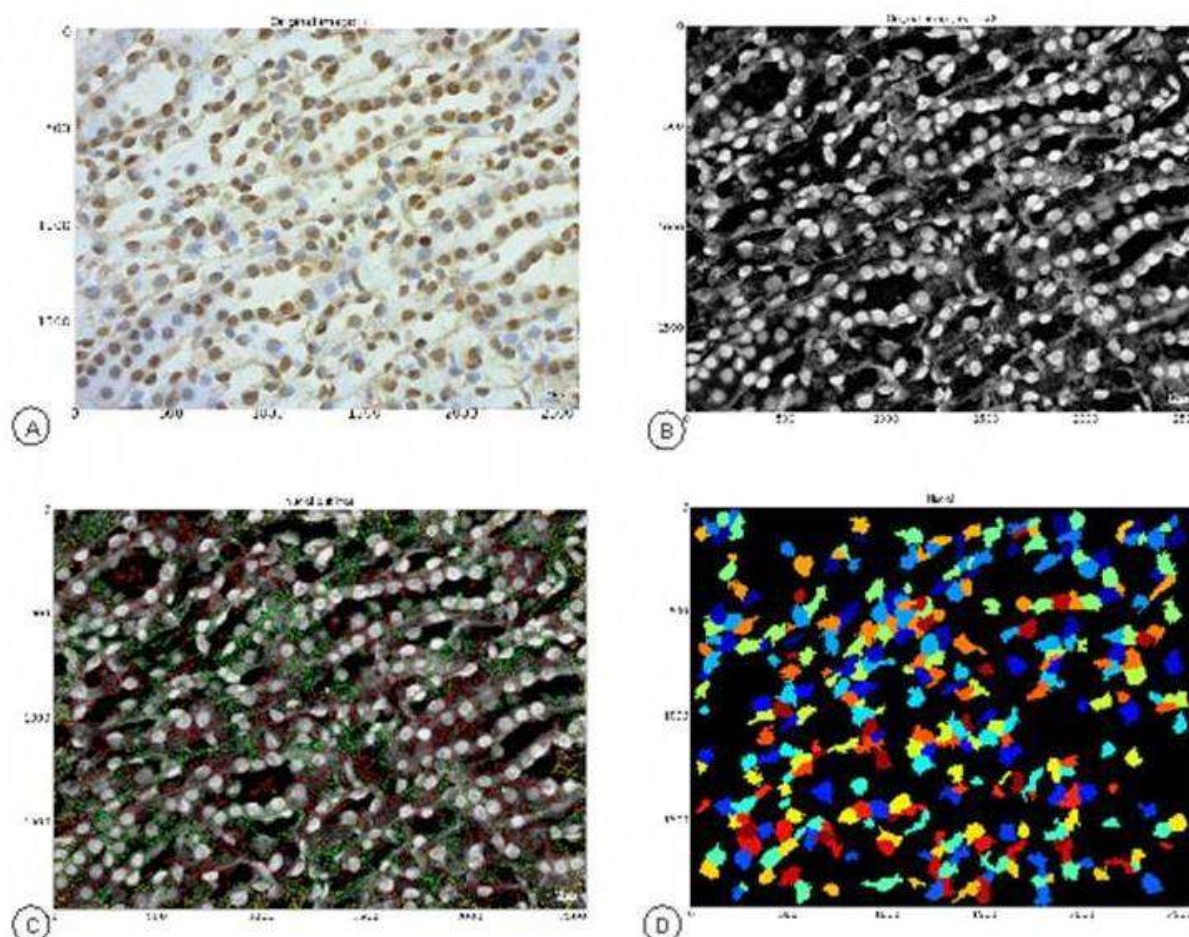


Figura 10: Determinação da área celular ocupada por cada núcleo marcado em reações para a proteína de proliferação celular, Ki67, e células em estágio de morte, por TUNEL.

(A) Imagem original inserida no programa, (B) imagem invertida para escala de cinza e destaque para os núcleos no espectro marrom, (C) estimativa da área celular ocupada por cada objeto identificado (*outlines*), e (D) leitura das áreas sem presença de artefatos.

4.8 Análise Estatística

Para avaliar a distribuição dos dados obtidos, foram feitos testes de normalidade usando-se *Kolmogorov-Smirnov*. Com o intuito de estabelecer associações entre as variáveis estudadas, foram determinadas:

- A intensidade integrada do rim contralateral determinada para o marcador HIF-1 α , na análise IHQ, foi avaliada pelo Teste de “*Kruskall-Wallis*”, com *post hoc* de Dunn para as variáveis dos diferentes grupos;
- A intensidade integrada do rim isquêmico (esquerdo) determinada para o marcador HIF-1 α , na análise IHQ, foi avaliada por ANOVA de 1-via para as variáveis dos diferentes grupos, com *post hoc* de Tukey;
- A intensidade integrada determinada para o marcador VEGF, na análise IHQ e em ambos os rins, foi avaliada por ANOVA de 1-via para as variáveis dos diferentes grupos, com *post hoc* de Tukey;
- Para correlacionar a intensidade integrada das proteínas citoplasmáticas, HIF-1 α e VEGF de ambos os rins, foi calculado o coeficiente de Correlação de *Pearson*;
- As porcentagens das áreas celulares com núcleos positivamente marcados para TUNEL e Ki67, na análise IHQ, foram avaliadas por ANOVA de 1-via para as variáveis dos diferentes grupos, com *post hoc* de Tukey;

Os cálculos e gráficos estatísticos foram feitos no *software* GraphPad Prims 6.0 (*GraphPad Software, Inc, USA*) e todos os testes foram bicaudais, com os valores de “*p*” considerados significativos quando inferiores a 0,05 ou 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Cirurgia

Dos 30 animais submetidos aos diferentes protocolos, houve sobrevivência de todos os animais dos grupos 1 e 2 (n = 10), e morte de 2 ratos do grupo 3 (Tabela 3).

Tabela 3: Quantidade de animais e lâminas analisadas

Grupos	Quantidade de animais	Quantidade de lâminas
1 (SHAM)	10	20
2 (IR)	10	20
3 (IR+GCSF)	8	16
$\Sigma =$	28	56

5.2 Descrição Morfológica por Microscopia de Luz

As análises descritivas demonstraram que para os animais do grupo 1 não houve modificação morfológica na arquitetura (Figura 11), enquanto os animais dos grupos 2 (Figura 12) e 3 (Figura 14) variaram em suas estruturas arquiteturais, de acordo com os parâmetros utilizados.

As lâminas analisadas dos animais do grupo um apresentavam os corpúsculos renais em seu formato esférico, preservados dentro do espaço de Bowman, e com integridade do folheto parietal bem como o visceral, destacando-se os podócitos

(Figura 11B-C). Os vasos sanguíneos apresentaram luz bem definida e sem congestão por nenhuma outra célula sanguínea (Figura 11A-D). Caracteristicamente, os núcleos dos túbulos mantiveram-se arredondados e lúmen visível em ambos os túbulos contorcidos proximais (Figura 11A-D) e distais (Figura 11B-C).

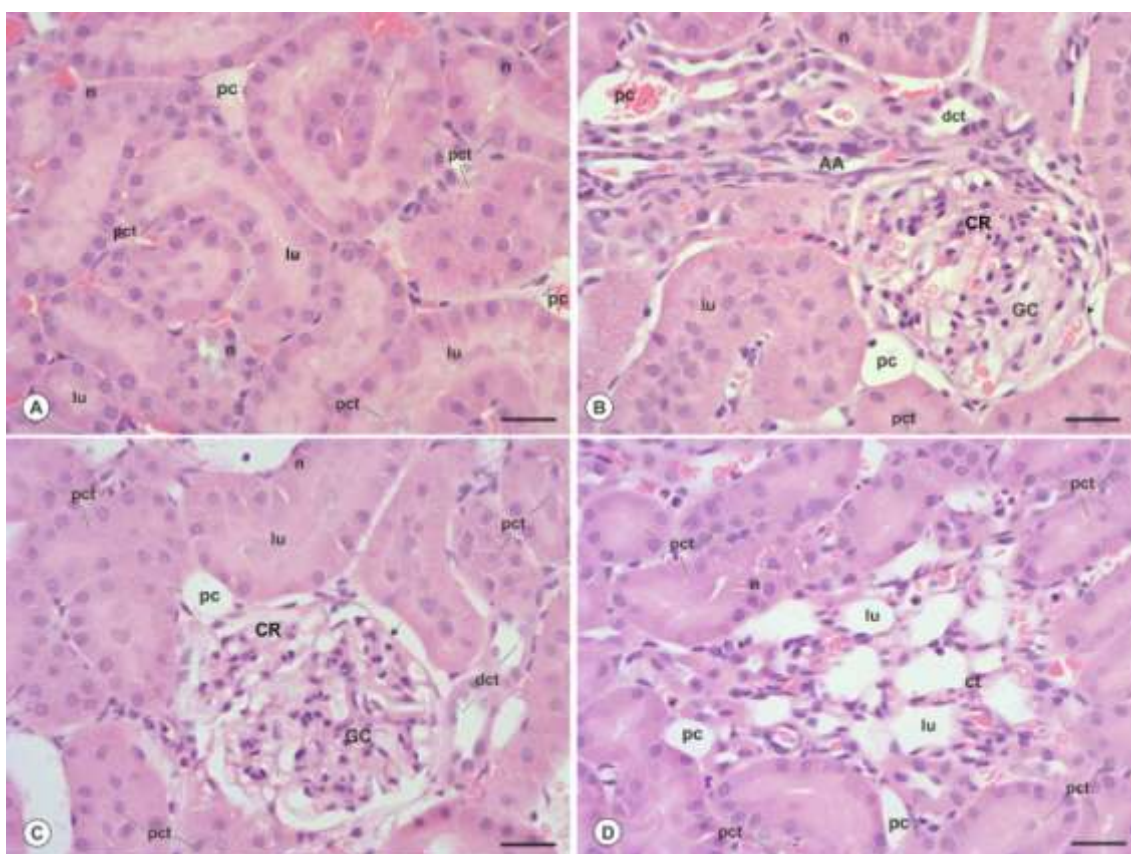


Figura 11: Fotomicrografias comparativas de cortes em parafina do córtex renal de animais do grupo 1 (SHAM).

(A) Mostra túbulos contorcidos proximais (**pct**), em cortes transversais, oblíquos e longitudinais, com lúmen (**lu**) e núcleos (**n**) definidos, (B-C) vários túbulos proximais e túbulos contorcidos distais (**dct**) ao redor do corpúsculo renal (**CR**), cujas alças dos capilares glomerulares (**GC**) estão evidentes bem como seu folheto parietal (\neq), (D) túbulos coletores (**ct**), em raio medular, e túbulos proximais. Notar preservação morfológica (A-D). Capilares peritubulares (**pc**) e arteríola aferente (**AA - B**) também podem ser observados. Coloração por H&E, aumento de 400x, barras de escala = 20 μ m.

No grupo 2, as amostras apresentaram retração do corpúsculo renal, evidenciando o espaço urinário, porém, com preservação do folheto parietal (Figura 12A e 13A). Os vasos sanguíneos variaram em sua luz, que por vezes era de fácil identificação (Figura 12A e C) à difícil, pela presença de outros elementos figurados do sangue (Figura 12B e D) ou por impregnação de grânulos de mioglobina (Figura 13B, E-F).

Nos túbulos proximais a borda em escova era pouco evidente (Figura 13A) ou ausente, aparentando dilatação tubular (Figura 12B-D) e achatamento celular, adotando o padrão de túbulos distais, pelo desnudamento das células tubulares e consequente simplificação do epitélio tubular, também descrito como “distalização” (Figuras 12B e C, e 13B). Em sua luz havia debris celulares ocorridos em virtude de processos de perda de elementos citoplasmáticos (Figuras 12E-F e 13C) e/ ou destacamento celular por completo (Figura 12E), consequência de morte celular por necrose.

Observou-se, ainda, formação de bolhas na parte apical das células tubulares proximais, resultado da perda de conteúdo citosólico, processo denominado “*blebbing*” (Figuras 12B-D e 13B-C) e alargamento intersticial evidente em todo o parênquima renal (Figuras 12B e 13A).

Ao analisar as diferentes amostras somente por coloração de Tricrômico de Gomori, foi evidenciada a presença de fibras colágenas mais pronunciadamente circundando túbulos contorcidos proximais (Figura 13C) e túbulos dilatados contendo líquido e substâncias homogêneas amorfas, cujas características cromogênicas indicam componentes positivos para colágeno (Figura 13E).

Observou-se ainda um conjunto particular de túbulos cuja área apresentou intensa coloração, demonstrando acentuada acidofilia, com massas amorfas de componentes citoplasmáticos (proteólise) e rompimento dos limites membranares citoplasmáticos, denotando uma porção única de túbulos. Eram visíveis também os núcleos picnóticos (Figura 13D).

Complementar às avaliações realizadas, células dos tubos coletores, de região de medula, apresentaram citoplasma menos basófilo e granuloso, intumescimento celular, e células com aspecto baloniforme, característica de degeneração hidrópica (Figura 13F).

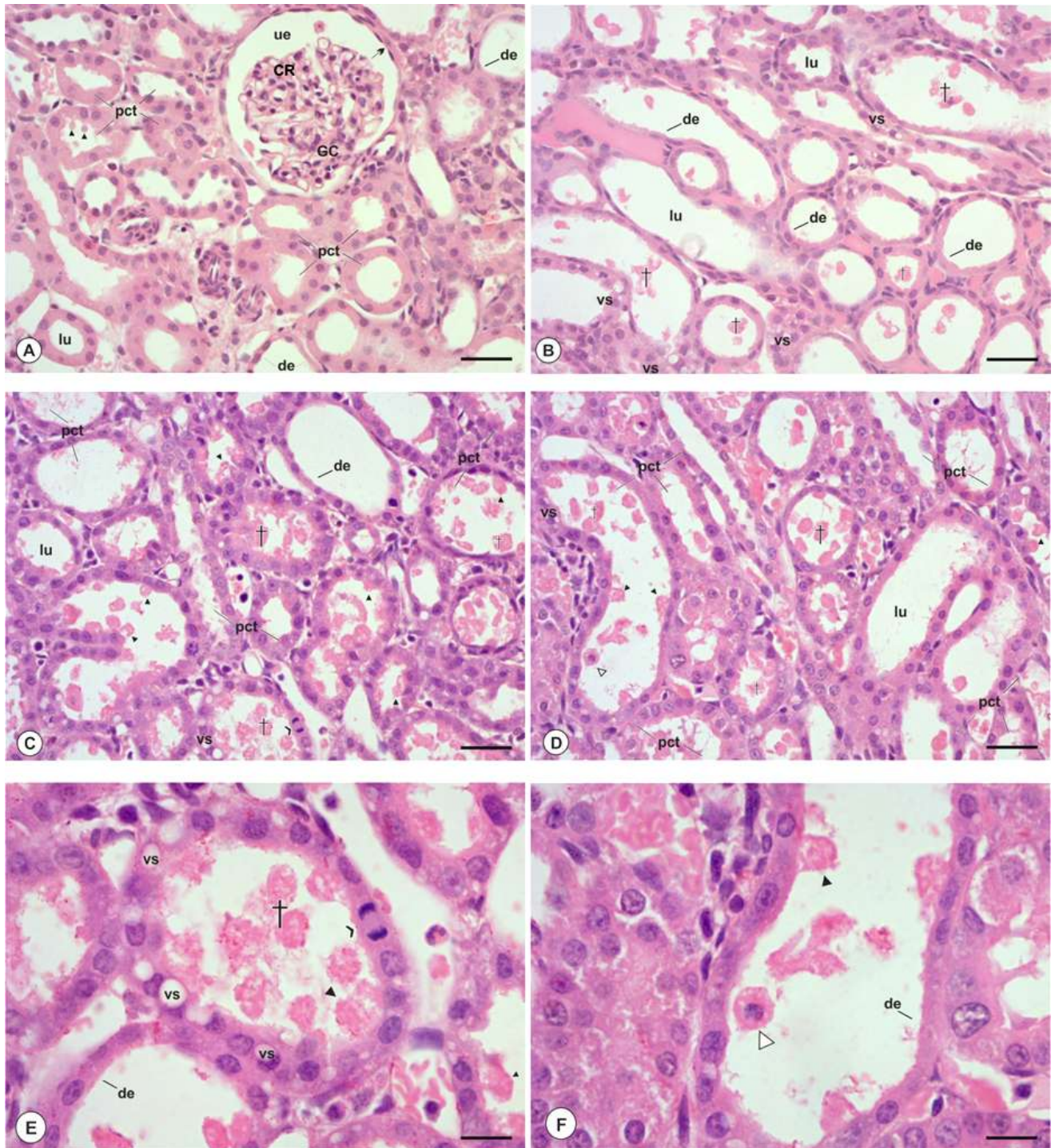


Figura 12: Fotomicrografias comparativas de cortes em parafina do córtex renal de animais do grupo 2 (IR).

(A) Notar retração do corpúsculo renal (CR) e dos capilares glomerulares (cg) evidenciando o espaço urinário (ue), porém com preservação do folheto parietal (↙). Túbulos contorcidos proximais (pct), em cortes transversais, oblíquos e longitudinais, com lúmen (lu) dilatado e presença de bolhas na porção apical celular (▶); (B-D) vários túbulos proximais em distintos estádios de distalização, sendo identificadas desnudações (de) celulares, presença de debris celulares (†) no lúmen tubular, bolhas se destacando da parte apical e diversas vesículas (vs) citoplasmáticas evidentes; (E) detalhe da figura C: melhor visualização das vesículas citoplasmáticas, bolhas se desprendendo das células ocupado quase todo lúmen tubular e observar o fenômeno de divisão celular (♣); (F) detalhe da figura D: debris celulares presentes, conteúdo citosólico se desprendendo, e notar presença de um núcleo íntegro e parte de seu citoplasma desprendido (◁). Coloração por H&E, (A-D) aumento de 400x, barras de escala = 20µm, (E-F) aumento de 1000x, barras de escala = 10µm.

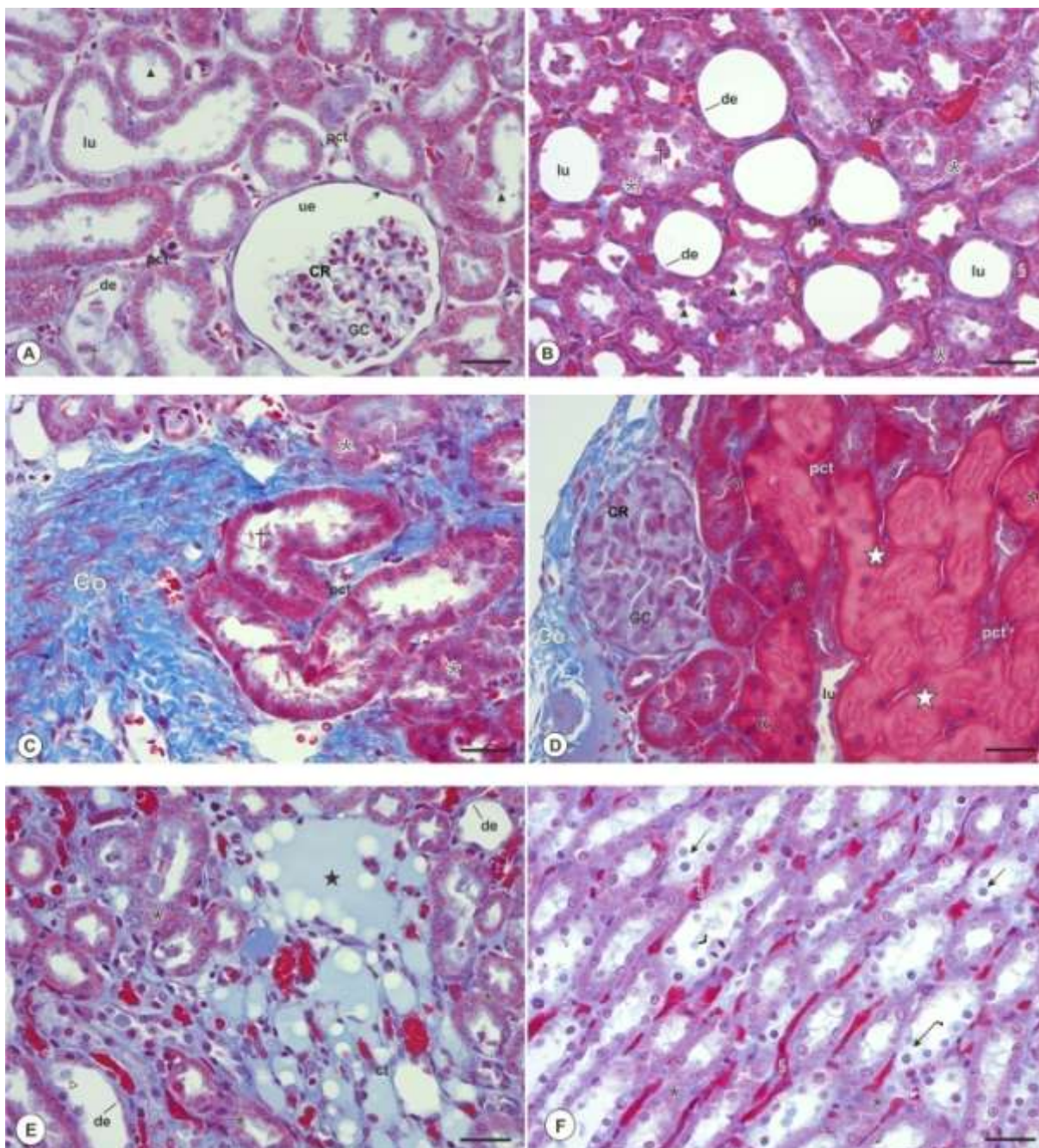


Figura 13: Fotomicrografias comparativas de cortes em parafina do córtex renal de animais do grupo 2 (IR).

(A) Notar retração do corpúsculo renal (CR) e dos capilares glomerulares (cg) evidenciando o espaço urinário (ue), porém com preservação do folheto parietal (↙). Túbulos contorcidos proximais (pct), em cortes transversais, oblíquos e longitudinais, com lúmen (lu) dilatado assim como alargamento intersticial, e presença de bolhas na porção apical celular (▶); (B) vários túbulos proximais em estádios completos de distalização, sendo identificadas desnudações (de) celulares, evidenciado pelo lúmen dilatado e perda de componentes celulares, restando somente a membrana basal; em outro conjunto de túbulos proximais, presença de debris celulares (†) e bolhas se destacando, além de pigmentos mioglobínicos (S) congestionando os capilares; (C) túbulo proximal circundado por fibras colágenas (Co), além de degeneração tubular por evidência do citoplasma granuloso (+); (D) túbulos proximais em necrose avançada (*) e núcleos picnóticos diversos («), sendo possível observar, ainda, fibras colágenas constituintes da cápsula renal; (E) ductos coletores (ct) preenchidos por substância amorfa (★) e notar destacamento celular (△); (F) tubos coletores, em região de medula, com intensa impregnação por pigmentos mioglobínicos, diversas células com citoplasma granuloso e células com aspecto baloniforme (↖), observa-se também processo mitótico (∩). Coloração por Tricrômico de Gomori, (A-F) aumento de 400x, barras de escala = 20µm.

No grupo 3, os espécimes apresentaram preservação de seu do corpúsculo renal (Figura 14B), embora tenha também havido ocorrência de retração de alguns glomérulos, evidenciando o espaço urinário (Figura 15C e E). A impregnação de grânulos de mioglobina ainda persistiu em vasos peritubulares aos tubos coletores (Figura 15A, E e F).

De forma análoga ao observado no grupo 2, também havia debris celulares na luz de túbulos proximais, como conseqüência de degeneração celular (Figuras 14A-D e 15D-E). E perceptivelmente, as bolhas apicais eram notadas, embora em menor quantidade (Figuras 14C e 15E).

Os túbulos proximais apresentavam ainda os fenômenos de dilatação tubular e achatamento celular, adotando o aspecto de “distalização” (Figura 15B). Adicionalmente, algumas células tubulares estavam vacuolizadas (Figuras 14C e 15A e D), intumescidas e sem espaço intersticial evidente (Figura 14A e D).

Ao analisar as mesmas lâminas, somente por coloração de Tricrômico de Gomori, foi evidenciada a presença de fibras colágenas peritubulares proximais (Figura 15D) e de substâncias amorfas periglomerulares e também peritubulares, na região do córtex renal, cujas características cromogênicas indicam componentes positivos para colágeno (Figura 15E). O aspecto celular de degeneração hidrópica também foi notado (Figura 15A, D e E).

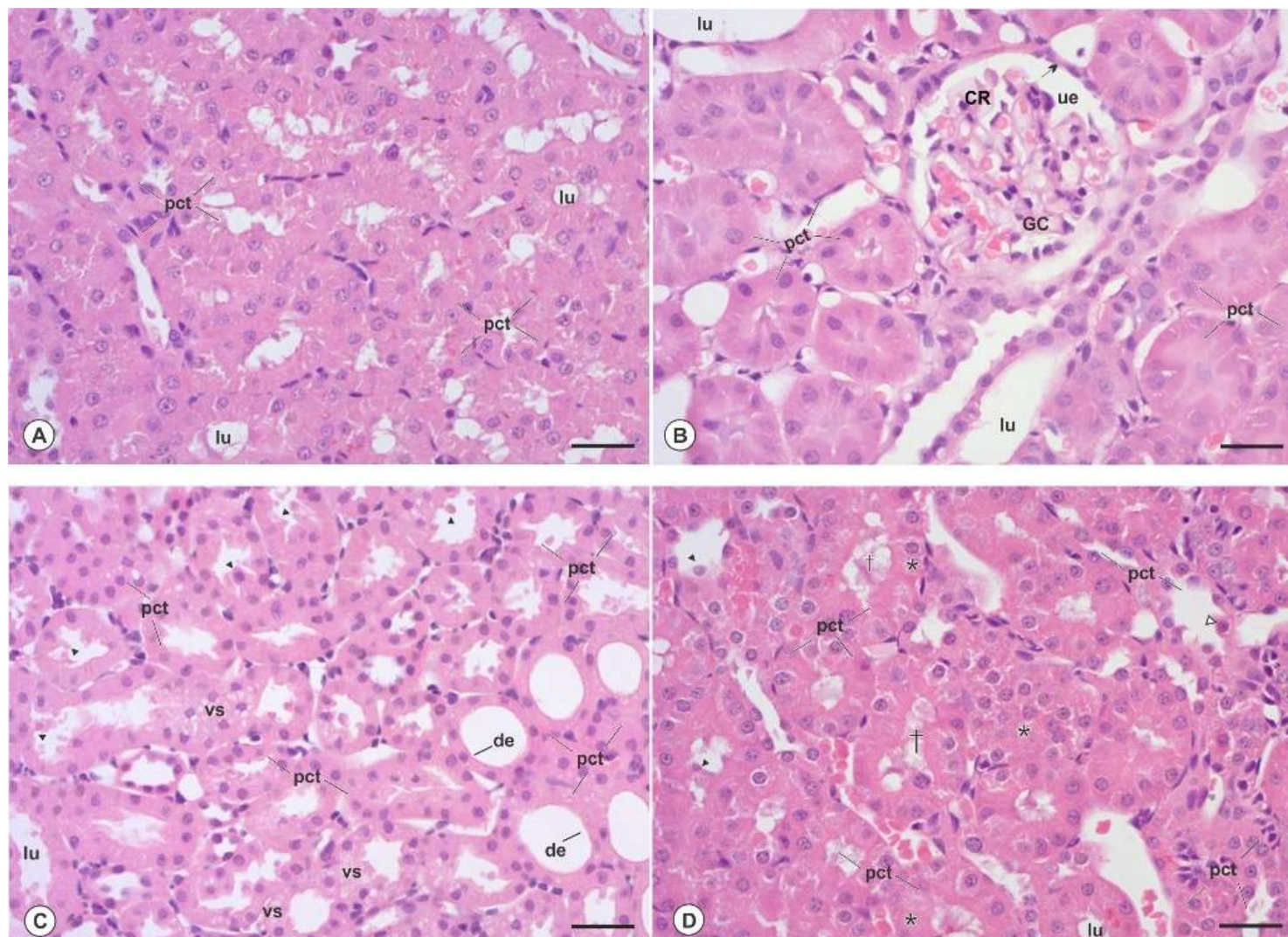


Figura 14: Fotomicrografias comparativas de cortes em parafina do córtex renal de animais do grupo 3 (IR+GCSF). (A) Notar desorganização arquitetural dos túbulos contorcidos proximais (pct), com perda de espaço intersticial evidente, (B) vários túbulos proximais e presença de corpúsculo renal (CR) em aspecto íntegro: capilares glomerulares bem distintos (CG), com preservação do folheto parietal (ue) e espaço urinário (ue); (C) vários túbulos proximais em cortes transversais, oblíquos e longitudinais, com lúmen (lu) dilatado e presença de bolhas na porção apical celular (▶); notável distalzação, com processos de desnudações (de) celulares identificadas, bolhas se destacando da parte apical e diversas vesículas (vs) citoplasmáticas evidentes; (D) túbulos proximais em degeneração hidrópica, evidente pelo citoplasma granuloso (*) e presença de debris celulares (†) no lúmen tubular, observar também a presença de um núcleo íntegro e parte de seu citoplasma desprendo-se do túbulo Coloração por H&E, (A-D) aumento de 400x, barras de escala = 20µm.

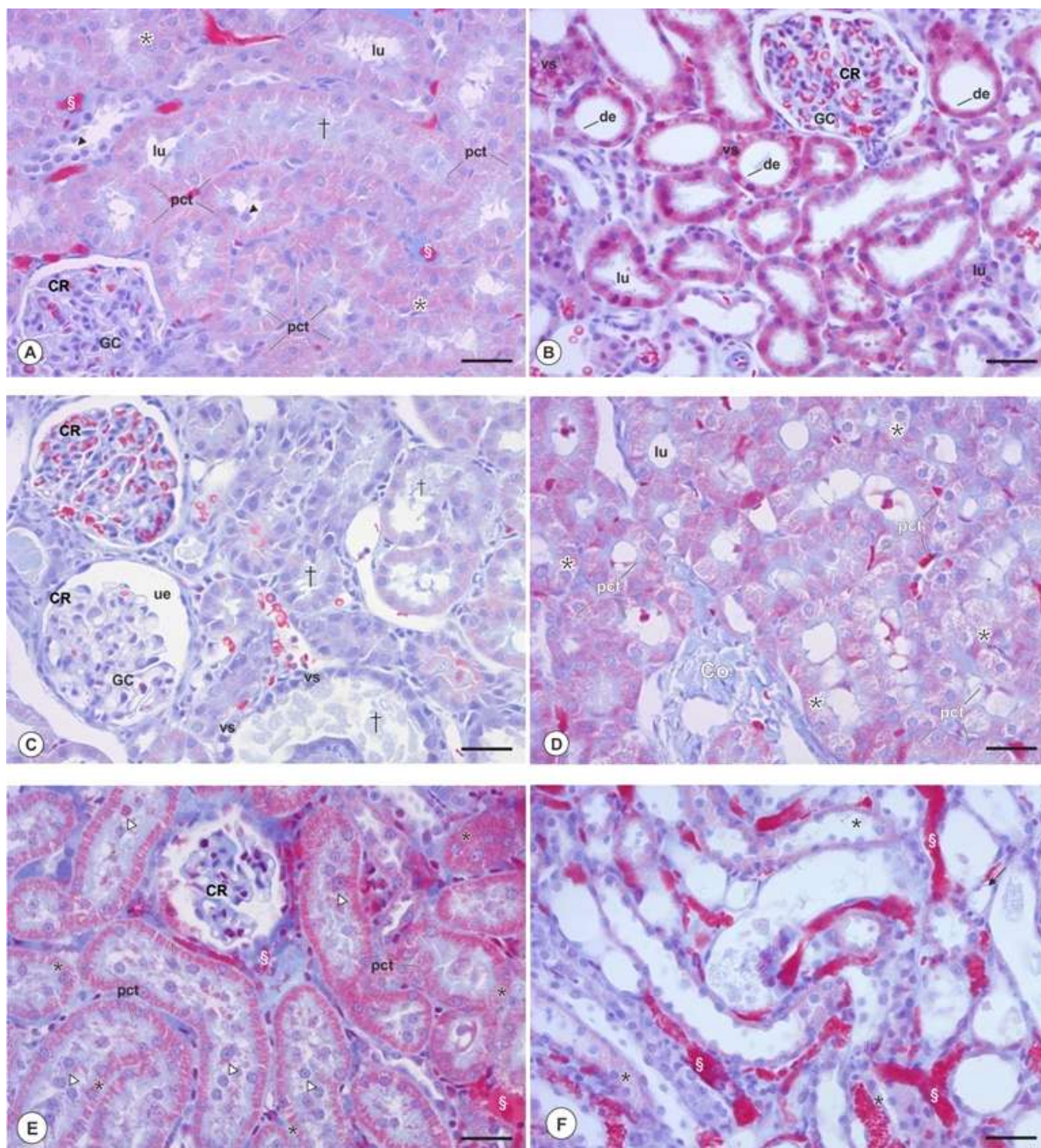


Figura 15: Fotomicrografias comparativas de cortes em parafina do córtex renal de animais do grupo 3 (IR+GCSF).

(A) (A) Notar integridade do corpúsculo renal (CR), túbulos contorcidos proximais (pct), em cortes transversais, oblíquos e longitudinais, com citoplasma granuloso (*) e presença de debris celulares (†) no lúmen (lu), bolhas nas porções apicais da células (▶), e destaque para pigmentos mioglobínicos (§) congestionando os capilares; (B) vários túbulos proximais em estádios de distalização, evidenciado pelo lúmen dilatado, porção apical celular sem componente, caracterizando desnudação (de), e vesículas citossólicas (vs), (C) corpúsculo renal com o espaço urinário (ue) evidente e vesículas citoplasmáticas; (D) fibras colágenas (Co) focalmente localizadas entre túbulos proximais e citoplasma granuloso; (E) presença de corpúsculo renal, debris celular em lúmen, citoplasma granuloso, pigmento mioglobínico e perda de núcleos (∆); (F) tubos coletores, em região da medula, com presença de pigmentos mioglobínicos em seus vasos e células com citoplasma granuloso. Coloração por Tricrômico de Gomori, (A-F) aumento de 400x, barras de escala = 20µm.

5.3 Descrição Morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para as amostras de animais do grupo um (SHAM), é evidente a arquitetura morfológica conservada de acordo com sua organização funcional: podócitos com seus prolongamentos secundários preservados e os pedicelos íntegros apoiados sobre a face abluminal dos capilares glomerulares, apresentando fendas de filtração. A lâmina basal é claramente identificada entre os pedicelos e o endotélio fenestrado, realçada por sua ininterrupta lâmina densa, cuja característica elétron-densa permite distinção em microscopia eletrônica (Figura 16A-B).

Nos animais do grupo dois (IR) já foi observada a deformação morfológica no endotélio capilar, nos prolongamentos secundários, bem como perda destes em algumas porções. Além de desorganização dos pedicelos ou dano a ponto da inexistência de alguns deles em segmentos consecutivos, sendo característica de fusão de podócitos (Figura 16C). De maneira similar, aconteceu com a lâmina basal. Ao longo da lâmina densa evidenciou-se uma descontinuidade em sua extensão, indicando lesão. Fato corroborado pela identificação das lâminas raras (interna e externa), ressaltadas nas eletromicrografias quando comparadas com a característica elétron-densa perdida, notada em virtude do padrão “claro/ escuro” apresentado (Figura 16D).

Embora tenha sido demonstrada a presença dos prolongamentos secundários e dos pedicelos nos animais do grupo três (IR+G-CSF), alguns destes apresentaram desorganização morfológica, quanto seu envolvimento com a superfície capilar (Figura 16E). Isso foi evidenciado principalmente pela pouca identificação das fendas de filtração existentes entre os pedicelos (Figura 16F). A lâmina basal foi identificada por sua lâmina densa, fortemente destacada, e perceptivelmente, ainda, aparentou espessamento. Ocorrência notada pela continuidade entre o lúmen capilar e o contato com os pedicelos (Figura 16F).

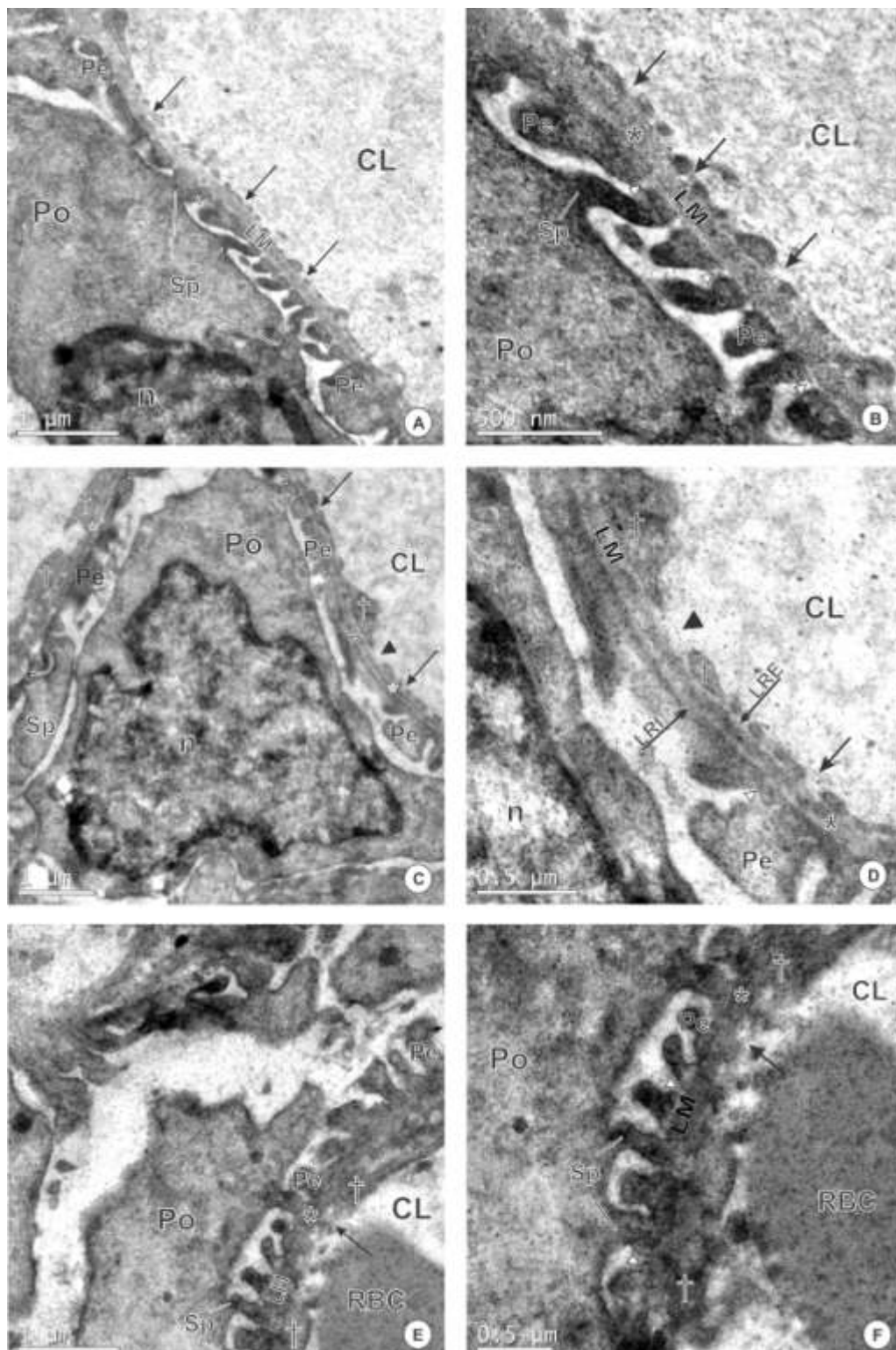


Figura 16: Eletromicrografias demonstrando parte da barreira de filtração glomerular. Amostra de animal do grupo 1 (SHAM) (A, B detalhe de A): notar a integridade do podócito (Po) com seus prolongamentos secundários (Sp) e os pedicelos (Pe) apoiados sobre a face abluminal. É visível também a lâmina basal (LM), evidenciada por sua camada elétro-densa (*), as fendas de filtração (▷) e o endotélio fenestrado (◀). **Amostra de animal do grupo 2 (IR) (C, D detalhe de C):** perda da integridade morfológica dos prolongamentos secundário e dos pedicelos, caracterizados por fusão de podócitos, e lâmina basal desintegrada (◄) lâmina densa menos visível, com destaque para as lâminas raras interna (LRI) e externa (LRE). Ainda, notam-se fendas de filtração perceptivelmente mais espaçadas e endotélio sem sua característica delgada (†). **Amostra de animal do grupo 3 (IR+GCSF) (E, F detalhe de E):** preservação dos pedicelos, fendas de filtração melhores identificadas, lâmina basal menos danificada, sem a visibilidade das lâminas raras, indicando constituição da lâmina densa; mas, ainda, endotélio um pouco danificado. CL: lúmen capilar; n: núcleo; RBC: eritrócito. Aumentos: A, C e E: 20.000x; B, D e F: 50.000x.

5.4 Expressão Citoplasmática de HIF-1 α

5.4.1 HIF-1 α em Rim Contralateral

A expressão analisada de HIF-1 α demonstrou aparecimento em todos os grupos experimentais. A marcação dessa proteína nos rins contralaterais não apresentou relação estatisticamente significativa entre os animais do grupo 1 vs 2 nem do grupo 1 vs 3, enquanto foi significativo o valor entre o do grupo 2 vs 3 ($p=0,0087$) (Figura 17).

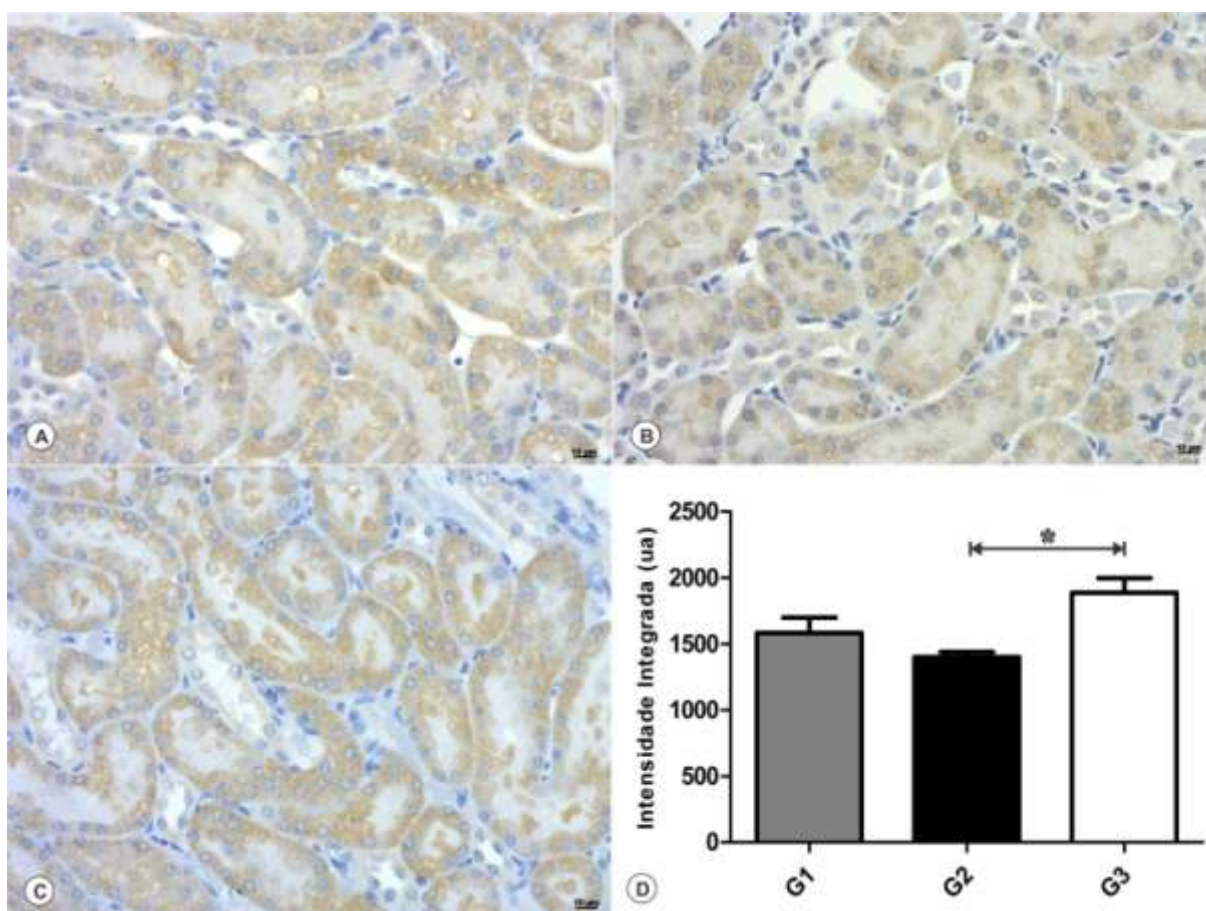


Figura 17: Fotomicrografias comparativas de marcações por HIF-1 α , cortes em parafina do córtex renal dos animais, e os respectivos valores de sua expressão (intensidade integrada), em rins contralaterais.

(A) Amostra do grupo 1 (SHAM), (B) amostra do grupo 2 (IR), (C) amostra do grupo 3 (IR+GCSF) - aumento de 400x, barras de escala = 10 μ m; e (D) quantificação da expressão de HIF-1 α , *G2 vs G3, $p < 0,05$.

5.4.2 HIF-1 α em Rim Isquêmico

A expressão de HIF-1 α nos rins esquerdos também demonstrou aparecimento em todos os grupos experimentais. A marcação desta proteína nos rins estudados não apresentou relação estatisticamente significativa entre os animais do grupo 1 vs 2, do grupo 1 vs 3 e nem os do grupo 2 vs 3 ($p=0,7144$) (Figura 18).

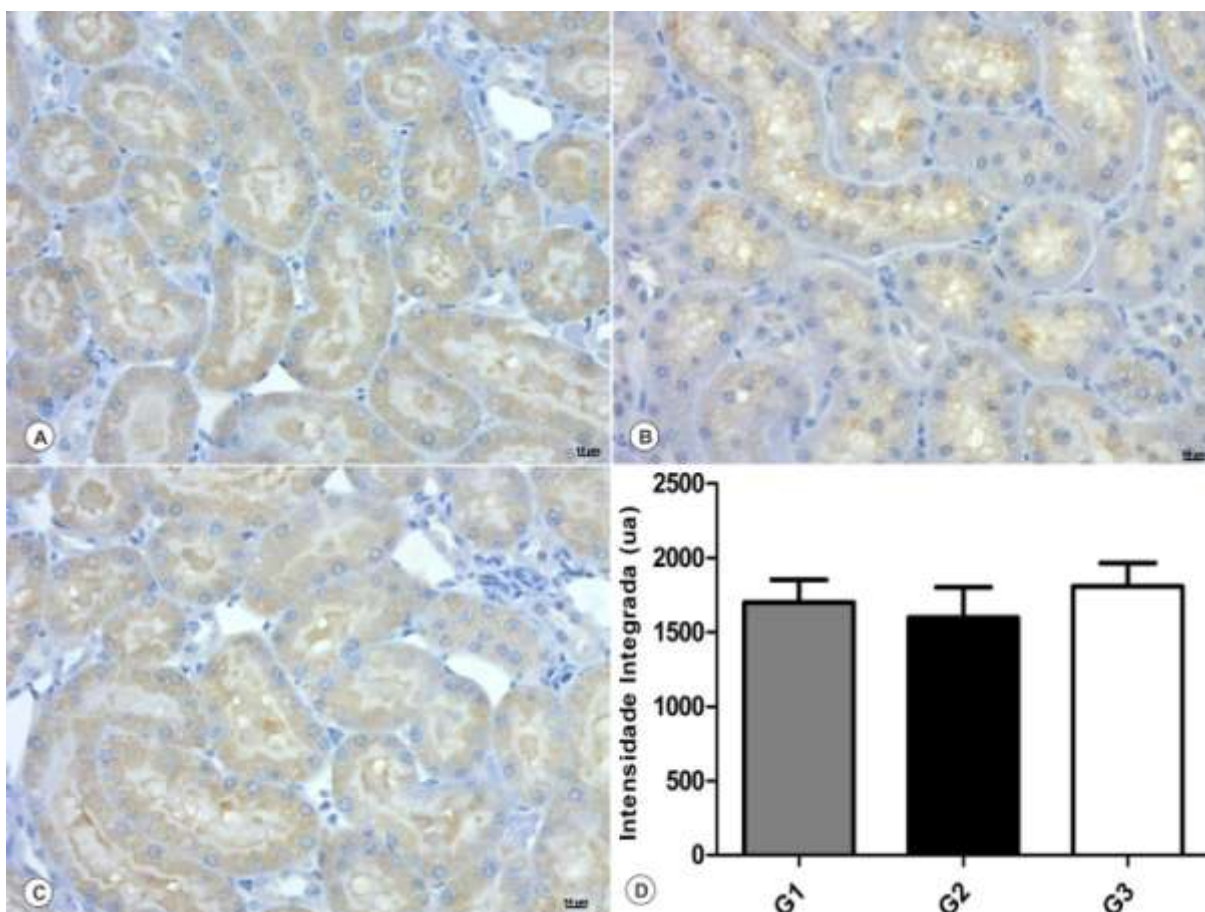


Figura 18: Fotomicrografias comparativas de marcações por HIF-1 α , cortes em parafina do córtex renal dos animais, e os respectivos valores de sua expressão (intensidade integrada), em rins isquêmicos.

(A) Amostra do grupo 1 (SHAM), (B) amostra do grupo 2 (IR), (C) amostra do grupo 3 (IR+GCSF) - aumento de 400x, barras de escala = 10 μ m; e (D) quantificação da expressão de HIF-1 α .

5.5 Expressão Citoplasmática de VEGF

5.5.1 VEGF em Rim Contralateral

A análise da expressão de VEGF demonstrou ocorrência em todos os grupos experimentais e a marcação dessa proteína nos rins contralaterais não apresentou relação estatisticamente significativa entre os animais do grupo 1 vs 2, do grupo 1 vs 3 e nem nos do grupo 2 vs 3 ($p=0,8574$) (Figura 19).

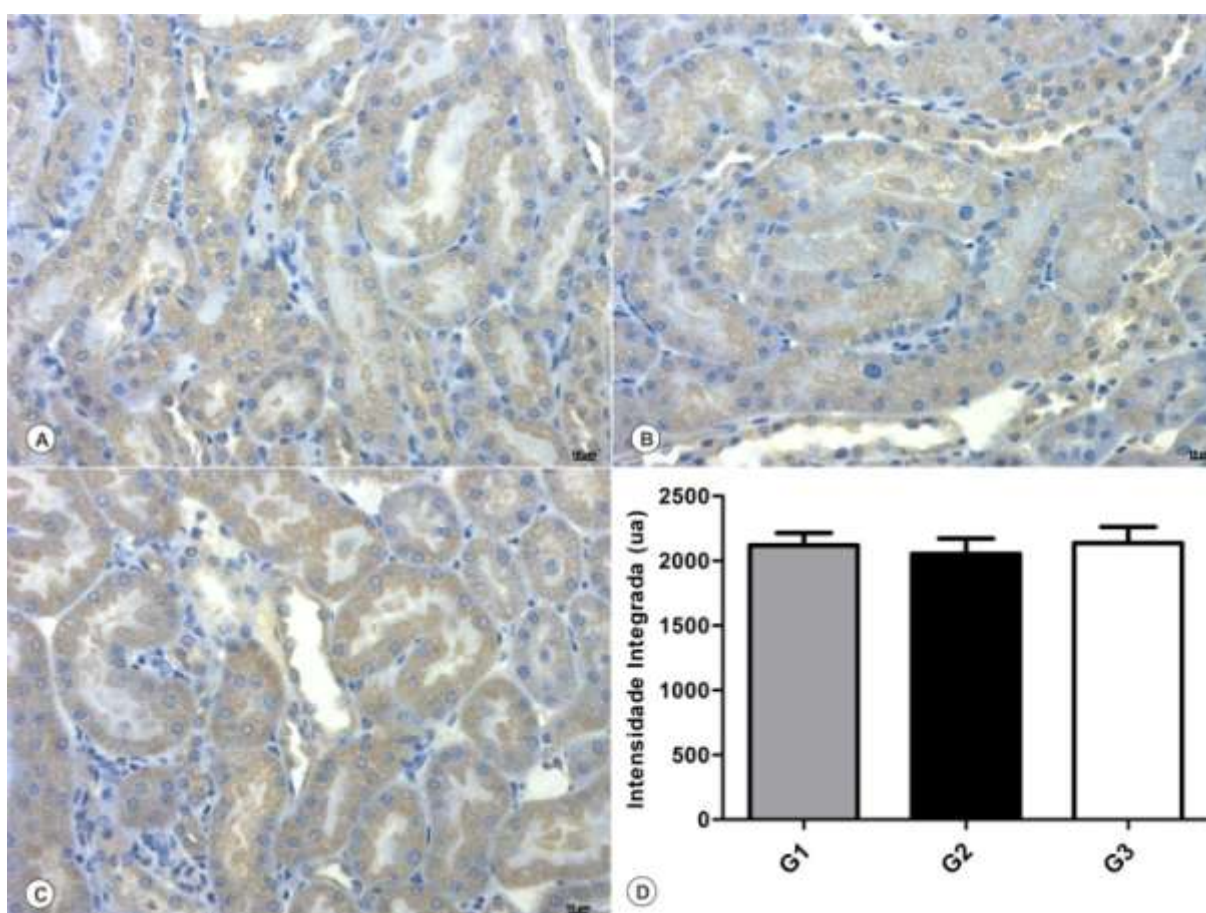


Figura 19: Fotomicrografias comparativas de marcações por VEGF, cortes em parafina do córtex renal dos animais, e os respectivos valores de sua expressão (intensidade integrada), em rins contralaterais.

(A) Amostra do grupo 1 (SHAM), (B) amostra do grupo 2 (IR), (C) amostra do grupo 3 (IR+GCSF) - aumento de 400x, barras de escala = 10 μ m; e (D) quantificação da expressão de VEGF.

5.5.2 VEGF em Rim Isquêmico

A expressão de VEGF também ocorreu em todos os grupos experimentais e sua marcação nos rins contralaterais apresentou relação estatisticamente significativa entre os animais do grupo 1 vs 2, do grupo 1 vs 3 e entre os do grupo 2 vs 3 ($p < 0,0001$) (Figura 20).

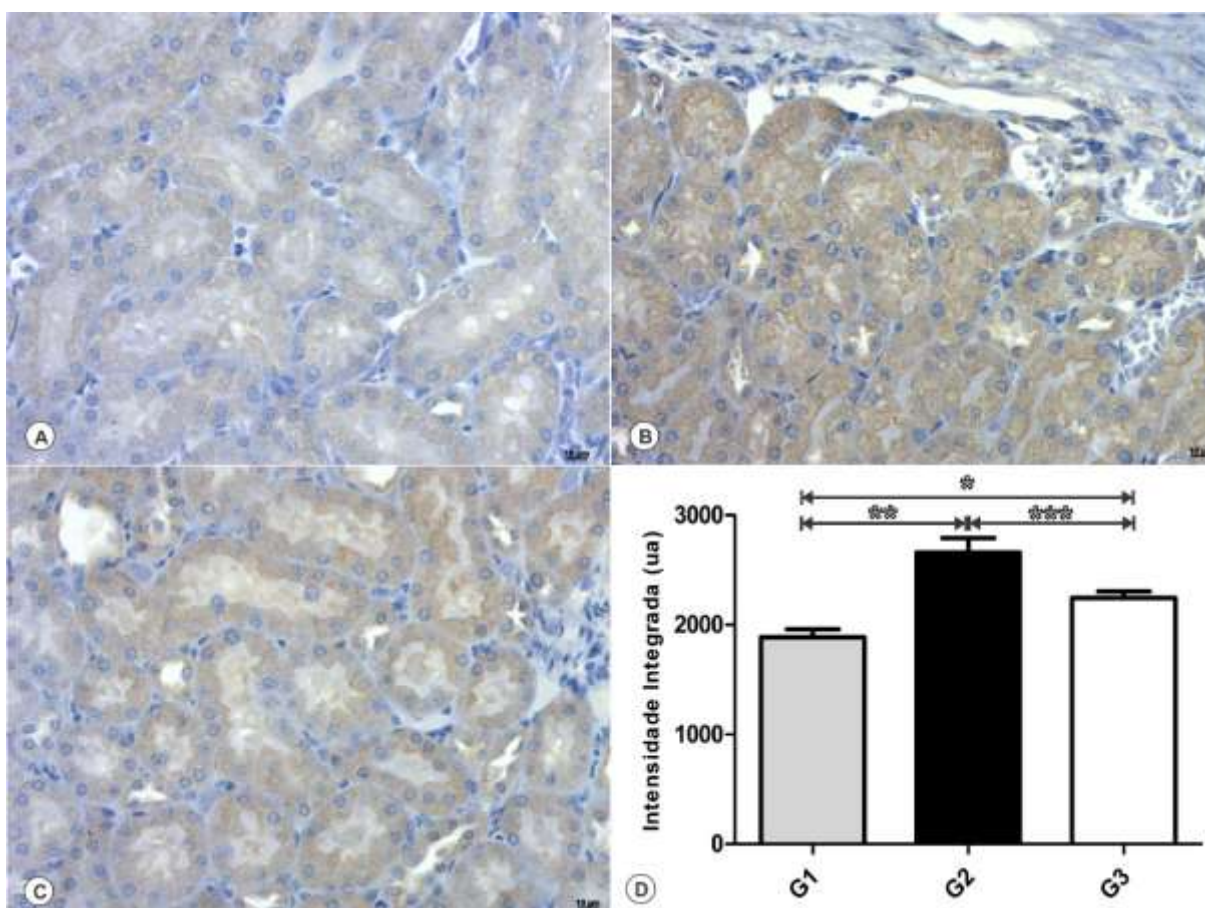


Figura 20: Fotomicrografias comparativas de marcações por VEGF, cortes em parafina do córtex renal dos animais, e os respectivos valores de sua expressão (intensidade integrada), em rins isquêmicos.

(A) Amostra do grupo 1 (SHAM), (B) amostra do grupo 2 (IR), (C) amostra do grupo 3 (IR+GCSF) - aumento de 400x, barras de escala = 10 μ m; e (D) quantificação da expressão de VEGF, *G1 vs G3, **G1 vs G2, e ***G2 vs G3, em todos os casos $p < 0,05$.

5.6 Correlação entre HIF-1 α e VEGF

As análises de correlações entre ambos os marcadores citosólicos foram feitas, para os rins esquerdos, e, dentro os grupos comparados (G1, G2 e G3), não apresentaram nenhuma diferença estatisticamente significativa (Figura 21), valores respectivos de correlação: $r_1 = -0,28$, $r_2 = 0,22$ e $r_3 = 0,22$.

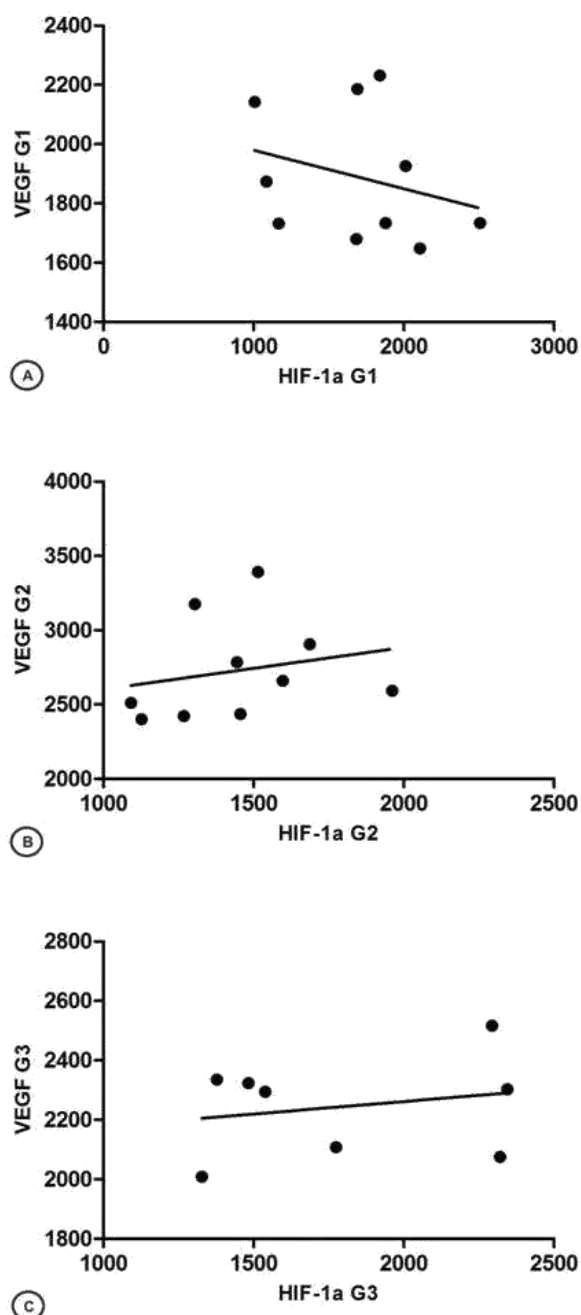


Figura 21: Gráficos de correlação dos valores de expressão (intensidade integrada) entre os marcadores citosólicos HIF-1 α VEGF, em rins isquêmicos.

(A) Correlação entre o grupo 1 (SHAM), $r_1 = -0,28$; (B) correlação entre o grupo 2 (IR), $r_2 = 0,22$; e (C) correlação entre o grupo 3 (IR+GCSF), $r_3 = 0,22$.

5.7 Morte Celular detectada por TUNEL

As detecções de morte celular pela técnica de TUNEL demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados: G1 ($4,13 \pm 1,86\%$) vs G2 ($20,68 \pm 5,47\%$) vs G3 ($7,91 \pm 1,97\%$) ($p < 0,0001$) (Figura 22).

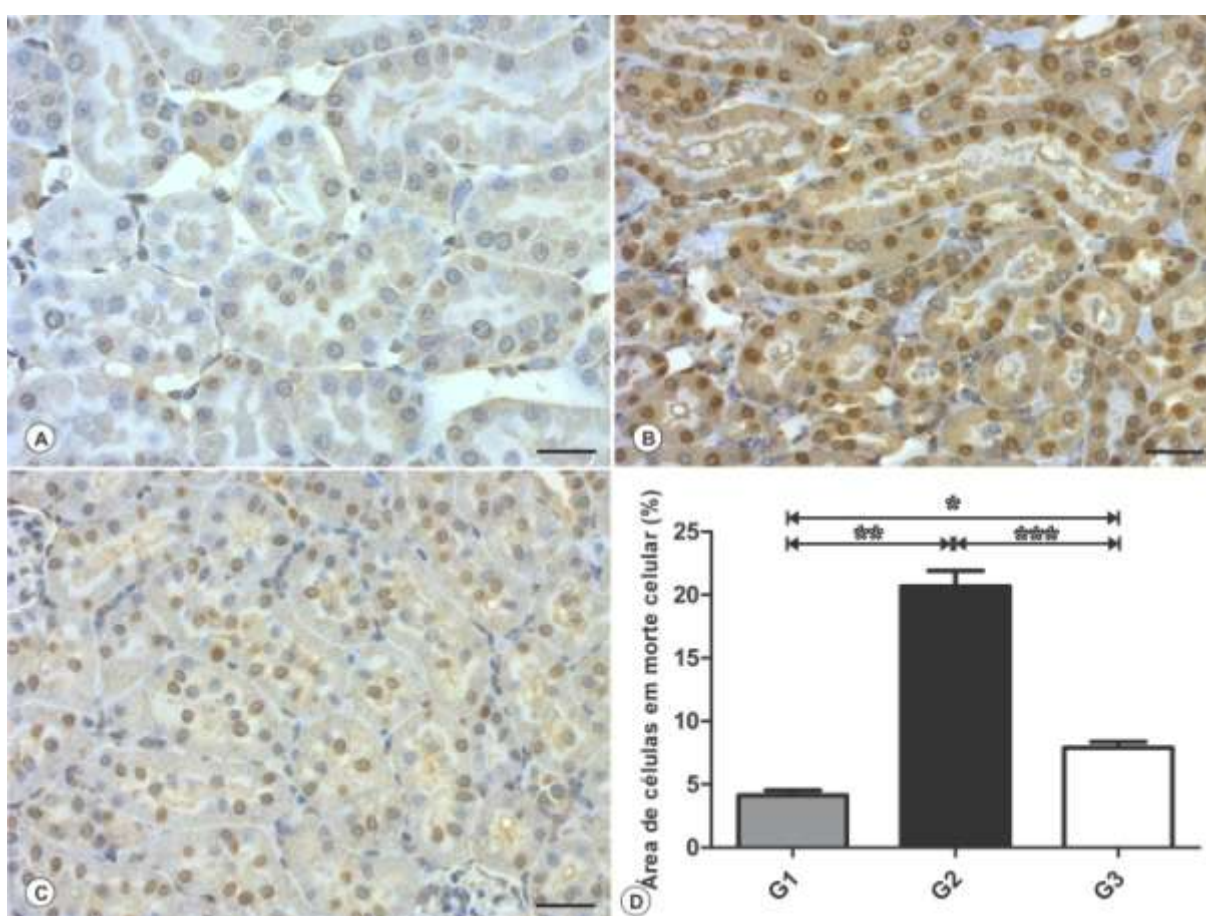


Figura 22: Fotomicrografias comparativas de núcleos positivamente marcados pela técnica de TUNEL, cortes em parafina do córtex renal de animais, e sua respectiva área em processo de morte celular, em rins isquêmicos.

(A) Amostra do grupo 1 (SHAM), (B) amostra do grupo 2 (IR), (C) amostra do grupo 3 (IR+GCSF) - aumento de 400x, barras de escala = 20µm; e (D) área de células em processo de morte celular, *G1 vs G2, **G1 vs G3, e ***G2 vs G3, em todos os casos $p < 0,05$.

5.8 Proliferação Celular por Ki67

As detecções de proliferação celular por Ki67 apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados: G1 ($12,29 \pm 2,64\%$) vs G2 ($28,94 \pm 4,52\%$) vs G3 ($17,59 \pm 6,20\%$) ($p < 0,0001$) (Figura 23).

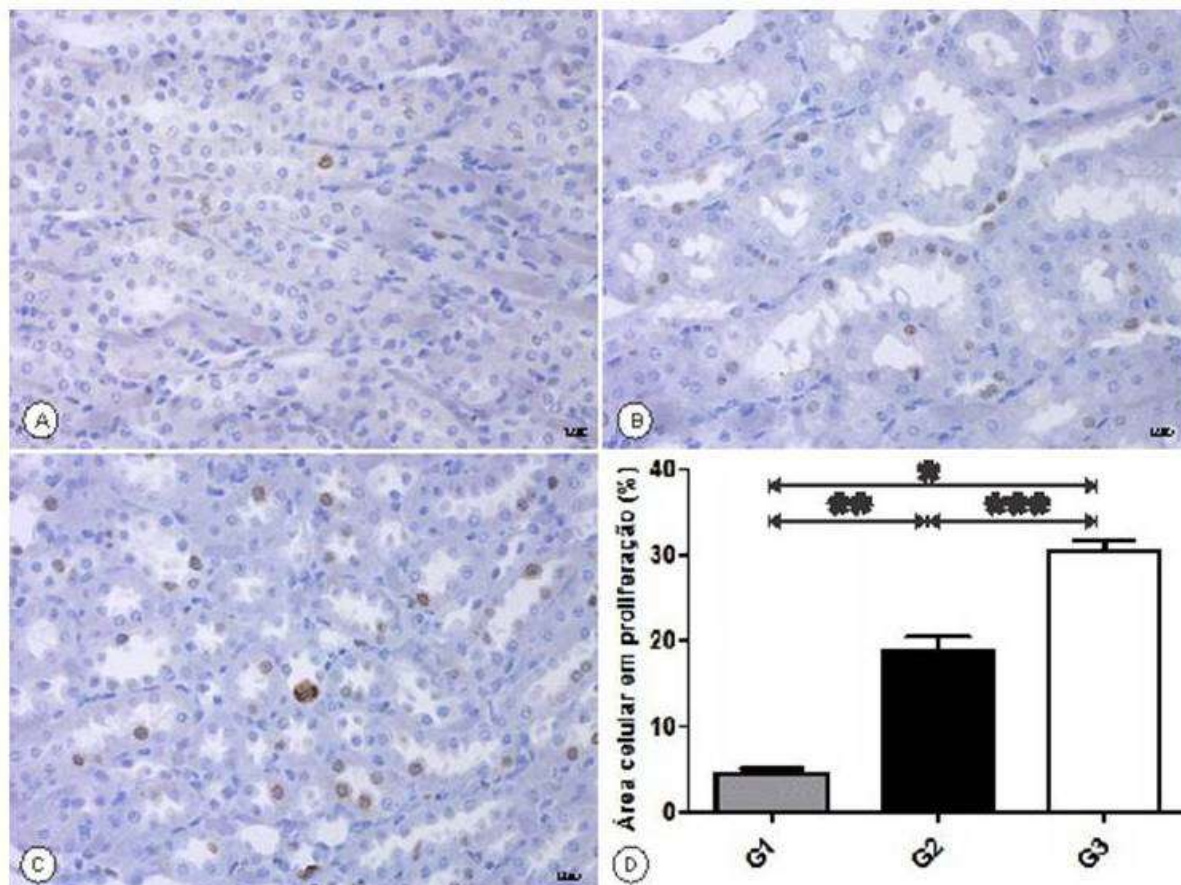


Figura 23: Fotomicrografias comparativas de núcleos positivamente marcados por Ki67, cortes em parafina do córtex renal de animais, e sua respectiva área em processo de proliferação celular, em rins isquêmicos.

(A) Amostra do grupo 1 (SHAM), (B) amostra do grupo 2 (IR), (C) amostra do grupo 3 (IR+GCSF) - aumento de 400x, barras de escala = 10 μ m; e (D) área de células em processo proliferação, *G1 vs G2, **G1 vs G3, e ***G2 vs G3, em todos os casos $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

O modelo experimental de isquemia e reperfusão renal aguda já previamente estabelecido (CANTIN et al., 1979; NOGAE et al., 1997; SUPAVEKIN et al., 2003; FEITOSA et al., 2005) e o uso da citocina G-CSF a fim de minimizar e prevenir as lesões (TÖGEL et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2012) foram bem sucedidos de acordo com a prévia proposta.

6.1 Progressão das Alterações Morfológicas

Estudos morfológicos, com especial atenção ao rim, descrevendo modificações tissulares causadas por eventos isquêmicos, e subsequente episódio de reperfusão, há muito já são caracterizadas (DIETHELM; NILSON, 1971; GLAUMANN, 1975; TIGHE, 1977; BULKLEY, 1986; HELLBERG et al., 1990; LIEBERTHAL; NIGAM, 1998; DEVARAJAN, 2006).

O presente trabalho demonstra que a indução do processo isquêmico absoluto temporário, 40 minutos, seguido de nefrectomia do rim contralateral e 72 horas de reperfusão é eficiente para o aparecimento de lesões, majoritariamente tubulares, uma vez que estes são mais suscetíveis a danos deste caráter. E isso se deve ao fato de que a hipóxia severa intensifica o insulto isquêmico em locais cujo aporte sanguíneo já apresenta demora em manutenção tecidual (BREZIS; ROSEN, 1995) e cujas concentrações de oxigênio já são abaixo das condições normais – fala-se em 1 a 2% nas regiões tubulares (LIEBERTHAL; NIGAM, 1998; SEMENZA, 2009).

Com o processo inflamatório desencadeado, liberação de citocinas anti-inflamatórias e recrutamento de células quimiotáticas, há amplificação da resposta de reparo, nas quais predominam as de característica subletal, ou reversível, consistentes, principalmente, com degenerações hidrópicas: vacuolização celular, citoplasma granuloso, intumescimento celular, e aspecto baloniforme, cujas pequenas variações metabólicas mostram-se compatíveis com o processo de sobrevivência celular (NOGAE et al., 1997; PADANILAM, 2003; FEITOSA et al., 2005). E muitas destas respostas são em virtude de: 1) a permeabilidade à água, pelo túbulo proximal, é de longe maior que em túbulos distais – explicação ao rápido processo de intumescimento celular; 2) dois terços do túbulo proximal não suportam o metabolismo anaeróbico; e 3) células destes túbulos perdem sua polaridade mais rapidamente que em outros compartimentos celulares renais, estima-se que dez minutos de insulto isquêmico cause a perda desta polaridade (LIEBERTHAL; NIGAM, 1998).

É bem conhecida, ainda, que a diminuição exacerbada da produção energética demonstra-se como componente crítico à sustentação celular, evento amplificado ao restabelecimento do fluxo sanguíneo com posterior aumento de radicais livres circulantes (GRANGER, 1988; TAN et al., 1993; GRANGER; KORTHUIS, 1995; BONVENTRE; WEINBERG, 2003; RAHMAN et al., 2009; RAO et al., 2010; PARAJULI; QIAO et al., 2012; MacMILLAN-CROW, 2013).

A progressão leva ao estágio irreversível: aumento de pressões intracelulares insustentáveis, dissociação de actina do citoesqueleto, migração de proteínas integrais de membrana (Na-K-ATPase) de seus domínios polarizadores resultando em diminuição de adesão célula-célula (destituição de integrinas de suas membranas basais) (LIEBERTHAL; NIGAM, 1998; BARROS et al., 2001; PADANILAM, 2003), núcleos picnóticos, áreas de necrose levando à perda total de constituintes celulares (organelas) (WILLIAMS et al., 1996; BERRIDGE et al., 2000; BARROS et al., 2001; PADANILAM, 2003; JEONG et al., 2004), congestão tubular por células necróticas descamadas e destacamentos de células inteiras (LIEBERTHAL; NIGAM, 1998; PADANILAM, 2003; TIRAPELLI et al., 2009; McGLYNN et al., 2013).

Como efeito consequente à ativação inflamatória, posterior cicatrização e regeneração há secreção de citocinas pró-fibróticas, as quais induzem a diferenciação de pericitos, células contráteis que suportam a vasculatura principalmente dos capilares peritubulares, e também de miofibroblastos, os quais são residentes no mesênquima renal (SCHRIMPF; DUFFIELD, 2011; FARRIS; COLVIN, 2012; CAMPANHOLLE et al., 2013; DUFFIELD et al., 2013; LeBLEU et al., 2013; REICH et al., 2013; TANG et al., 2013).

Interessantemente, nosso trabalho demonstrou que a deposição de colágeno ocorre focalmente entre túbulos contorcidos proximais, demonstrando o intenso remodelamento de componentes de matriz extracelular (HOHENESTER, 2014) que é descrito na literatura como fibrose túbulointersticial (LIU, 2011; KAISLING et al., 2013; TAMPE; ZEISBERG, 2014), fato pouco observado em trabalhos relacionados à análises pós-isquemias e reperfusão aguda (McGLYNN et al., 2013) ou pouco discutido a respeito da deposição de colágeno em modelos experimentais cuja janela de tratamento à isquemia é curta, com enfoque principalmente em doenças renais crônicas (EBARASI et al., 2011; LIU, 2011; CAMPANHOLLE et al., 2013; DUFFIELD et al., 2013; KAISLING et al., 2013; HUTCHISON et al., 2013; TANG et al., 2013; TAMPE; ZEISBERG, 2014) ou longos períodos pós-sobrevivência de eventos isquêmicos agudos (FORBES et al., 2000).

Contudo, de acordo com Campanholle e colaboradores (2013), Duffield e colaboradores (2013), Hutchison e colaboradores (2013), Reich e colaboradores (2013) ainda, que seja mínimo este desbalanço nos componentes de matriz extracelular após o primeiro dia de distúrbio na homeostase tissular, é suficiente para que seja iniciada uma cascata de sinalização que conflui para degradação da matriz e depósito patológico de fibras colágenas (FARRIS; COLVIN, 2012; LeBLEU et al., 2013; TANG et al., 2013).

As diversas observações referentes a túbulos são bastante discutidas, vide explicação acima, porém modificações pertinentes aos corpúsculos renais também são notadas, em especial suas células constituintes, os podócitos (KRIZ; LeHIR, 2005; SINGH et al., 2011; BARISONI, 2012; TESTAGROSSA et al., 2013). Primeiro ocorrem pequenas modificações no citoesqueleto dos podócitos acompanhado de seletividade defectiva (KUMAGI et al., 2012; IMASAWA; ROSSIGNOL, 2013), com

permanência do agente lesivo, há desestruturação dos prolongamentos secundários, os pedicelos, e, conseqüentemente, mudança em suas funções (OBEIDAT et al., 2012; IMASAWA; ROSSIGNOL, 2013; LIAPIS et al., 2013). Muito é falado de alterações em seus componentes formadores (laminina, colágeno do tipo IV, nefrina, agrinina, podocina) (ABRAHAMSON; JOHN, 1993; ABRAHAMSON, 1999; HARALDSSON; NYSTRÖM, 2012; KUMAGI et al., 2012) por síndromes genéticas, Alport é um exemplo (ABRAHAMSON et al., 2003; MINER, 2012), glomerulosclerose focal (D'AGATI et al., 2011), nefropatia diabética (JAIN, 2012), nefropatia associada a HIV (KLOTMAN, 1999; ROSS; KLOTMAN, 2002) e nefrosclerose hipertensiva (HILL, 2008).

Em nosso estudo foi comprovado que mecanismos danosos às funções glomerulares, em nosso caso a isquemia e reperfusão, causam alterações consistentes com outras patologias e destacam-se, para esta realidade, as seguintes modificações ultraestruturais: alteração endotelial; redução na densidade de fenestrações capilares; intumescimento celular endotelial, embora perceptível e não mensurado; perda de pedicelos sobre a face abluminal do capilar e espessamento da lâmina basal. Esses achados corroboram com estudos da literatura (ARAUJO-NASCIMENTO et al., 1976; TIGHE, 1977; KRIZ; LeHIR, 2005; FOGO; KON, 2010; BARISONI, 2012).

Após a lesão renal, em especial o de caráter agudo (foco do nosso estudo) há um aumento numérico de células circulantes derivadas da medula óssea e que podem migrar para o rim (KALE et al., 2003; TÖGEL; WESTENFELDER, 2004; TÖGEL et al., 2005). Este aumento está relacionado à produção de citocinas liberadas pelas próprias células renais lesionadas, incluindo-se o Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (G-CSF) (GUO; CANTLEY, 2010).

Somada à capacidade da medula óssea em responder à demanda fisiológica ou farmacológica, sob diferentes administrações de G-CSF e sua posterior complexação com seu receptor, iniciam-se cascatas moleculares de ação, caracterizada como granulopoiese estresse-induzida (PANOPOULOS; WATOWICH, 2008) demonstrado no presente estudo que sua ação protetora foi eficaz em animais tratados com este medicamento (TÖGEL; WESTENFELDER, 2004; TÖGEL et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2012).

Ainda de acordo com prévios estudos, o presente trabalho demonstrou que as lesões foram preservadas em seu estágio de reversibilidade, os núcleos apresentaram poucas modificações consistentes com necrose (picnose nuclear) (TÖGEL; WESTENFELDER, 2004; NOGUEIRA et al., 2012), contudo algumas áreas de distalização tubular foram notadas, indicando que uma vez ultrapassada o ponto de não reversibilidade o tecido não sustenta sua arquitetura morfológica, condizente com os progressos de morte celular (PADANILAM, 2003; DEVARAJAN, 2006). Ainda, pouco se estuda este modelo proposto: análise de isquemia/reperfusão renal seguida de tratamento por G-CSF, principalmente quando o foco é morfológico. Fato já muito bem encontrado na literatura com variedade de aplicação médica (WARD, 2007; LIONGUE et al., 2009; ADUSUMILLI et al., 2012): em tecido cardíaco (TAKANO et al., 2003; KÜETHE et al., 2004; BALDO, 2010), cerebral (SCHNEIDER et al., 2005; JUNG et al., 2007; SOLAROGLU et al., 2009), casos de neutropenia severa (SKOKOWA; WELTE, 2013; TOUW et al., 2013), câncer (CESARO et al., 2003; TOUW; VAN GEIJN, 2007; BEEKMAN; TOUW, 2010), danos hepáticos (FRIED et al., 2002), musculares (STRATOS et al., 2007; PITZER et al., 2008) e até como protetor à doença de Alzheimer (SANCHEZ-RAMOS et al., 2008).

6.2 Hipóxia, sua Proteína Indicativa e Angiogênese

Estudos relatam a melhoria das lesões por isquemia e reperfusão através da regulação da proteína Fator Induzível por Hipóxia-1 α (HIF-1 α), molécula chave na transcrição de outras proteínas adaptativas às condições de estresse metabólicos gerados pela hipóxia (WANG; SEMENZA, 1995; HIROTA; SEMENZA, 2005; NANGAKU et al., 2013).

Nosso trabalho foca o uso do G-CSF e seu efeito protetor, contudo a intercessão destas moléculas e suas respectivas vias não foram encontradas na literatura.

Adicionalmente, a neovascularização induzida tanto pelo evento hipóxico quanto pelo medicamento são corriqueiramente correlacionadas (BREIER, 2000; SEMENZA, 2007a; SEMENZA, 2007b; SEMENZA, 2014), seja em estudo *in vivo* (HEIDENREICH et al., 2008) ou *in vitro* (SEMENZA, 2003; SINGER; DAVIS, 2011), e mais uma vez, nosso trabalho torna-se inédito, tendo em vista a possibilidade de interação do G-CSF com a HIF-1 α .

Tratando-se de sua via oxigênio-dependente, é natural a não diferença de expressão da proteína nos diversos animais estudados: controle, isquêmico e tratado. Entretanto, a sua marcação em tecidos dependentes desta via pode ser explicada pela fase de reparo e recuperação. A HIF pode reaparecer dado que o consumo de oxigênio nos processos de proliferação celular e crescimento causem uma leve hipóxia (NANGAKU et al., 2013).

Adicionalmente, suas proteínas constituintes do complexo de poliubiquitinação – prolil-hidroxilases (PHDs 1-3) e asparagil-hidroxilase – Fator Inibidor da HIF (FIH) – têm expressão em distintas populações celulares renais: (i) PHD1, PHD2 e PHD3 ocorrem em túbulos distais e ductos coletores; e (ii) PHD1 e PHD3 em podócitos e em fibroblastos intersticiais (SCHÖDEL et al., 2009). Já o FIH, é expresso somente em túbulos distais e em podócitos (SCHÖDEL et al., 2010). Para tanto, a marcação ocorrida para HIF-1 α em rins isquêmicos pode ter acontecido em virtude tanto do processo de recuperação, intrínseco de qualquer órgão sob pós-trauma físico, quanto pela diversa regulação sofrida por suas proteínas ubiquitinadoras (BARDÓS; ASHCROFT, 2005).

Concomitantemente, para o modelo estudado, foi demonstrada a presença desta proteína indicadora de hipóxia em rins contralaterais, fato não esperado para a via oxigênio-dependente, com viabilidade de que a hiperóxia local auxilie neste resultado (SEMENZA, 2013). Contudo, é demonstrada que vias oxigênio-independente ocorrem (SEMENZA, 2009) e com o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), especialmente as oriundas de mitocôndrias, há contribuição para a estabilização da HIF-1 α (CAMELO et al., 2006).

Uma outra, e possível, explicação é a formação de grânulos de estresse, complexos protéicos formados durante períodos de estresse, evidências embasadas em

estudos de combate ao ambiente hipóxico durante tratamento radioterápico (ZEPEDA et al., 2013).

Ainda, pode ser inferido que haja um efeito compensatório hemodinâmico, por parte do rim contralateral, tendo em vista o aumento no seu fluxo sanguíneo circulante. Porém, não são encontrados muitos trabalhos que corroborem tais suposições (SUPAVEKIN et al., 2003).

Foi demonstrado também que em animais tratados com G-CSF não há diferença na expressão de HIF-1 α , porém pode-se admitir que seu surgimento, principalmente em via oxigênio-dependente, decorre primariamente de proteínas superexpressas, a exemplo da proteína quinase C (PKC), e que aumentam a transcrição de moléculas oriundas da sinalização por HIF (ZIELLO et al., 2007). E a relação está no fato de que a PKC não só aumenta estes produtos como interfere nas suas funções conjuntamente com a via do Fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K), via congruente de ação do G-CSF (HAMILTON, 2008).

Individualmente, e como resposta adaptativa mais marcante, a transcrição do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) foi demonstrada em todas as amostras, o que paradoxalmente aparenta um resultado inespecífico. Porém é válido lembrar que as diferentes ativações ocorridas, em ambos os rins, causaram esta resposta. E mais importante ainda é demonstrar que o VEGF foi superexpresso em animais isquêmicos, corroborando o efeito angiogênico da HIF (SEMENZA, 2009; REY; SEMENZA, 2010; KROCK et al., 2011).

Já o efeito angiogênico decorrente do G-CSF advém de sua capacidade em estimular os granulócitos a produzirem VEGF, especialmente monócitos, células responsivas em lesão vascular (MINAMINO et al., 2005).

Entretanto, a falta de correlação entre estes dois marcadores protéicos sugerem que o rim pode ter desenvolvido uma regulação única para o VEGF, considerando-se sua presença no citoplasma basolateral de células tubulares renais (KANELLIS et al., 2000) e que pode ter sua regulação afetada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (SCHRIJVERS et al., 2004).

6.3 Hipóxia, G-CSF, Efeitos proliferativos e Morte Celular

A morte celular é reconhecidamente um dos eventos marcantes durante o evento IR e pode ainda impactar na função renal independente da inflamação. Somado à subsequente ativação da HIF no processo de morte celular, cuja desestabilização da membrana mitocondrial, e liberação do citocromo c (GREIJER; van der WALL; 2004), a isquemia resulta em apoptose e necrose e a restauração do fluxo sanguíneo paradoxalmente potencializa a resposta inflamatória e agrava os danos teciduais (DEVARAJAN, 2006).

A avaliação do efeito protetor do fármaco foi feita através do da proteína Ki67 e do método terminal deoxinucleotidil transferase mediado por dUTP final de marcação (método TUNEL) e para ambas foi positivo o efeito, sendo coerente com diversos estudos experimentais com outros fármacos (KELLY et al., 2004; HU et al., 2011; QIAO et al., 2012; AN et al., 2013; PARAJULI; MacMILLIAN-CROW, 2013).

Foi mais pronunciada a marcação para células em morte celular em animais do grupo isquêmico, sendo retornada à condição de “normalidade” comparando-se os dos grupos controle e tratados. Adicionalmente, células em estado proliferativo foram mais proeminentes detectadas em amostras isquêmicas (SUPAVEKIN et al., 2003), indicando que a HIF atua de forma análoga ao efeito de sobrevivência do G-CSF, mas que também o medicamento estimula a repopulação celular renal (LIONGUE et al., 2009).

E a explicação para tais efeitos advêm das rotas metabólicas com as quais o GCSF ativa, vias estas estritamente relacionadas com o complexo tirosina-quinases, os quais implicam em atividade mitogênica e por consequência de sobrevivência celular: Janus tirosina quinase/transdutor e ativador de sinal de transcrição (JAK/STAT), Fosfatidilinositol 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) e p21^{RAS}/ proteína kinase mitogênica ativada (MAPK) (HARADA, 2005; FLEETWOOD et al., 2006).

7. CONCLUSÕES

Os achados morfológicos são condizentes com os estudos previamente descritos, tanto às modificações arquiteturais decorrentes da isquemia/reperfusão induzida quanto para o tratamento em preservar a característica tecidual.

Ainda, as expressões de HIF-1 α não se mostraram significativas, fossem em rins contralaterais ou isquêmicos, contudo são achados importantes no que diz respeito à elucidação das vias. Especialmente para o modelo proposto, cujas descrições limitam-se aos estudos de doenças isquêmicas variadas (cerebrais, cardíacas), e o tipo de tratamento utilizado.

Já o VEGF apresentou comportamento de acordo com o esperado, por sinalização em virtude do evento isquêmico, e menos acentuada em conjunto com o medicamento.

Os efeitos proliferativos e de retardo do processo de morte celular foram coerentes com esperado e mostraram-se positivos para o tratamento proposto.

Por este motivo, os presentes resultados abrem perspectiva da utilização biológica da proteína HIF-1 α em simultânea congruência com o G-CSF. Indicando, também, necessidade de estudos futuros que visem o entendimento tanto deste glicoproteína protetora como suas correlações em outras rotas metabólicas.

8. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSON, D. R.; ST. JOHN, P. L. Laminin distribution in developing glomerular basement membranes. **Kidney International**. v.43, p. 73—78. 1993.

ABRAHAMSON, D. R. Glomerular endothelial cell development. *Kidney International*. v.56. p.1597-1598. 1999.

ABRAHAMSON, D. R.; PRETTYMAN, C.; ROBERT, B; ST.JOHN, P. L. Laminin-1 reexpression in Alport mouse glomerular basement membranes1 **Kidney International**. v. 63. p.826-834. 2003.

ABRAHAMSON, D. R. Organogenesis Forum: Development of kidney glomerular endothelial cells and their role in basement membrane assembly. **Organogenesis**. v.5, n.1. p.275-287. 2009.

ADUSUMILLI, A.; RAO, R.; KROTHAPALLI, S. R. The clinical applications of Hematopoietic growth factor – GCSF. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**. v.2. n.14. p.1-10. 2012.

AN, Y.; ZHANG, J.; HAN, J.; YANG, H.; TIE, L.; YANG, X.; XIAOKAITI, Y.; PAN, Y.; LI, X. Hypoxia-Inducible Factor-1 α dependent pathways mediate the renoprotective role of acetazolamide against renal ischemia-reperfusion injury. **Cellular Physiology and Biochemistry**. p. 1151-1166. 2013.

ANAYA-PRADO, R.; TOLEDO-PEREYRA, L. H.; LENTSCH, A. B.; WARD, P. A. Ischemia/reperfusion injury. **Journal Surgery Research**. v.105. p.248-258. 2002.

ARAUJO-NASCIMENTO, M. F.; DÉSORMEAUX, Y.; CANTIN, M. Ultrastructural Cytochemistry of the Ischemic (Endocrine) Kidney. **The American Journal of Pathology**. v.82. n.3. p.527-548. 1976.

ARISAWA, E. A. L.; MORAES, E.; da ROCHA, R. F.; ALMEIDA, J. D. Marcadores Biológicos: PCNA e Ki-67. Breve Revisão. **Revista da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos**. v.2. n.1. 1999.

AVALOS, B. R. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. **Blood**. v.88. p.761-777. 1996.

BAEK, J. H.; MAHON, P. C.; OH, J.; KELLY, B.; KRISHNAMACHARY, B.; PEARSON, M.; CHAN, D. A.; GIACCIA, A. J.; SEMENZA, G. L. OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1- α and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1 α . **Molecular Cell**. n.17. p.503–512. 2005.

BALDO, M. P.; RODRIGUES, S. L.; MILL, J. G. Granulocyte colony-stimulating factor for ischemic heart failure: should we use it? **Heart Failure Review**. v.15 p.613-623. 2010.

BALDWIN, P.; LASKEY, R.; COLEMAN, N. Translational approaches to improving cervical screening. **Nature Reviews Cancer**. v. 3. p.217-226. 2003.

BÁRDOS, J. I.; ASHCROFT, M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1755. p.107-120. 2005.

BARISONI, L. Podocyte Biology in Segmental Sclerosis and Progressive Glomerular Injury. **Advances in Chronic Kidney Disease**. v.19. n.2. p.76-83. 2012.

BARROS, L. F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v.130. p.401-409. 2001.

BEEKMAN; TOUW. G-CSF and its receptor in myeloid malignancy. **Blood**. p.115-125. 2010.

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signaling. **Nature Reviews on Molecular Cell Biology**. v.1. p.11-21. 2000.

BONVENTRE, J. V.; WEINBERG, J. M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. **The Journal of American Society of Nephrology**. v.14. p.2199-2210. 2003.

BONVENTRE, J. V.; YANG, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **The Journal of Clinical Investigation**. v.121, n.11, p.4210-4221. 2011.

BRAHIMI-HORN, M. C.; CHICHE, J.; POUYSSÉGUR, J. Hypoxia signaling controls metabolic demand. **Current Opinion in Cell Biology**. v.19. p.223–229. 2007.

BRACKEN, C. P.; WHITELOW, M. L.; PEET, D. J. The Hypoxia-Inducible Factors: key transcriptional regulators of hypoxic response. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.60. p.1376-1393. 2003.

BREIER, G. Angiogenesis in Embryonic Development—A Review. **Placenta and Trophoblast Research Cell Biology**. Supplement A. n.21, v.14, S11–S15. 2000.

BREZIS, M.; ROSEN, S. Hypoxia of the renal medulla: its implication for disease. **New England Journal of Medicine**. v.332. p.993-1061. 1986.

BRUICK, R. K.; MCKNIGHT S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. **Science**. n.294, p.1337-40. 2001.

CAMPANHOLLE, G.; LIGRESTI, G.; GHARIB, S. A.; DUFFIELD, J. S. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. **The American Journal of Cell Physiology**. n.304. C591-C603. 2013.

CANTIN, M.; SOLYMOSS, B.; BENCHIMOL, S.; DESOEMEAUX, Y.; LANGLAIS, J.; BALLAK, M. Metaplastic and mitotic activity of the ischemic (endocrine) kidney in experimental renal hypertension. **The American Journal of Pathology**. v.96. p.545-565. 1979.

CARAMELO, C.; PEÑA, J. J.; CASTILLA, A. Respuesta a la hipoxia: um mecanismo sistêmico basado em el control de la espresión gênica. **Medicina**. v.66. p.155-164. 2006.

CARDEN, D. L.; GRANGER, D. N. Pathophysiology of ischaemia/reperfusion injury. **Journal of Pathology**. v.190, p. 255-266. 2000.

CESARO, S.; CHINELLO, P.; DE SILVESTRO, G.; MARSON, P.; PICCO, G.; VAROTTO, S. Granulocyte transfusions from G-CSF stimulated donors for the treatment of severe infections in neutropenic pediatric patients with onco-haematological diseases. **Support Care Cancer**. v.11. p.101-106. 2003.

CHOWDHURY, R.; HARDY, A.; SCHOFIELD, C.J. The human oxygen sensing machinery and its manipulation. **Chemical Society Review**. n.3. p.1308–1319. 2008.

COULTAS, L.; CHAWEMGSAKSOPHAK, K.; ROSSANT, J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. **Nature Insight Review**. v.438. p.937-945. 2005

D'AGATI, V. D.; KASKEL, F. J.; FALK, R. J. Focal segmental glomerulosclerosis. **New England Journal of Medicine**. v.365. n.25. p.2398. 2011.

DEHNE N, BRUNE B. HIF-1 in the inflammatory microenvironment. **Experimental Cell**. v.315 p.1791-1797. 2009.

DEVERAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **Journal of The American Society of Nephrology**. v.17. p.1503-1520. 2006.

DIETHELM, A. G.; NILSON, S. J. Obstruction to the renal microcirculation after the temporary ischemia. **Journal of Surgery Research**. n.11. p.265-276. 1971.

DUFFIELD, J. S.; LUPHER, M.; THANNICAL, V. J.; WYNN, T. A. Host responses in tissue repair and fibrosis. **Annual Review in Pathology: Mechanism of Disease**. n.8. 241-276. 2013.

EBARASI, L.; ODDSSON, A.; HULTENBY, K.; BETSHOLTZ, C.; TRYGGVASON, K. Zebrafish: a model for the study of vertebrate renal development, function, and pathophysiology. **Current Opinion on Nephrology Hypertension**. v.20. p.416-424. 2011.

EPSTEIN, A. C.; GLEADLE, J. M.; MCNEILL L. A. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. **Cell**. v.107. p.43-54. 2001.

FAN C.; ZWACKA, R. M.; ENGELHARD, J. F. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. **Journal of Molecular Medicine**. v.77. p.577-592. 1999.

FEITOSA, E. A. N.; TAHA, M. O.; FAGUNDES, D. J.; TAKYIA, C. M.; CARDOSO, L. R.; CAMPOS, D. M. Estudo da morfologia renal após a oclusão da aorta abdominal infra-renal em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v.32. n.4. 2005.

FERRIS, A. B.; COLVIN, R. B. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. **Current Opinion on Nephrology Hypertension**. v.21. p.289-300. 2012.

FIBBE, W. E.; van DAMME, J.; BILLIAU, A.; DUINKEERKEN, N.; LURVINK, E.; RALPH, P.; ALTROCK, B. W.; KAUSHANSKY, K.; WILLEMZE, R.; FALKENBURG, J. H. Human fibroblasts produce granulocyte-CSF, macrophage-CSF, and granulocyte-macrophage-CSF following stimulating by interleukin-1 and poly(rI).poly(rC). **Blood**. v.72. p.860-866. 1988.

FLEETWOOD, A. J.; COOK, A. D.; HAMILTON, J. A. Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Critical Reviews in Immunology**. v.25. p.405-428. 2005.

FOGO, A. B.; KON, V. The glomerulus – a view from inside – the endothelial cell. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v.42. p.1388-1397. 2010.

FORBES, J. M.; HEWITSON, D.; BECKER, G. J.; JONES, C.L. Ischemic acute renal failure: Long-term histology of cell and matrix changes in the rat. **Kidney International**. v.57. p.2375-2385. 2000.

GLAUMANN, B.; GLAUMANN, H.; BEREZESKY, I. K.; TRUMP, B. F. Studies on the Pathogenesis of Ischemic Cell Injury. II. Morphological Changes of the Pars Convoluta (P₁ and P₂) of the Proximal Tubule of the Rat Kidney Made Ischemic *in vivo*. **Virchows Archives of B Cellular Pathology**. n.19. p.281-302. 1975.

GUARINO, M.; TOSONI, A.; NABULONI, M. Direct contribution of epithelial to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. **Human Pathology**. n.40. p.1365-1376. 2009.

GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **Journal of Immunology**. v.133. p.1710-1715. 1984.

GUO, J. K.; CANTLEY, L. G. Cellular Maintenance and Repair of the Kidney. **The Annual Review of Physiology**. v.72. p.357-376. 2010.

GRANGER, D. N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia/reperfusion injury. **The American Journal of Physiology**. n.255: p.1269-1275. 1988.

GRANGER, D. N.; KORTHUIS, R. J. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. **The Annual Review of Physiology**. n.57, p.311-332. 1995.

GREIJER, A. E.; van der WALL, E. The role of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. **Journal of Clinical Pathology**. p.1009-1014. 2004.

HARADA M, QIN Y, TAKANO H, MINAMINO T, ZOU Y, TOKO H. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. **Nature Medicine**. v.11. n.3. p.305-311. 2005.

HAMILTON, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. **Nature Reviews**. v.8. p.533-544. 2008.

HARALDSSON, B.; NYSTRÖM, J. The glomerular endothelial: new insight on function and structure. **Current Opinion on Nephrology Hypertension**. n.21. p.258-263. 2012.

HEIDENREICH, R.; MURAYAMA, T.; SILVER, M.; ESSL, C.; ASAHARA, T.; RÖCKEN, M.; BREIER, G. Tracking Adult Neovascularization during Ischemia and Inflammation Using Vegfr2-LacZ Reporter Mice. **Journal of Vascular Research**. v.45, p.437–444. 2008.

HIROTA, K.; SEMENZA, G. L. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 338, p.610–616. 2000.

HOHENESTER, E. Signalling complexes at the cell-matrix interface. **Current Opinion in Structural Biology**. n.29. p.10-16. 2014.

HÖLSCHER, M.; SILTER, M.; KRULL, S.; von AHLEN, M.; HESSE, A.; SCWARTZ, P.; WIELOCKX, B.; BREIER, G.; KATSCHINSKI, D. M.; ZEISENISS, A. Cardiomyocyte-specific Prolyl-4-hydroxylase Domain 2 Knock Out Protects from Acute Myocardial Ischemic Injury. **The Journal of Biological Chemistry**. v.286. n.13. p.1185-1194. 2011.

HUTCHISON, N.; FLIGNY, C.; DUFFIELD, J. S. Resident mesenchymal cells and fibrosis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1832. p.962-971. 2013.

HSU, H. W.; WALL, N. R.; HSUEH, C. T.; KING, S.; FERRIS, R. L.; CHEN, C. S.; MIRSHAHIDI, S. Combination antiangiogenic therapy and radiation in head and neck cancers. **Oral Oncology**. v.50, p.19-26. 2014.

IWANAGA, K.; TAKANO, H.; OHTSUKA, M.; HASEGAWA, H.; ZOU, Y.; QIN, Y.; ODAKA, K.; HIROSHIMA, K.; TADOKORO, H.; KOMURO, I. Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**. n.325. p.1353-1359. 2004.

IMASAWA, T.; ROSSIGNOL, R. Podocyte energy metabolism and glomerular diseases. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v.45. p.2109-2118. 2013

JAIN, M. Histopathological changes in diabetic kidney disease. **Clinical Queries: Nephrology**. v.102. p.127-133. 2012.

KAELIN, W. G. Jr. The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. n.338. p.627-638. 2005.

KAELIN, W. G. Jr; RATCLIFFE, P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. **Molecular Cell**. n.30 p.393–402. 2008.

KAISLING, B.; LeHIR, M.; KRIZ, W. Renal epithelial injury and fibrosis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1832. p.931-939. 2013.

KAMENSKY, L. et al. Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. **Bioinformatics**. v.15. n.8. p.1179-1180. 2011.

KANELLIS, J.; MUDGE, S. J.; FRASER, S.; KATERELOS, M.; POWER, D. Redistribution of cytoplasmic VEGF to the basolateral aspect of renal tubular cells in ischemia-reperfusion injury. **Kidney International**. v.37. p.2445-2456. 2000.

KAUSHANSKY, K.; LIN, N.; ADAMSON, J. W. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte–macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. Mechanism for the hematopoietic response to inflammation. **Journal of Clinical Investigation**. v.81. p.92-97. 1988

KELLY, K. J.; SUTTON, T. A.; WEATHERED, N, Minocycline inhibits apoptosis and inflammation in a rat model of ischemic renal injury. **The American Journal of Physiology. Renal Physiology**. v.287 p.F760. 2004.

KLOTMAN, P. E. HIV-associated nephropathy. **Kidney International**. v.56. n.3. p.1161-1176. 1999.

KRIZ, W.; LeHIR, M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases – Insights from animal models. **Kidney International**. v.67. p.404-419. 2005.

KROCK, B.L.; SKULI, N.; SIMON, M.C. Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. **Genes and Cancer**. v.12. n.2. p.1117-1133. 2011.

KUMAGAI, T.; MOUAWAD, F.; TAKANO, T. Pathogenesis of common glomerular diseases – role of the podocyte cytoskeleton. **Cell Health and Cytoskeleton**. n.4. p.103-118. 2012.

KUNZE, R.; ZHOU, W.; VELTKAMP, R.; WIELCOCKX, B.; BREIER, G.; MARTI, H. Neuron-specific Prolyl-4-Hydroxylase Domain 2 Knockout reduces brain injury after transient cerebral ischemia. **Stroke**. v.43. p.2748-2756. 2012.

LAMEIRE, N. H.; VANHOLDER, R. Pathophysiology of ischaemic acute renal failure. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**. v.18. n.1. p.21–36. 2004.

LeBLEU, V. S.; TADURI, G.; O'CONNELL, J.; TENG, Y.; COOKE, V. G.; WODA, C.; SUGIMOTO, H.; KALLURI, R. **Nature Medicine**. p.1-7. 2013.

LEE, M.; AOKI, M.; KONDO, T.; KOBAYASHI, K.; OKUMURA, K.; KOMORI, K.; MUROHARA, T. Therapeutic angiogenesis with intramuscular injection of low-dose recombinant granulocyte-colony stimulating factor. **Arteriosclerotic Thrombosis Vascular Biology**. v.25. p.2535-2541. 2005.

LENHOFF, S.; ROSBERG, B.; OLOFSSON, T. Granulocyte interactions with GM-CSF and G-CSF secretion by endothelial cells and monocytes. **European Cytokine Netw**. v.10. p.525-532. 1999.

LEVINE, A. J. et al. The Walter Hubert Lecture: The role of p53 tumour suppressor gene in tumorigenesis. **Br. J. Cancer**, v. 29. n. 3. p.409-416. 1994.

LIAPIS, H.; ROMAGNANI, P.; ANDERS, H. J. New Insights into the pathology of Podocyte Loss. **The American Journal of Pathology**. v.183. p.1-11. 2013.

LIEBERTHAL, W.; NIGAM, S. K. Acute Renal Failure. I. Relative importance of proximal vs distal tubular injury. **American Physiology Society**. p.F623-F636. 1998.

LI, Y.; FUKUDA, N.; YOKOYAMA, S. I. Effects of G-CSF on cardiac remodeling and arterial hyperplasia in rats. **European Journal of Pharmacology**. n.549. p.98-106. 2006.

LIONGUE, C.; WRIGHT, C.; RUSSEL, A. P.; WARD, A. C. Granulocyte colony-stimulating factor receptor: stimulating granulopoiesis and much more. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v.41. p.2372-2375. 2009.

LIU, Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. **Nature Reviews of Nephrology**. n.7. p.684-696. 2011.

LUO, L.; LUO, Q.; SUN, Z. Stable expression of hypoxia-inducible factor-1 α in human renal proximal tubular epithelial cells promotes epithelial to mesenchymal transition. **Transplantation Proceedings**. v.46. p.130-134. 2014.

McGLYNN, L. M.; ELLER, K.; MacDONALD, A. I.; MacINTYRE, A.; RUSSEL, D.; KOPPELSTAETTER, C.; DAVIES, R. W.; SHIELS, P. G. Pathfinder cells provides a novel therapeutic intervention for acute kidney injury. **Rejuvenation Research**. v.16. n.1. p.11-20. 2013.

MINER, J. H. The glomerular basement membrane. **Experimental Cell Research**. v.318. n.9. p.973-978. 2012.

NANGAKU, M.; ROSENBERG, C., BEYMAN, S. H.; ECKARDT, K. U. Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v.40. p.148-157. 2013.

NISHIDA, M.; HAMAOKA, K: How does G-CSF act on the kidney during acute tubular injury? **Nephron in Experimental Nephrology**. v.104. p.123-128. 2006.

NOGAE, S.; MIYAZAKI, M.; KOBAYASHI, N.; SAITO, T.; ABE, K.; SAITO, H.; NAKANE, P. K.; NAKANISHI, Y.; KOJI, T. induction of apoptosis in Ischemia-Reperfusion Model of Mouse Kidney: Possible Involvement of Fas. **Journal of the American Society of Nephrology**. p.620-631. 1997.

NOGUEIRA, B. V.; PALOMINO, Z.; PORTO, M. L.; BALARINI, C. M.; PEREIRA, T. M. C.; BALDO, M. P.; CASSARINI, D. E.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ, E. C. Granulocyte Colony Stimulating Factor Prevents Kidney Infarction and Attenuates Renovascular Hypertension. **Cellular Physiology and Biochemistry**. n.29, p.143-152. 2012

OBEIDAT, M.; OBEIDAT, M.; BALLERMANN, B. J. Glomerular endothelium: A porous sieve and formidable barrier. **Experimental Cell Research**. v.318. n.9. p.964-972. 2012.

OHTSUKA, M.; TAKANO, H.; ZOU, H. Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. **FASEB Journal**. v.18. p.851–853. 2004.

PADANILAM, B. J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **The American Journal of Renal Physiology**. n.284. F-608-F627. 2003.

PANOPOULOS, A.D.; WATOWICH, S. S. Granulocyte colony-stimulating factor: Molecular mechanisms of action during steady state and “emergency” hematopoiesis. **Cytokine**. v.42. p.277-288. 2008.

PARAJULI, N.; MacMILLIAN-CROW, A. Role of reduced manganese superoxide dismutase in ischemia-reperfusion injury: trigger for autophagy and mitochondrial biogenesis? **The American Journal of Physiology. Renal Physiology**. v.304. F257-F267. 2013.

PITZER, C.; KRÜGER, C.; PLASS, C.; KIRSCH, F.; DITTGEN, T.; MÜLLER, R.; LAAGE, R.; KASTNER, S.; SUESS,S.; SPOELGEN, R.; HENRIQUES, A.; EHRENREICH, H.; SCÄLBITZ, W. R.; BACH, A.; SCHNEIDER, A. Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Brain**. v.131. n.12. p.3335-3357. 2008.

PUGH, C. W.; O’ROURKE, J. F.; NAGAO, M. Activation of hypoxia-inducible factor-1: definition of regulatory domains within the alpha subunit. **Journal of Biology Chemistry**. v. 272:11205-14. 1997.

PUGH, C. W.; RATCLIFFE, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. **Nature Medicine**. v.9. n.6. p.677-684. 2003.

QIAO,X.; LI, R. S.; LI, H.; ZHU, G. Z.;HUANG, X. G.; SHAO, S. BAI, B. Intermedin protects against renal ischemia-reperfusion injury by inhibition of oxidative stress.

The American Journal of Physiology. Renal Physiology. v.304. p.F112-119. 2013.

RABENHORST, S. H., BURINI, R. C., SCHIMITT, F. C. L. Ciclo celular mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v.40. n.3. p.141-147. 1994.

RACUSEN, L. C. The morphologic basis of acute renal failure. **Acute Renal Failure.** p.1–12. 2001.

RAMASWAMY, M.; DENG, M.; SIEGEL, R. M. Harnessing programmed cell death as a therapeutic strategy in rheumatic diseases. **Nature Reviews in Rheumatology.** n.7. p. 152-160. 2011.

RANTANEN, K.; PURSIHEIMO, J.; HÖGEL, H. Prolyl Hydroxylase PHD3 Activates Oxygen-dependent Protein Aggregation. **Molecular Biology of the Cell.** v.19. p.2231-2240. 2008.

REICH, B.; SCHIMDBAUER, K.; GOMEZ, M. R.; HERMANN, F. J.; GÖBEL, N.; BRÜHL, H.; KETELSEN, I.; TALKE, Y.; MACK, M. Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model. **Kidney International.** v.84. p.78-89. 2013.

RIEDEMANN, R. R.; WARD, P. A. Complement in ischemia reperfusion injury. **American Journal of Pathology.** v.162. p.363-367. 2003.

REY, S.; SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodeling. **Cardiovascular Research.** v.86. p.236-242. 2010.

REXHEPAJ, E.; AGNARSDÓTTIR, M.; BERGMAN, J.; EDQVIST, P. H.; BERGGVIST, M.; UHLÉN, M.; GALLAGHER, W. M.; LUNDBERG, E.; PONTEN, F. A

Texture Based Pattern Recognition Approach to Distinguish Melanoma from Non-Melanoma Cells in Histopathological Tissue Microarray Sections. **PLOSone**. v.8. n.5. p.1-15. 2013.

ROSS, M. J.; KLOTMAN, P. E. Recent progress in HIV-associated nephropathy. **Journal of American Society of Nephrology**. v.13. n.12. p.2997-3004. 2002.

RUAS, J. L.; POELLINGER, L.; PEREIRA, T. Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. **Journal of Biology Chemistry**. v.277. p.38723-38730. 2002.

SCHARTE, M.; HAN, X.; BERTGES, D. J. Cytokines induce HIF-1 DNA binding and the expression of HIF-1-dependent genes in cultured rat enterocytes. **The American Journal of Physiology. Gastrointestine and Liver Physiology**. v.284. p.373–384. 2003.

SCHNEIDER, A.; KRÜGER, C.; STEIGLEDER, T.; WEBER, D.; PITZER, C.; LAAGE, R.; ARONOWSKI, J.; MAURER, M. H.; GASSLER, N.; MIER, W.; HASSLBLATT, M.; KOLLMAR, R.; SCHWAB, S.; SOMMER, C.; BACH, A.; KÜHN, H. G.; SCHABITZ, W. R. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. **Journal of Clinical Investigation**. v.115. p.2083-2098. 2005.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki67 protein: from the know to the unknow. **Journal of Cellular Physiology**. v.182. n.3. p.311-322. 2000.

SCHOLZEN, T.; ENDL, E.; WOHLBERG, C.; van der SAR, S.; COWELL, I. G.; GERDES, J.; SINGH, P. B. The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. **Journal of Pathology**. v.196. p.135–144. 2002.

SCHRIER, R. W.; WANG, W.; POOLE, B. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **Journal of Clinical Investigation**. p. 114-125. 2004.

SCHRIJVERS, B. F.; FLYBJERG, A.; VRISE, A. S. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. **Kidney International**. v.65. p.2003-2017. 2004.

SCHRIMPF, C.; DUFFIELD, J. S. Mechanisms of fibrosis: the role of the pericyte. **Current Opinion on Nephrology Hypertension**. v.20. 297-305. 2011.

SEMENZA, G. L.; AGANI, F.; BOOTH, G.; FORSYTHE, J.; IYER, N.; JIANG, B. H.; LEUNG, S.; ROE, R.; WIENER, C.; YU, A. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. **Kidney International**. v.51. p.553-555. 1997.

SEMENZA, G. L. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. **The Journal of Clinical Investigation**. v.106. n.7. p.809-812. 2000.

SEMENZA, G. L. Angiogenesis in Ischemic and Neoplastic Disorders. **Annual Reviews in Medicine**. v.54. p.17-28. 2003.

SEMENZA, G. L. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. **Journal of Cellular Biochemistry**. n.102. p.840–847. 2007a.

SEMENZA, G. L. Regulation of tissue perfusion in mammals by hypoxia-inducible factor 1. **Experimental Physiology – Symposium Reports**. v.6. p.988-991. 2007b.

SEMENZA, G. L. Regulation of oxygen homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. **Physiology**. n.24. p.97–106. 2008.

SEMENZA, G. L. Oxygen homeostasis. **Advanced Reviews: System Biology and Medicine**. v.2. n.3. p.336-361. 2009.

SEMENZA, G. L. Regulation of Metabolism by Hypoxia-Inducible Factor 1. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. p.347-353. 2011.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. **Cell**. v.148. p.399-408. 2012a.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. **Trends in Pharmacology Sciences**. v.33. n.4. p.207-214. 2012b.

SEMENZA, G. L. Oxygen sensing, Hypoxia-inducible factors and disease pathophysiology. **The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. v.9. p.47-71. 2014.

SENGER, D. R.; DAVIS, G. E. Angiogenesis. **Cold spring Harbor Perspectives in Biology**. n.3. p.1-19. 2011.

SINGH, S. K. S.; JEANSSON, M.; QUAGGIN, S. E. New insights into the pathogenesis of cellular crescents. **Current Opinion on Nephrology Hypertension**. n.20. p.258-262. 2011.

SITKOVSKY, M.; LUKASHEV, D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF-1 α and adenosine receptors. **Nature Reviews in Immunology**. v.5. p.712–721. 2005.

SKOKOWA, J.; WELTE, K. Defective G-CSFR signaling pathways in congenital neutropenia. **Hematology Oncology Clinics of North America**. v.27. p.75-88. 2013.

SOLAROGLU, I.; CAHILL, J.; TSUBOKAWA, T.; BESKONAKLI, E.; ZHANG, J. Granulocyte colony-stimulating factor protects the brain against experimental stroke via inhibition of apoptosis and inflammation. **Neurological Research**. v.31. n.2. p.167-172. 2009.

STRATOS, I.; ROTTER, R.; EIPEL, C.; MITTLMEIER, T.; VOLLMAR, B. Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats. **Journal Applied Physiology**. v.103. p.1857–1863. 2007.

SUPAVEKIN, S.; ZHANG, W.; KUCHERLAPATI, R.; KASKEL, F. J.; MOORE, L. C.; DEVARAJAN, P. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. **Kidney International**. v.63. p.1714-1724. 2003.

TAKANO, H.; HASEGAWA, H.; KUWABARA, Y.; NAKAYAMA, T.; MATSUNO, K.; MIYAZAKI, Y.; YAMAMOTO, M.; FUJIMOTO, Y.; OKADA, H.; OKUBO, S.; FUJITA, M.; SHINDO, S.; KOBAYASHI, Y.; KOMIYAMA, N.; TAKEKOSHI, N.; IMAI, K.; HIMI, T.; ISHIBASHI, I.; KOMURO I. Feasibility and safety of granulocyte colony-stimulating factor treatment in patients with acute myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**. v.122. p.41-47. 2007.

TAMPE, D.; ZEISBERG, M. Potential approaches to reverse or repair renal fibrosis. **Nature Reviews in Nephrology**. n.10. p.226-237. 2014.

TAN, S.; YOKOYAMA, Y.; DICKENS, E.; CASH, T. G.; FREEMEN, B. A.; PARKS, D. A. Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock. **Free Radiology in Biology Medicine**. n.15, p.407-414. 1993.

TANG, J.; LIU, N.; TOLBERT, E.; PONNUSAMY, M.; MA, L.; GONG, R.; BAULISS, G.; YAN, H.; ZHUANG, S. Sustained activation of EGFR triggers renal fibrogenesis after acute kidney injury. **The American Journal of Pathology**. v.183. n.1. p.160-172. 2013.

TESTAGROSSA, L.; AZEVEDO, R. N.; RESENDE, A.; WORONIK, V. Immunohistochemical expression of podocyte markers in the variants of focal segmental glomerulosclerosis. **Nephrology Dialysis Transplant.** n.28. p.91-98. 2013.

TIRAPELLI, L. F.; BARIONE, D. F.; TRAZZI, B. F. M.; TIRAPELLI, D. P. C.; NOVAS, P. C.; SILVA, C. S.; MARTINEZ, M.; COSTA, R. S.; TUCCI, S. Jr.; SUAID, H. J.; COLOGNA, A. J.; MARTINS, A. C. P. Comparison of two models for evaluation histopathology of experimental renal ischemia. **Transplantation Proceedings.** n.41. p.4083-4087. 2009.

TIGHE, J. R. The pathology of renal ischemia. **Journal of Clinical Pathology.** v.30. Suppl. n.11. p.114-124. 1977.

TÖGEL, F.; ISAAC, J.; WESTENFELDER, C. Hematopoietic Stem Cell Mobilization–Associated Granulocytosis Severely Worsens Acute Renal Failure. **Journal of American Society of Nephrology.** n.15, p. 1261–1267. 2004.

TOUW, I. P.; van de GEIJN, G. N. Granulocyte Stimulating Factor and its receptor in normal myeloid cell development, leukemia and related blood cell disorders. **Frontiers in Bioscience.** v.12. p.800-815. 2007.

TOUW, I. P.; PALANDE, K.; BEEKMAN, R. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor signaling. Implications for G-CSF responses and leukemic progression in severe congenital neutropenia. **Hematology Oncology Clinics of North America.** n.27. p.61-73. 2013.

VAUX, D.; SILKE, J. Mammalian mitochondrial IAP-binding proteins. **Biochemistry and Biophysics Research Communication.** v.304. n.3. p.499-504. 2003.

VANDERVELDE, S.; van LUYN, M. J. A.; ROZENBAUM, M. H.; PETERSEN, A. H.; TIO, R. A.; HARMSSEN, M. C. Stem cell-related cardiac gene expression early after murine myocardial infarction. **Cardiovascular Research.** v.73. p.783-793. 2007.

WANG, G. L.; SEMENZA, G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**. v.90 p.4304-4308. 1993.

WARD, A. C. The role of the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSF-R) in disease. **Frontiers in Bioscience**. v.12. p.608-618. 2007.

WILLIAMS, P.; LOPEZ, H.; BRITT, D.; CHAN, C.; EZRIN, A.; HOTTENDORF, R. Characterization of Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. v.37. p.1-7. 1996.

ZEPEDA, A. B.; PESSOA Jr., A.; CASTILLO, R. L.; FIGUEROA, C. A.; PULGAR, V. M.; FARÍAS, J. G. Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. **Cell Biochemistry and Function**. v.31. p.451-459. 2013.

ZIELLO, J. E.; JOVIN, I. S.; HUANG, Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for the therapeutic intervention in malignancy and ischemia. **Yale Journal of Biology and Medicine**. v.80. p.51-60. 2007.



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 Siqueira
COPIL-UES/USP/Manaus/UFPA/UFES
Presidente CEUA-UFES

Vitória (ES), 20 de dezembro de 2013.