

Fernando Nestor Facio Júnior

Efeitos da Anexina1 na Isquemia e  
Reperusão Renal: Estudo Funcional  
e Histopatológico em Modelo  
Experimental

São José do Rio Preto  
2006

Fernando Nestor Facio Júnior

Efeitos da Anexina1 na Isquemia e  
Reperusão Renal: Estudo Funcional e  
Histopatológico em Modelo  
Experimental

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de São José do Rio Preto para  
obtenção do título de Doutor no Curso de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde,  
Eixo Temático: Medicina Interna.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel de A. Burdmann

Co-Orientadores: Profa. Dra. Sônia Maria Oliani, e  
Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

São José do Rio Preto  
2006

Facio Júnior, Fernando Nestor

Efeitos da Anexina1 na Isquemia e Reperusão Renal: Estudo Funcional e Histopatológico em Modelo Experimental / Fernando Nestor Facio Júnior

São José do Rio Preto, 2006

70 p.;

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann

Co-Orientadores: Profa. Dra. Sônia Maria Oliani, e

Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

1. Isquemia; 2. Reperusão; 3. Anexina-1; 4. Necrose tubular aguda.

Aos meus filhos, **Leonardo e Maria Fernanda**, que sempre compreenderam os momentos de ausência a que a vida profissional me obriga, pelo apoio, amor e carinho e pelo tanto que me recompensam a cada momento. Representam minha razão de existir.

Aos meus pais, **Nestor e Lenira**, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com sabedoria e lutar pelos meus objetivos.

A minha noiva, **Renata Tiemi**, pelo carinho e nunca poupou o incentivo à busca desses ideais.

## ***Agradecimentos Especiais***

---

Ao **Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann**, pelo seu empenho e prestígio na busca dos meios e dos recursos necessários à consecução deste projeto; por orientar-me e estimular-me continuamente, para alcançar o que me parecia impossível.

Ao **Prof. Dr. Reinaldo Azoubel**, pelo incentivo, dedicação e carinho com que me orientou na edificação deste trabalho, proporcionando-me não só obter conhecimento científico mas, sobretudo, humano.

À **Profa. Dra. Sonia Maria Oliani**, pela sua acolhida, por não economizar seu empenho, ajuda, e também pela tão necessária firmeza de propósitos.

## **Agradecimentos**

---

A **Deus**, por todas as oportunidades que tem me dado na vida;

À **Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)**, que, muito além da Graduação Médica e da Pós-Graduação, tem me propiciado as condições necessárias para a verdadeira formação profissional e humanística;

Ao **Prof. Dr. Luis Yu**, pelo indispensável auxílio e incentivo nas várias etapas da realização deste trabalho e pelo exemplo de profissionalismo;

Aos **Profs. Drs. Carlos Abib Cury, José Carlos Mesquita, José Germano Ferraz de Arruda e Sergio José de Almeida**, companheiros da Disciplina de Urologia, pela amizade e pelo suporte durante minhas ausências;

Aos **colegas da Disciplina de Urologia, Profs. Pedro F. Ferraz de Arruda, Ana Paula Bogdan Sansão e Marcio Gatti**, pelo incentivo e companheirismo;

Ao **Colega Luis César Spessoto**, pela amizade e apoio constante ao meu trabalho;

À **Profa.Dra.Glória Elisa Florido Mendes**, por sua indispensável colaboração e organização do Laboratório de Fisiologia Renal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto;

À **Pós-graduanda Angela A. S. de Sena**, do Laboratório de Morfologia, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, que sempre esteve presente colaborando, apoiando e incentivando, gostaria de expressar o meu mais profundo agradecimento;

Aos amigos **José Antonio Silistino, Fabiana Cristina de Godoy, e Rosimeire Desidério**, da Secretária de Pós-Graduação, pela colaboração, carinho e apoio recebidos;

Ao **Luis Henrique Oliveira Ferreira, Edilson Solim e Juceléea Soares da Silva**, do Núcleo de Apoio Pedagógico da FAMERP, pelo esforço, dedicação e editoração gráfica deste trabalho;

Ao Sr. **Pedro de Freitas**, funcionário do Biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. José Perozim**, pela amizade e pelo indispensável auxílio da correção ortográfica;

Ao **David Andrew Hewitt**, pela dedicação e gentileza pelo auxílio da correção ortográfica.

“Vencem na vida os que a encaram com permanente otimismo. Vencem sempre os que sabem lutar, sem perderem a direção da vitória. Vencem aqueles que começam a luta pensando que, por mais árdua que seja, ela os leva para o endereço que se propuseram, sem pensar em derrotas. Vencem aqueles que não desanimam em face das dificuldades e, para os quais, os obstáculos servem como degraus para a subida e para a consecução dos objetivos”.

**Anônimo**

**Lista de Figuras**

---

Figura 1.	Histograma das médias de peso dos ratos.....	19
Figura 2.	Histograma representando as médias dos volumes urinários....	20
Figura 3.	Histograma representado as médias de taxa de filtração glomerular (Cin,ml/min/100g.).....	21
Figura 4.	Histograma representando o índice de excreção fracional de sódio (%)......	22
Figura 5.	Histograma representado os índices da fração de excreção de potássio (%)......	23
Figura 6.	Histograma representando a Osmolalidade urinário (U/P osm).	24
Figura 7.	Córtex renal após dois dias de reperfusão.....	28
Figura 8.	Medula renal após dois dias de reperfusão.....	30
Figura 9.	Neutrófilos no córtex e na medula em modelo de I/R.....	32
Figura 10.	Córtex renal de ratos analisados após sete dias de reperfusão.	35
Figura 11.	Medula renal de ratos analisados após sete dias de reperfusão	37

***Lista de Tabelas***

---

Tabela 1. Análise quantitativa de neutrófilos em isquemia e reperfusão renal em ratos.....	34
--	----

**Lista de Abreviaturas e Símbolos**

---

Anx-A1	- Anexina 1
ATP	- Adenosina trifosfato
BE	- Borda em escova
CEEA	- Comissão de Ética na experimentação animal.
CSA	- Ciclosporina
EUA	- Estados Unidos da América
FAMERP	- Faculdade de Medicina de São José Rio Preto
Fek	- Excreção fracional de potássio
FeNa	- Excreção fracional de sódio
FK	- Tracolimus
GC	- Glicocorticóide
IBILCE	- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
IL	- Interleucina
ILAR	- Institute of laboratory animal resources
I/R	- Isquemia e reperfusão
IRA	- Insuficiência renal aguda
kf	- Coeficiente de permeabilidade
LC1	- Lipocortin –1
LRGold	- London Resin
MB	- Membrana basal
MPO	- Mieloperoxidase miocárdica
NaCl	- Cloreto de sódio

NTA	-	Necrose tubular aguda
NY	-	Nova York
OAR	-	Obstrução de artéria renal
Osmol	-	Osmolalidade
P	-	Erro alfa
PAM	-	Pressão Arterial Média
PBS	-	Solução tampão fosfato
PE	-	Cateter de Polietileno
RFG	-	Ritmo de filtração glomerular
SEM	-	Erro padrão da média
SHAM	-	Grupo controle
TCD	-	Túbulos contorcidos distais
TCP	-	Túbulos contorcidos proximais
UNESP	-	Universidade Estadual de São Paulo
V	-	Vacúolos
Veic	-	Veículo

O presente estudo objetivou investigar os efeitos do uso da anexina 1 (Anx-A1), considerada proteína antiinflamatória e que está presente na maioria das células. Caracteriza-se pela sua habilidade em ligar-se ao cálcio e fosfolípídeos, conferindo proteção contra os efeitos iniciais da lesão por isquemia e reperfusão. Realizou-se nefrectomia à direita em 48 ratos (Wistar-adultos-machos), pesando entre 250-300 gramas, mantidos com dieta normosódica, normoprotéica e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em 3 grupos: Anexina 1-Isquemia (Anx-A1-I/R) (n=16), Veículo(PBS-40)-Isquemia (Veic-I/R) (n=16) e grupo Sham (n=16). A administração de anexina1 (100µg) endovenosa foi realizada 30 minutos antes do clampeamento da artéria renal esquerda. Após reperfusão, os animais de cada grupo foram divididos e estudados com 2 e 7 dias, quanto às funções glomerulares, tubulares e à estrutura renal. Os resultados mostraram que houve redução da taxa de filtração glomerular (RFG) nos grupos veículo-I/R com 2 e 7 dias de experimento ( $0,42 \pm 0,02$  ml-min-100g e  $0,48 \pm 0,05$  ml-min-100g, respectivamente) e verificamos aumento significativo da taxa de filtração glomerular nos grupos Anx-A1-I/R comparados aos grupos veículo-I/R ( $0,86 \pm 0,05$ ml-min-100g e  $0,73 \pm 0,04$ ml-min-100g, respectivamente). Observou-se diferença significativa entre os grupos Anx-A1-I/R e Sham com 7 dias ( $p < 0,01$ ). A excreção fracional de sódio (FeNa) apresentou-se significativamente aumentada nos grupos veículo-I/R, comparada aos grupos Anx-A1-I/R e Sham nos 2º e 7º dias de experimento; apresentando assim no 2º dia de estudo, Anx-A1-I/R ( $0,17 \pm 0,01\%$ ), Veic-I/R ( $0,42 \pm 0,03\%$ ) e Sham ( $0,21 \pm 0,01\%$ )

( $p < 0,001$ ); e no 7º dia, Anx-A1-I/R ( $0,27 \pm 0,03\%$ ), Veic-I/R ( $0,52 \pm 0,03\%$ ) e Sham ( $0,29 \pm 0,01\%$ ) ( $p < 0,001$ ). A fração de excreção de potássio (FeK) com 2 e 7 dias de experimento não diferiram entre os grupos Anx-A1-I/R e Sham, mas a FeK aumentou significativamente nos grupos Veic-I/R. A razão das osmolalidades urinário-plasmáticas (U/Posm) mostraram uma redução importante nos grupos Veic-I/R em experimentos com 2 e 7 dias, comparados aos grupos Anx-A1-I/R e Sham. A avaliação histopatológica revelou aumento significativo de neutrófilos intravasculares e transmigrados, em áreas isquêmicas dos grupos Veic-I/R, de amostras avaliadas da porção do córtex renal com 2 e 7 dias. Verificaram-se altas taxas de transmigração de neutrófilos nas áreas de isquemia-reperfusão nos grupos Veic-I/R com 2 e 7 dias, em amostras avaliadas de medula renal. Houve significativa redução do extravasamento de neutrófilos em análise quantitativa, nas amostras de medula renal com 2 e 7 dias de estudo, nos grupos anexina 1-I/R, bem como menor taxa de neutrófilos no espaço intravascular. À microscopia de luz, verificou-se que, em amostras de córtex e medula renal, com 2 e 7 dias, o grupo Sham apresentou estruturas dos túbulos contorcidos proximais, distais e borda em escova bem preservados. Notou-se resultados semelhantes nos grupos de anexina1-I/R, com estruturas preservadas nos túbulos, membrana basal e glomérulos. Nos grupos Veic-I/R, verificou-se a presença de debris celulares no interior de túbulos contorcidos proximais, capilares dilatados e alterações na estrutura da membrana basal. Estes resultados sugerem que a administração da anexina1, trinta minutos antes da isquemia renal em ratos, previne a transmigração de neutrófilos e confere proteção contra os efeitos iniciais da

lesão por isquemia e reperfusão, bem como proteção das funções glomerulares, tubulares e da estrutura renal.

**Palavras-Chave:** 1. Isquemia; 2. Reperfusão; 3. Anexina 1; 4. Necrose tubular aguda.

The aim of the present study was to investigate the effects of the use of the anti-inflammatory protein annexin 1 (Anx-A1), which is found in most cells. It is characterized by its ability in binding to calcium and phospholipids, conferring protection against the initial effects of ischemia-reperfusion injury. Right nephrectomy was performed on 48 adult males Wistar rat, with sizes ranging between 250-300 g, maintained on a diet normosodic , normoprotein and with water *ad libitum*. The animals was divided into 3 groups: Annexin-1/Ischemia (Anx-A1-I/R) (n=16), vehicle (PBS40)-Ischemia (Vehicle-I/R) (n=16) and Sham Group (n=16). The endovenous administration of Anx-A1 (100 µg) was made 30 minutes before ischemia of the left renal artery. The animals of each group were divided and studied at 2 and 7 days post-reperfusion, in respect to the glomerular, tubular and renal structure functions. The results showed that there was a reduction in the glomerular filtration rate (GFR) in the Vehicle-I/R Groups at 2 and 7 days post-reperfusion ( $0.42 \pm 0.02$  mL/min-100g and  $0.48 \pm 0.05$  mL/min-100g, respectively). There was a significantly greater filtration rate in the Anx-A1-I/R Groups compared to the Vehicle-I/R Groups ( $0.86 \pm 0.05$  mL/min-100g and  $0.73 \pm 0.04$  mL/min-100g, respectively). A significant difference between the Anx-A1-I/R and Sham Groups (p-value < 0.01) was also observed (7days). The fractional sodium excretion (FeNa) was significantly higher in the Vehicle-I/R Groups when compared to the Anx-A1-I/R and Sham Groups on the 2<sup>nd</sup> and 7<sup>th</sup> post-perfusion days. On the 2<sup>nd</sup> day of the study, the fractional sodium excretion was  $0.17 \pm 0.01\%$  for the Anx-A1-I/R,  $0.42 \pm 0.03\%$  for the Vehicle-I/R and  $0.21 \pm 0.01\%$  for the Sham groups (p-value < 0.001). On

the 7<sup>th</sup> day, the values were  $0.27 \pm 0.03\%$ ,  $0.52 \pm 0.03\%$  and  $0.29 \pm 0.01\%$ , respectively (p-value < 0.001). The potassium excretion fraction (FeK) on the 2<sup>nd</sup> and 7<sup>th</sup> post-perfusion days did not differentiate between the Anx-A1-I/R and Sham Groups, but it was significantly higher in the Vehicle-I/R Groups. The urinary-plasmatic osmolality ratio (U/Posm) showed a significant reduction in the Vehicle-I/R Groups after 2 and 7 days when compared with the Anx-A1-I/R and Sham Groups. A histopathologic evaluation of renal cortex samples, taken on the 2<sup>nd</sup> and 7<sup>th</sup> post-perfusion days, revealed a significant increase in the intravascular and transmigrated neutrophils in ischemic areas of the Vehicle-I/R Groups. Additionally, high rates of transmigrated neutrophils were identified in the ischemia-reperfusion areas of samples of renal medulla from the Vehicle-I/R Group taken on the 2<sup>nd</sup> and 7<sup>th</sup> days. There was a significant reduction of the neutrophil transmigration in samples of renal medulla on the 2<sup>nd</sup> and 7<sup>th</sup> post-perfusion days in the Anx-A1-I/R Groups, as well as a lower intravascular neutrophil rate. On the 2<sup>nd</sup> and 7<sup>th</sup> post-perfusion days, the Sham Group presented with structures of distal and proximal convoluted tubules and well-preserved brush-border structures in the renal cortex and medulla samples as seen by light microscopy. Similar results were evidenced in the Anx-A1-I/R Groups with preserved structures in the tubules, basal membrane and glomeruli. In the Vehicle-IR Groups, numerous monocytes, cellular debris inside proximal convoluted tubules, dilated capillaries and alterations in the basal membrane structure were seen. These results suggest that the administration of annexin-1 thirty minutes before renal ischemia in rat, prevents the transmigration of neutrophils and confers protection against the initial effects of

ischemia-reperfusion injury, as well as providing protection to the glomerular, tubular and renal structure functions.

**Key-Words:** 1. Ischemia; 2. Reperfusion; 3. Annexin 1; 4. Acute necrosis tubular.

## Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos Especiais.....	ii
Agradecimentos .....	iii
Epígrafe .....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xiii
<b>1. Introdução .....</b>	<b>01</b>
1.1. Objetivos .....	09
<b>2. Material e Método.....</b>	<b>10</b>
2.1. Animal e Dieta.....	11
2.2. Nefrectomia.....	11
2.3. Estudo da Função Renal.....	13
2.4. Estudo Histopatológico.....	15
2.5. Análise Estatística .....	17
<b>3. Resultados.....</b>	<b>18</b>
3.1. Peso e Volume Urinário .....	19
3.1.1. Peso .....	19
3.1.2. Volume Urinário .....	20
3.2. Função Renal.....	21
3.3. Fração de Excreção de Sódio .....	22

3.4.	Fração de Excreção de Potássio.....	23
3.5.	Osmolalidade .....	24
3.6.	Histopatologia .....	25
<b>4.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>Apêndices.....</b>	<b>63</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

A insuficiência renal aguda (IRA) caracteriza-se pelo declínio abrupto da função renal, resultando em acúmulo e/ou distúrbio da volemia e de material nitrogenado. Esta redução do ritmo de filtração glomerular (RFG) é manifestada pela elevação dos níveis plasmáticos de creatinina e uréia, que são os marcadores mais comuns da função renal e, geralmente, com diminuição do volume urinário diário.<sup>(1)</sup> Pode-se dividir a IRA em: pré-renal (diminuição do fluxo sangüíneo renal), pós-renal (obstrução do fluxo urinário) e renal (lesão do parênquima renal).<sup>(2)</sup> Quando a IRA se desenvolve, é rara a manifestação isolada de outras patologias prévias e representa uma situação freqüente na prática médica, fazendo parte da maioria dos estados mórbidos, com incidência estimada entre 0,76% dos pacientes hospitalizados, e 21% das internações em unidades de terapia intensiva, com alta incidência de mortalidade em torno de 50%, e não tem mostrado melhora significativa nas últimas quatro décadas.<sup>(3)</sup> Diante do quadro de IRA, os diagnósticos diferenciais podem ser extensos, incluindo patologias que afetam as artérias renais, glomérulos, túbulos ou interstício, assim como alterações que obstruem o fluxo urinário a partir dos rins. Apesar das múltiplas condições que podem determinar IRA em adultos, não temos um tratamento específico para esta síndrome clínica, refletindo em parte, o conhecimento relativamente pobre da fisiopatologia da IRA, no entanto, duas situações respondem por 70% a 75% de todas as causas: redução da perfusão renal (IRA pré-renal) e a necrose tubular aguda (NTA).<sup>(4)</sup>

A lesão renal devido à isquemia e reperfusão (I/R) é a maior causa de IRA em rins normais e pós transplante.<sup>(5)</sup> A redução do fluxo sanguíneo renal, decorrente da presença de toxinas ou isquemia, parece ser requisito para o desenvolvimento da NTA.<sup>(6)</sup>

A necrose tubular aguda é caracterizada pela perda aguda ou mais usualmente progressiva da função renal tubular e glomerular. A grande maioria dos pacientes com NTA têm como evento inicial, uma redução do fluxo plasmático renal ou exposição a um agente nefrotóxico. A NTA isquêmica, em humanos, apresenta uma evolução média de 7 a 21 dias, entretanto, a duração é extremamente variável e depende da gravidade e intensidade do episódio isquêmico além da presença de recorrência.<sup>(4,7)</sup>

A necrose tubular aguda (NTA) pós-isquemia é observada freqüentemente em pacientes após grandes cirurgias (cardíacas e aórticas), trauma, sepse, hipovolêmia severa, queimaduras e outros.<sup>(8)</sup> Adicionalmente, com a demora da recuperação da função renal após transplante, principalmente causada pela necrose tubular aguda pós-isquemia, temos menor tempo de sobrevida do enxerto.<sup>(9)</sup>

Além da NTA isquêmica já citada, existe também a NTA tóxica, causada pelo uso de drogas como: aminoglicosídeos, anti-fúngicos (Ex.:Anfotericina B), drogas imunossupressoras (Ex.:CSA, FK 506), anti-virais (Ex.:aciclovir), contrastes radiológicos, pigmentos (hemoglobina, mioglobina), metais pesados e venenos peçonhentos.<sup>(2)</sup> A fisiopatologia da NTA não se encontra completamente esclarecida, mas o foco das atenções localiza-se nos efeitos tubulares e vasculares. Podem-se dividir os efeitos das lesões isquêmica ou

tóxica em: **vasculares**, representados pela vasoconstrição e diminuição do coeficiente de permeabilidade do capilar glomerular (Kf), e **tubulares**, como obstrução e extravasamento. Estes eventos causam lesão e morte celular com a participação de diversos fatores bioquímicos e celulares, como diminuição das reservas energéticas de fosfatos (ATP), produção de radicais livres de oxigênio, aumento do cálcio intracelular, síntese de óxido nítrico, ativação de fosfolipases e alterações do citoesqueleto.<sup>(10)</sup>

Os processos de adesão e extravasamento leucocitário são partes essenciais da reação inflamatória nos tecidos lesados e infectados. Em diferentes condições patológicas, incluindo a isquemia e reperfusão, há extravasamento persistente de leucócitos, e estas células são responsáveis por danificar os tecidos e, subseqüentemente, levar a alterações irreversíveis na estrutura celular e funcionamento dos órgãos atingidos.<sup>(11)</sup>

Apesar de os sinais patológicos da IRA serem bem descritos, os tecidos lesados após isquemia não são apenas conseqüência da hipóxia tissular devido interrupção do suprimento de sangue arterial, mas também devido a reperfusão que ativa a resposta inflamatória, consistindo em recrutamento e marginalização de leucócitos e proliferação de células intersticiais. Este processo é desencadeado pela lesão endotelial e de células do parênquima através da liberação de citocinas e complementos, iniciando uma série de eventos que termina com forte adesão leucocitária e migração transendotelial.<sup>(5)</sup> Recentemente pesquisas mostram o papel dos neutrófilos na patogênese da I/R e também a presença de monócitos/macrófagos e linfócitos T em modelos experimentais de I/R. Dependendo da intensidade da

lesão renal, a cinética do infiltrado mononuclear (monócitos/macrófagos e linfócitos T) pode ser muito mais pronunciada que dos leucócitos, isto mostra que macrófagos e linfócitos T estão localizados predominantemente em áreas de lesões severas causadas pela I/R, demonstrado em região medular.<sup>(12)</sup> Há relatos que infiltrados de monócitos/macrófagos estejam presentes durante as primeiras 24 horas e esse numero seja 12 a 25 vezes maior que a presença de polimorfos nucleares (PMN). Macrófagos e PMN são capazes de secretar larga quantidade de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, MPO, e citocinas proinflamatórias quando ativados.<sup>(12)</sup> Em modelos animais de inflamação aguda, foi demonstrado que a proteína antiinflamatória Anexina1 (Anx-A1) reduziu a migração de neutrófilos, aparentemente por interferir no processo de interação destes com o endotélio ativado. A Anx-A1 liga-se aos neutrófilos, dificultando sua adesão ao endotélio vascular, impedindo assim sua migração ao foco inflamatório tecidual.<sup>(13)</sup>

Em experimentos animais foi demonstrado que a proteína antiinflamatória Anx-A1 protegeu o miocárdio contra a lesão isquemia/reperfusão. O dano ao miocárdio, causado pela isquemia/reperfusão, estava associado ao aumento pronunciado dos níveis da atividade de mieloperoxidase miocárdica (MPO), um marcador utilizado para monitorar a infiltração tissular por polimorfonucleares.<sup>(14)</sup>

A administração de Anx-A1, após isquemia quente, diminuiu significativamente o tamanho da área do infarto e esta redução foi proporcional a menor atividade da MPO. O efeito protetor da Anx-A1 foi demonstrado histologicamente pela redução da agressão ao tecido danificado por processo

de isquemia e reperfusão e por uma diminuição do número de leucócitos intra e extravascular no miocárdio de ratos tratados com a proteína (Anx-A1).<sup>(14)</sup>

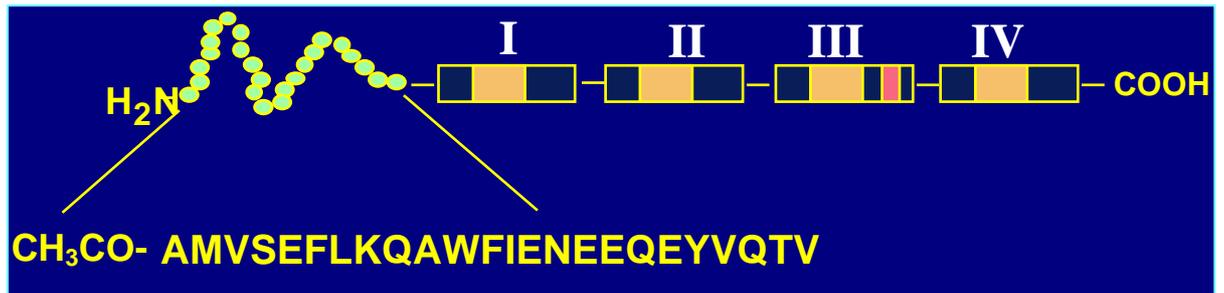
A proteína Anx-A1, também conhecida como Lipocortina (LC1), foi descrita por Flower e Blackwell em 1979 e identificada como uma proteína envolvida na inibição induzida pelos glicocorticóides (GC), na síntese de eicosanóides e fosfolipase A2.<sup>(15)</sup>

A superfamília anexina foi caracterizada primeiramente pela sua habilidade em se ligar ao cálcio e fosfolipídeos.<sup>(16)</sup> É encontrada em diferentes tecidos e tipos celulares, incluindo mamíferos, aves, peixes, anfíbios, *drosophila*, *Dictyostelium*, *Hydra* e plantas.<sup>(17)</sup>

Originalmente, a anexina1 foi considerada como uma “proteína anti-inflamatória”, e hoje sabe-se que ela está presente na maioria das células, nas quais sua função é controlar a atividade da fosfolipase A2 e permitir a hidrólise lipídica.<sup>(18)</sup>

As outras ações propostas para a anexina incluem anticoagulação, exocitoses, endocitoses, eventos de fusão de membranas, diferenciação celular, controle do crescimento celular, sinal de transdução e formação de citoesqueleto.<sup>(18-20)</sup>

Treze membros da família das anexinas foram descritos e clonados.<sup>(20,21)</sup> Estruturalmente, é formada por dois domínios: uma pequena região N-terminal, variando em comprimento e composição,<sup>(21)</sup> e um central formado por quatro repetidas dobras de uma mesma seqüência de 70 aminoácidos.<sup>(22,23)</sup>



### Representação Esquemática da Estrutura Primária de Proteína

#### Antiinflamatória Anexina 1

A patogênese da isquemia e formas de insuficiência renal aguda envolvem complexas interligações vasculares e fatores tubulares que necessitam ser compreendidas. A necrose tubular aguda, que geralmente ocorre em humanos, está associada à depleção de volume, sepse e choque hipovolêmico. O principal achado histopatológico em humanos com necrose tubular aguda é a necrose focal.<sup>(24)</sup>

Em modelos com coelhos, usou-se a oclusão arterial renal temporária para provocar isquemia; após o desclampamento da arterial renal, houve persistência de vasoconstrição e edema. Estas considerações sugerem que uma persistente isquemia medular aumenta a lesão.<sup>(25)</sup>

A IRA em ratos, devido obstrução da artéria renal (OAR), caracteriza-se por extensa necrose dos túbulos proximais. A distribuição e a extensão da lesão variam com o tempo de isquemia. Os néfrons distais são menos afetados e nota-se maior lesão em alça de Henle, com apoptose em células do túbulo contornado distal e ductos coletores.<sup>(26)</sup>

A necrose tubular é menos intensa em humanos que em ratos com OAR. Em humanos, as lesões morfológicas são geralmente subletais e focais,

afetando túbulos proximais e distais.<sup>(27)</sup> O dano funcional encontrado é semelhante, na NTA isquêmica em humanos e no modelo animal de obstrução de artéria renal (OAR). A NTA isquêmica nos ratos com IRA inclui redução acentuada da filtração glomerular e há reversibilidade em muitos casos de lesão tubular com recuperação da função renal.<sup>(28)</sup> Em modelo de OAR em ratos, vasoconstrição contínua e edema celular causam pobre reperfusão ao córtex renal e à medula; mesmo após o desclameamento arterial, levando ao infarto medular com instalação da agressão.<sup>(28)</sup> Algumas intervenções reduzem o grau de severidade da insuficiência renal aguda em animais, aumentando a perfusão renal, tais como diuréticos, antagonistas endoteliais e antiinflamatórios.<sup>(26)</sup>

O aumento da reperfusão sanguínea por elevação na pressão de perfusão, expansão de volume com solução salina ou nefrectomia contralateral, diminuem drasticamente as lesões e aceleram a recuperação da obstrução da artéria renal em ratos.<sup>(29)</sup>

A resposta hemodinâmica do rim humano à agressão isquêmica é comparável, à isquemia renal em ratos, de aproximadamente 30 minutos.<sup>(30)</sup> Modelos experimentais para avaliação de nefrotoxicidade causando IRA, podem ser de difícil obtenção, pois o uso de agentes nefrotóxicos (aminoglicosídeos, radio-contraste iodado, etc.) na ausência de outra alteração renal, podem não desencadear IRA em ratos, devido a fatores protetores e respostas hemodinâmicas diferentes à isquemia.<sup>(31)</sup>

Desta maneira, neste estudo investigou-se pela primeira vez, os efeitos da Anexina1 na filtração glomerular e na migração leucocitária para o tecido renal

lesado, em modelo de isquemia-reperfusão. Buscando uma nova forma de prevenção, utilizando-se a proteína antes da isquemia quente e reperfusão renal, uma opção para minimizar os efeitos inflamatórios no rim, com a possibilidade de proteção e aumento da sobrevida do órgão.

### **1.1. Objetivo**

Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da Anexina1 nas lesões funcionais e estruturais renais desencadeadas pelo processo de isquemia/reperfusão após manobra de oclusão da artéria renal em ratos.

## **2. MATERIAL E MÉTODO**

---

## **2. MATERIAL E MÉTODO**

### **2.1. Animal e Dieta**

Pesquisa realizada no laboratório de Fisiologia Renal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

O projeto foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da FAMERP-Processo nº 4918/2004.

Foram utilizados neste experimento 48 ratos Wistar machos, adultos, pesando entre 250-300g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

Os animais foram mantidos com dieta normosódica, normoprotéica e água *ad libitum*. Todos os animais receberam cuidados conforme recomendações do “Committee on Care and Use of Laboratory Animals – Institute of Laboratory Animal Resources” (ILAR) Estados Unidos, 1996.

### **2.2. Nefrectomia (primeiro procedimento cirúrgico)**

Todos os animais foram anestesiados com xilazina 2g/100ml (Coopazine<sup>R</sup>), associada com cloridrato de cetamina 50 mg/ml (Ketamin<sup>R</sup>), com injeção intraperitoneal, na dose de 0,1ml a cada 100g/rato.

Os ratos foram fixados pelos membros superiores e inferiores, em decúbito dorsal, a uma mesa cirúrgica aquecida (Braille-Biomédica). A

temperatura corporal dos ratos foi controlada com o auxílio de um medidor de temperatura retal em torno de 36,5°C.

Os animais foram submetidos inicialmente a uma pequena incisão na região cervical anterior, com dissecação da tela subcutânea, identificação, isolamento e cateterização da veia jugular esquerda com cateter (PE50), para infusão de Anexina1 ou solução tampão (PBS-40); 30 minutos antes do clampeamento da artéria renal esquerda. Em seguida, realizou-se uma incisão abdominal mediana (xifo-pubiana) para a realização de nefrectomia à direita em todos os ratos.

Após a nefrectomia à direita, realizou-se a dissecação e isolamento da artéria renal esquerda, que foi clampeada por 30 minutos (clampe vascular hemostático), provocando isquemia renal quente em 32 ratos.

Após o desclampeamento (reperfusão) renal à esquerda, os animais foram imediatamente submetidos à sutura da incisão abdominal, feita em duas camadas; muscular e pele, com fio de algodão 4.0 (Algofio<sup>R</sup>) Ethicon-USA.

Os animais foram mantidos em recuperação pós-operatória com dieta normosódica, normoproteica e água *ad libitum*. A função renal foi estudada 2 ou 7 dias após o período de isquemia quente e reperfusão.

Os animais foram divididos em 3 grupos:

### **GRUPO I**

Anexina1 com isquemia (Anx-A1-I/R):

- 16 ratos nefrectomizados à direita, receberam 100µg Anexina1 intravenoso, 30 minutos antes da isquemia renal esquerda.

## **GRUPO II**

Veículo com isquemia (PBS-40)-(Veic.-I/R.):

- 16 ratos nefrectomizados à direita, receberam 100µg PBS40, intravenoso, 30 minutos antes da isquemia renal esquerda.

## **GRUPO III**

Controle (Sham):

- 16 ratos foram nefrectomizados à direita, receberam 100µg PBS40 intravenoso e não foram submetidos à isquemia.

### **2.3. Estudo da Função Renal (segundo procedimento cirúrgico)**

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas (Nalgene, Nalge Company, Rochester, NY, EUA) por 24 horas antes de completarem o período de 2 ou 7 dias do tratamento cirúrgico das nefrectomias. Foram recolhidos diurese 24 horas antes do experimento, para dosagem de sódio e potássio por meio do analisador de eletrólitos (Mod.9180 – Eletrocyte Analyser – AVL), avaliação do volume urinário, determinação da osmolaridade através do ponto de congelamento (Mod. Osmette A – Automatic Osmometer – Precision Systemas, INC) e titulação da creatinina urinária (Método de JAFFE – Espectrofotômetro – Mod. BTS 310 photometer Bio Systems).

Após, os animais foram anestesiados com Thionembutal 50mg/kg (0,1 ml a cada 100g/rato) com injeção intraperitoneal.

Utilizou-se mesa aquecida (Braille - Biomédica), fixou-se em decúbito dorsal e assim os animais permaneceram em torno de 36,5°C (temperatura retal).

#### **A. Traqueostomia:**

Foi realizada a dissecação dos músculos cervicais, com identificação e isolamento da traquéia e canulação, para garantir a livre respiração com tubo PE260.

#### **B. Acesso vascular e cistostomia:**

Após a traqueostomia, foi feita a cateterização da veia jugular, utilizando a mesma incisão para infusão de soluções; e da artéria carótida para medida contínua da pressão arterial e coleta de amostras de sangue. Em seguida, foi realizada a incisão abdominal mediana, identificação e isolamento vesical para realização de cistostomia com cateter PE-160. A uretra permaneceu ligada com um clampe hemostático para evitar perda urinária.

#### **C. Clearance de inulina:**

Em seguida, os animais foram submetidos a uma dose inicial de 1 ml de solução de inulina (Sigma, E.U.A.), obtida pela diluição de 0,3 mg de inulina em 12 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%, aplicada por via endovenosa. O passo seguinte foi a expansão com 5 ml de solução salina isotônica (sol. Cloreto de sódio a 0,9%) via endovenosa para reposição das perdas fluidas. Em seguida iniciamos a infusão contínua de uma solução de inulina (0,3mg em

12ml de NaCl a 0,9%) na velocidade de 0,06ml/min e, após 50 min de estabilização, iniciamos as coletas do experimento, quando a urina foi coletada em tubos previamente pesados e devidamente identificados, durante 3 períodos consecutivos de 20 minutos cada. Coletamos 0,3 ml de sangue em tubos com heparina, na metade de cada período da coleta de urina. A amostra de sangue retirado foi repostada imediatamente com o mesmo volume de solução salina isotônica (NaCl a 0,9%). O plasma e urina foram usados para a dosagem de inulina pelo método da antrona (Espectrofotômetro BTS310 – Biosystems, Barcelona, Espanha). A pressão arterial média (PAM) foi verificada, durante todo o procedimento, a cada 10 minutos. O volume urinário foi determinado pela diferença de peso dos tubos de coleta de urina (peso ao final do período de coleta menos peso inicial do tubo). Os dados da depuração inulina foram calculados em ml/min/100g, representando a média dos três períodos de coleta.

## **2.4. Estudo Histopatológico**

### **- Fixação e Processamento para Microscopia de Luz**

Ao término dos experimentos, os animais foram sacrificados com infusão de 0,5 ml de anestésico thionembital por via endovenosa, e o rim foi retirado para estudo histopatológico realizado no Laboratório de Morfologia, IBILCE-UNESP, São José Rio Preto, SP.

Fragmentos da região medular e cortical renal de animais sham-operados e submetidos à isquemia/reperfusão com ou sem tratamento com anexina1, foram fixados em solução de paraformoldeído a 4% e glutaraldeído a 0,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,4) por 24 horas, a 4°C. A seguir, foram lavados no mesmo tampão e desidratados. Soluções crescentes de metanol (Merck-Germany) a -20°C, pré-infiltrados em uma mistura de metanol a 100% e resina de LRGold (London Resin Co, Reading, Berkshire,UK), em partes iguais, durante 18 horas, a -20°C. Após, foram infiltrados em resina LRGold pura, por 24 horas e ,então, incluídos em cápsulas de gelatina.

Cortes de 1µm dos fragmentos renais foram obtidos no ultramicrotomo (Reichert Ultracut Leica, Áustria). Foram corados com Azul de Toluidina para as análises morfológicas e/ou quantificação dos leucócitos. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio ZEISS, AXIOSKOP 2, do Laboratório de Morfologia, IBILCE-UNESP de São José Rio Preto,SP.

A análise quantitativa dos neutrófilos foi realizada nas preparações histológicas da medula e córtex renal dos animais sham-operados e submetidos à isquemia e reperfusão com e sem tratamento de Anx-A1 (cortes de 1µm, n=8 por animal). As células foram quantificadas na objetiva de 63x e, após medição da área no software analisador de imagem Axiovision (ZEISS), os valores foram apresentados como células por mm<sup>2</sup>.

## **2.5. Análise Estatística**

Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com posteriores comparações múltiplas pelo teste Tukey-Kramer. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  S.E.M. das funções glomerulares e tubulares. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes.

Os valores obtidos foram demonstrados como média  $\pm$  S.E.M. do número de neutrófilos observados na microscopia de luz. Diferenças nas medidas do número de células foram determinadas por análise de variância seguidas, se significativo, pelo teste de Bonferroni. Os valores menores do que 0,05 foram considerados significativos.

Os gráficos foram apresentados em forma de barras.

### **3. RESULTADOS**

---

### 3. RESULTADOS

Foram comparados os resultados observados nos grupos, Anx-A1-I/R, Veic-I/R e Sham, com 2 e 7 dias após isquemia e reperfusão.

#### 3.1. Peso e Volume Urinário

##### 3.1.1. Peso

A comparação entre o peso inicial (antes do segundo experimento) e final (2 e 7 dias após I/R) não apresentou diferença significativa entre as médias dos pesos dos ratos nos diversos grupos.

Dois dias após nefrectomia, não houve diferença significativa nas médias dos pesos entre os grupos estudados, com os seguintes resultados: Anx-A1-I/R (275,50±4,07gramas); Veic.-I/R (272,75±5,15 gramas) e Sham (276,00±3,44 gramas). A média dos pesos dos ratos, com 7 dias após nefrectomia, também foi semelhante, com os seguintes resultados: Anx-A1-I/R (267,88±4,39 gramas); Veic.-I/R (262,50±5,00 gramas) e Sham (273,75±4,92 gramas).

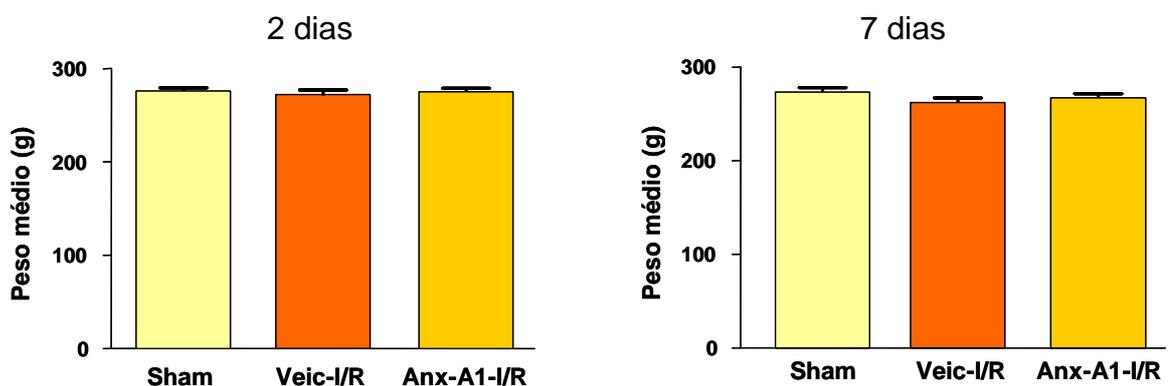
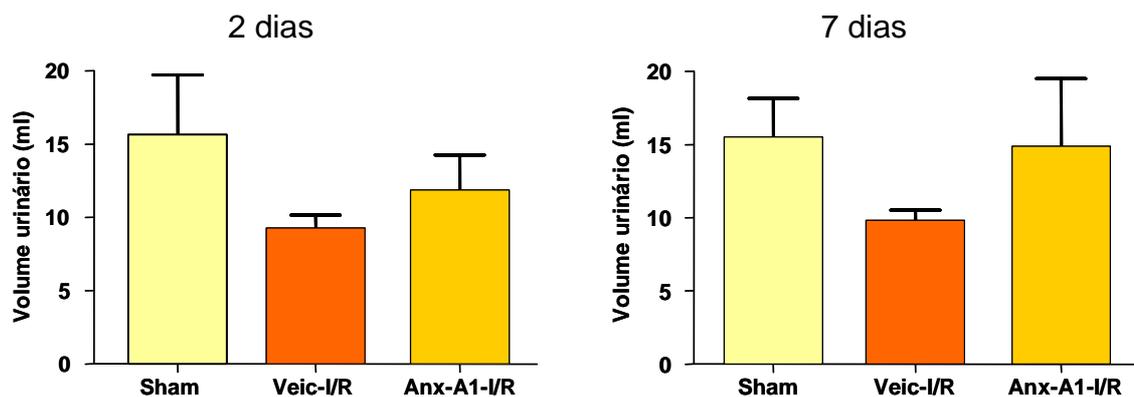


Figura 1. Histograma das médias de peso dos ratos.

### 3.1.2. Volume Urinário

O volume urinário mostrou diferença significativa, quando comparamos o grupo Anx-A1-I/R. e o grupo Veic-I/R. com 2 dias. Obtivemos os seguintes resultados: Anx-A1-I/R., (11,88±2,38 ml); Veic-I/R., (9,28±0,88 ml)  $p < 0,05$  e Sham, (15,66±4,07 ml)  $p < 0,001$ . No 7º. Dia, foi observado: Anx-A1-I/R., (14,90±1,63ml); Veic-I/R., (9,82±0,71ml)  $p < 0,01$  e Sham, (15,51±0,94ml)  $p < 0,01$ .



Anx-A1-I/R X Veic-I/R	* $p < 0,05$	Anx-A1-I/R X Veic-I/R	$p < 0,01$
Anx-A1-I/R X Sham	NS	Anx-A1-I/R X Sham	NS
Veic-I/R X Sham	$p < 0,001$	Sham X Veic-I/R	$p = 0,01$

Figura 2. Histograma representando as médias dos volumes urinários.

### 3.2. Filtração Glomerular

Os dados funcionais renais são apresentados na Figura 3. Após nefrectomia os ratos foram submetidos à avaliação da função renal no 2º. e 7º. dia através do clearance de inulina. Houve redução estatisticamente significativa da taxa de filtração glomerular nos grupos Veic-I/R., quando comparado aos grupos Anx-A1-I/R e Sham. No 2º. dia de experimento, Anx-A1-I/R( $0,86\pm 0,05\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}.$ ), Veic.-I/R( $0,42\pm 0,02\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}.$ ) e Sham ( $1,01\pm 0,12\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}.$ ), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Anx-A1-I/R e Sham.

No 7º. dia de experimento, Anx-A1-I/R ( $0,73\pm 0,04\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}.$ ), Veic-I/R. ( $0,48\pm 0,05\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}.$ ) e Sham ( $1,01\pm 0,09\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g}.$ ), observou-se diferença significativa entre os grupos Anx-A1-I/R. e Sham ( $p < 0,01$ ).

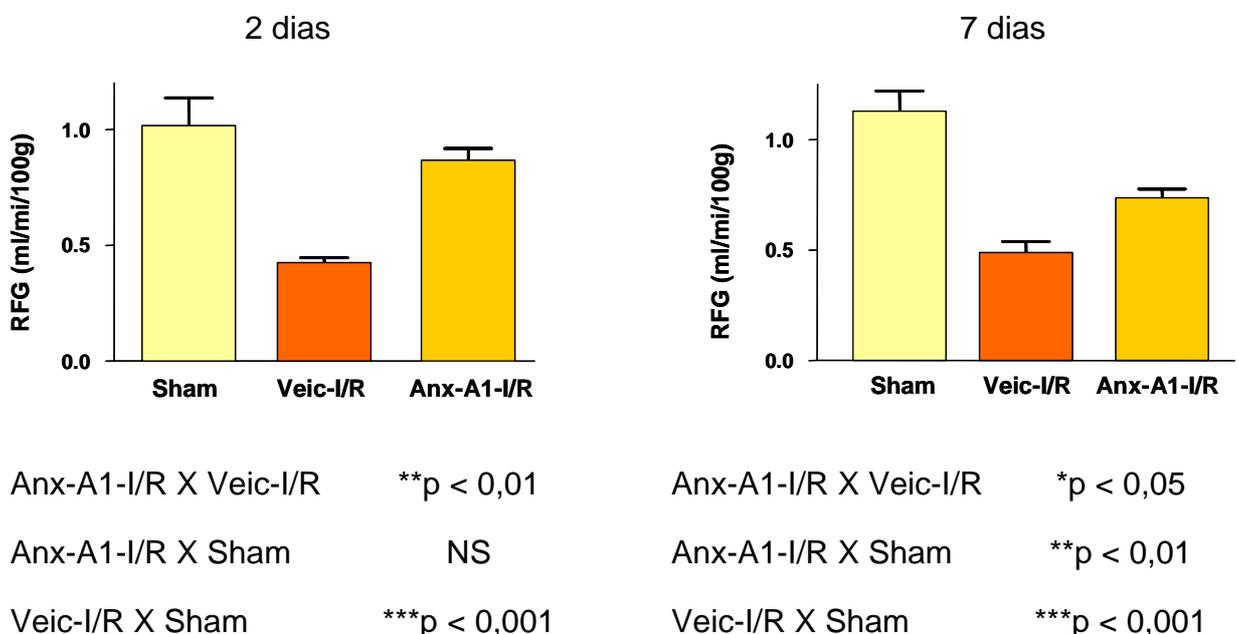
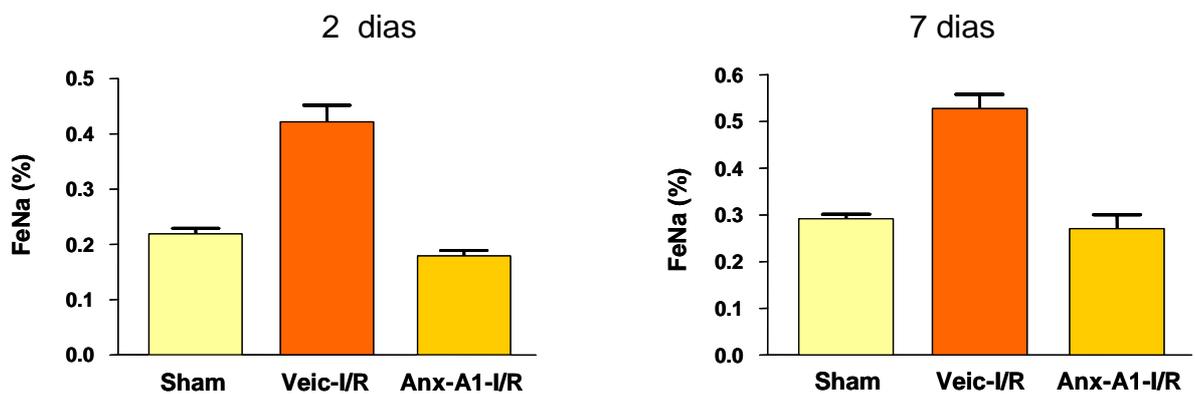


Figura 3. Histograma representando as médias de taxa de filtração glomerular (Cin,ml/min/100g).

### 3.3. Fração de Excreção de Sódio

A excreção fracional de sódio (FeNa) apresentou-se significativamente aumentada nos grupos Veic.-I/R, quando comparada aos grupos Anx-A1-I/R e Sham nos 2º. e 7º.dias de experimento. No 2º. dia de estudo, Anx-A1-I/R, (0,17±0,01%); Veic.-I/R, (0,42±0,03%) e Sham, (0,21±0,01%), ( $p < 0,001$ ). No 7º. dia, Anx-A1-I/R, (0,27±0,03%); Veic.-I/R, (0,52±0,03%) e Sham, (0,29±0,01%) ( $p < 0,001$ ).



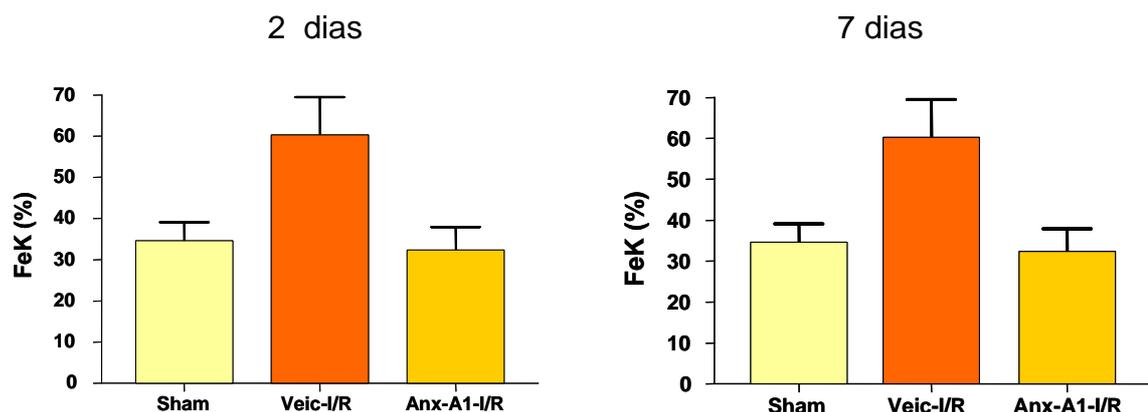
Anx-A1-I/R X Veic-I/R	**p < 0,01
Anx-A1-I/R X Sham	NS
Veic-I/R X Sham	***p < 0,001

Anx-A1-I/R X Veic-I/R	***p < 0,001
Anx-A1-I/R X Sham	NS
Veic-I/R X Sham	***p < 0,001

Figura 4. Histograma representando o índice de excreção fracional de sódio(%).

### 3.4. Fração de Excreção de Potássio

A excreção fracional de potássio (FeK), com 2 dias de experimento, não diferiu entre os grupos Anx-A1-I/R e Sham, ( $32,37 \pm 1,96\%$  e  $34,63 \pm 1,58\%$ , respectivamente), mas a FeK aumentou significativamente no grupo Veic.-I/R ( $60,31 \pm 1,58\%$ ) ( $p < 0,001$ ). Houve a mesma situação com 7 dias de experimento, não diferindo entre os grupos Anx-A1-I/R e Sham ( $29,98 \pm 1,98\%$  e  $36,90 \pm 1,67\%$  respectivamente). No entanto verificou-se aumento significativo no grupo Veic.-I/R ( $68,70 \pm 5,08\%$ ) ( $p < 0,001$ ).



Anx-A1-I/R X Veic-I/R  $p < 0,001$

Anx-A1-I/R X Sham NS

Veic-I/R X Sham  $p < 0,001$

Anx-A1-I/R X Veic-I/R  $p < 0,001$

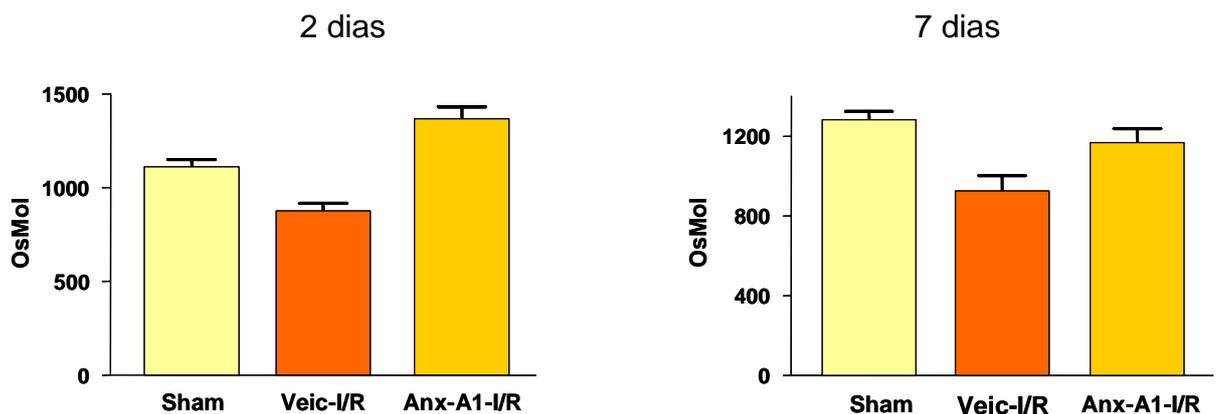
Anx-A1-I/R X Sham NS

Veic-I/R X Sham  $p < 0,001$

Figura 5. Histograma representado os índices da fração de excreção de potássio (%).

### 3.5. Osmolalidade

A osmolalidades urinário (Uosm) mostrou redução importante nos grupos Veic-I/R nos experimentos do 2º. e 7º. dias após nefrectomia, comparados aos grupos Anx-A1-I/R e Sham, como verificamos nos resultados: 2º.dia, Anx-A1-I/R (1368,9±62,99U/Posm.), Veic-I/R (876,25±41,84U/Posm) e Sham, (1111,0±38,67U/Posm.),  $p < 0,001$ . No 7º. dia, Anx-A1-I/R (1167,0±70,02U/Posm); Veic-I/R (925,63±75,63U/Posm.) e Sham (1283,1±40,58U/Posm.)  $p < 0,05$ .



Anx-A1-I/R X Veic-I/R \*\*\* $p < 0,001$

Anx-A1-I/R X Sham NS

Veic-I/R X Sham  $p < 0,01$

Anx-A1-I/R X Veic-I/R \* $p < 0,05$

Anx-A1-I/R X Sham NS

Veic-I/R X Sham \*\* $p < 0,01$

Figura 6. Histograma representando a Osmolalidade urinário (U/P osm).

### **3.6. Histopatologia**

A análise histopatológica foi realizada nos fragmentos renais, referentes ao córtex e medula, com períodos de 2 e 7 dias após isquemia e reperfusão. A lesão por I/R renal foi observada à microscopia de luz. Não foram observadas lesões no córtex dos animais sham (2 dias), nos quais a morfologia tubular é preservada e a borda em escova e a membrana basal são claramente evidentes (Figuras 7A, B). A perda da integridade cortical pôde ser detectada nos períodos de reperfusão (2 dias) nos grupos Veic-I/R, que exibiram extensiva lesão caracterizada por necrose tubular, vacuolização celular, presença de debris celulares e perda da borda em escova (Figura 7C), além da presença de neutrófilos aderidos aos capilares dilatados dos glomérulos (Figura 7D). O córtex dos animais tratados com a proteína Anx-A1 (Figuras 7E, F), mostrou significativa proteção dos danos tubulares quando comparados ao grupo veic.-I/R. Em adição, no estudo das amostras de medula, após 2 dias de reperfusão, notamos túbulos coletores conservados e típicos em animais do grupo Sham (Figura 8A). No grupo Veic-I/R verificamos dano tecidual causado pela isquemia, mostrando a migração de leucócitos para o local da lesão (Figura 8B). Em contraste, diferindo significativamente dos grupos Veic-I/R, os animais do grupo Anx-A1-I/R apresentam um arranjo medular composto por estruturas tubulares e vasculares bem preservadas (Figura 8C).

Em córtex renal analisados após 7 dias de reperfusão, o grupo Sham mostrou conjunto de túbulos contorcidos proximais e glomérulo renal conservados (Figura 10A e B). No grupo Veic-I/R verificamos a presença de

numerosos monócitos e debris celulares no interior de túbulos proximais (Figura 10C) e capilares dilatados dos glomérulos, mostrando vacúolos e necrose tubular(Figura 10D). Verificamos preservação dos elementos corticais, túbulos distais, proximais e glomérulo renal no grupo Anx-A1-I/R (Figura 10 E e F). Nas amostras de medula renal com 7 dias de estudos, notamos visão geral do arranjo medular composto por túbulos e vasos,conservados no grupo Sham (Figura11A), e importante lesão celular em túbulos coletores em processo de necrose no grupo Veic-I/R com presença de macrófagos (Figura 11B). No grupo anexina1-I/R com 7 dias de experimento em amostras de medula, notamos túbulos coletores em processo de regeneração . (Figura 11C).

Nos estudos após 2 dias de reperfusão, a quantificação de neutrófilos na porção do córtex renal mostrou altas taxas de migração deste tipo celular para as áreas de isquemia (Veic-I/R:  $6,5 \pm 1,3$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup>), observados principalmente no espaço intersticial e no interior de túbulos proximais (Figuras 9A e B). Em comparação, o número de neutrófilos transmigrados foi significativamente menor nos grupos Anx-A1-I/R ( $0,5 \pm 0,2$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup>) e Sham ( $1,0 \pm 0,4$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup>) (Figura 9D; Tabela 1A). Notamos também aumento significativo no número de neutrófilos intravasculares dos grupos Veic-I/R ( $6,6 \pm 1,5$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup>), quando comparados aos grupos Sham ( $1,3 \pm 0,3$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup> ) e Anx-A1-I/R ( $3,4 \pm 0,6$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup>) (Figura 9C e D, Tabela 1A). Na análise quantitativa de neutrófilos com 7 dias, em amostra de córtex renal, verificamos aumento significativo dos neutrófilos intravasculares e transmigrados em áreas isquêmicas dos grupos Veic-I/R, ( $6.4 \pm 1,0$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup> e  $4,3 \pm 1,8$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup> respectivamente), comparados

---

ao grupo Anx-A1-I/R ( $0,1 \pm 0,1$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup> e  $1,0 \pm 0,1$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup>, respectivamente) (Figura 9F; Tabela 1B).

Nas porções da medula renal, foram observadas altas taxas de transmigração de neutrófilos nos grupos Veic-I/R, tanto com 2 ou 7 dias ( $8,9 \pm 5,3$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup>. e  $6,9 \pm 1,4$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup>, respectivamente) (Figura 9E e G; Tabela 1A e B). Em contraste, o número de neutrófilos transmigrados nas porções de medula foi menor nos grupos Sham e Anx-A1-I/R após 2 dias de reperfusão:  $0,8 \pm 0,3$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup> e  $0,3 \pm 0,2$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup>, respectivamente (Figura 9E; Tabela 1A). Além disso, apresentou moderada presença de neutrófilos intravasculares com 2 e 7 dias no grupo tratado com Anx-A1 ( $2,7 \pm 2,1$  n $\phi$ // mm<sup>2</sup> e  $4,2 \pm 1,6$  n $\phi$ /mm<sup>2</sup>, respectivamente) (Figuras 9E e G; Tabela 1A e B).

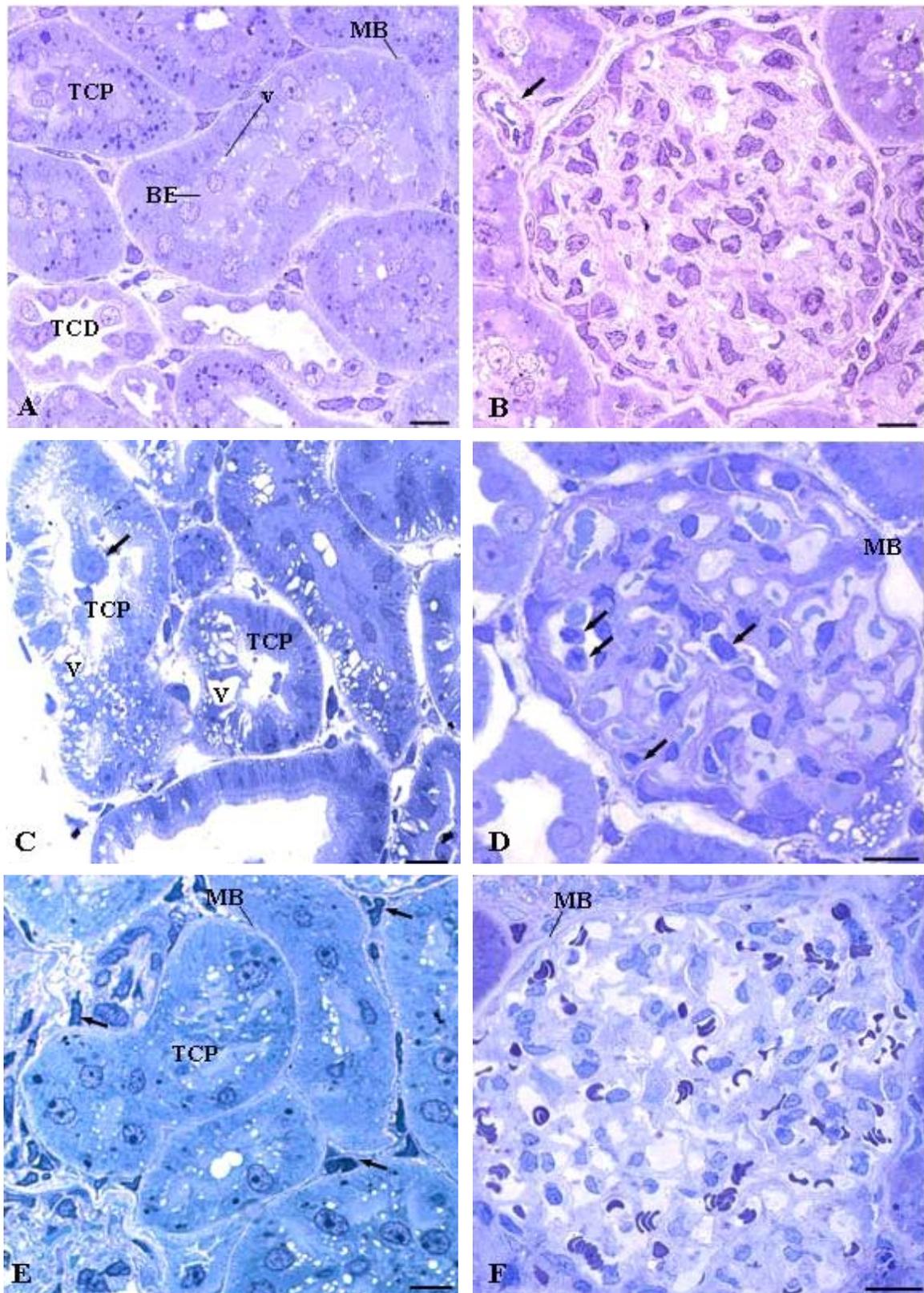


Figura 7. Córtex renal após dois dias de reperusão.

**Grupo Sham-operados:** **(A)** Conjunto de túbulos contorcidos proximais (TCP) e distais (TCD). Notar a membrana basal (MB) e a borda em escova (BE) revestindo os vacúolos (v) do dispositivo endocitótico apical em um túbulo proximal. **(B)** Glomérulo renal mostrando o vaso aferente (seta) junto ao pólo vascular.

**Grupo I/R:** **(C)** Lesão focal dos túbulos proximais (TCP), mostrando célula tubular descamada denominada *cast* (seta) e grandes vacúolos (V). **(D)** Neutrófilos aderidos são observados nos capilares dilatados do glomérulo (setas) e membrana basal (MB) alterada.

**Grupo I/R tratado com Anx-A1:** **(E)** Estrutura preservada dos túbulos contorcidos proximais, mostrando a membrana basal (MB) e os elementos do tecido conjuntivo (setas) associados a túbulos proximais (TCP). **(F)** Glomérulo renal bem preservado. Notar a integridade da membrana basal (MB) e a ausência de neutrófilos.

Coloração: Azul de toluidina. Barras: 10 $\mu$ m

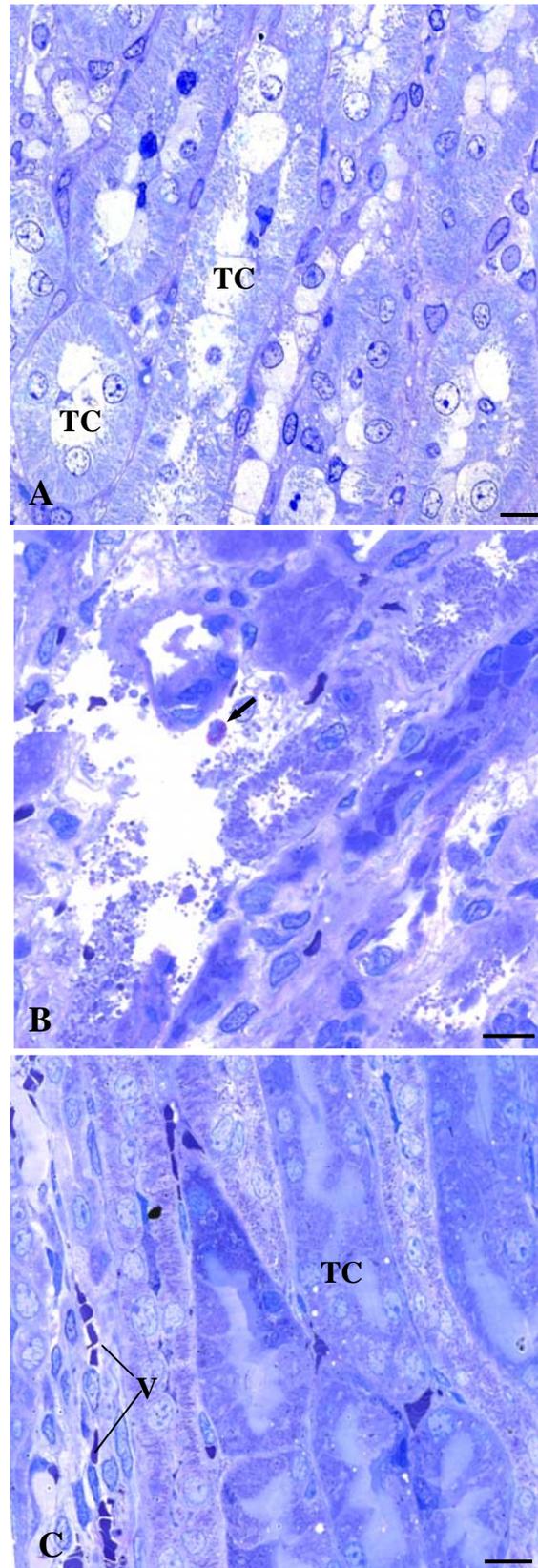


Figura 8. Medula renal após dois dias de reperusão.

**Grupo Sham-operados: (A)** Visão geral de típicos túbulos coletores (TC) da medula.

**Grupo I/R: (B)** Lesão tecidual causada pela IR, mostrando um leucócito (seta) transmigrado para o espaço da lesão.

**Grupo I/R tratado com Anx-A1: (C)** Arranjo medular composto por estruturas tubulares (TC) e vasculares (V) preservadas.

Coloração: Azul de toluidina. Barras: 10 $\mu$ m

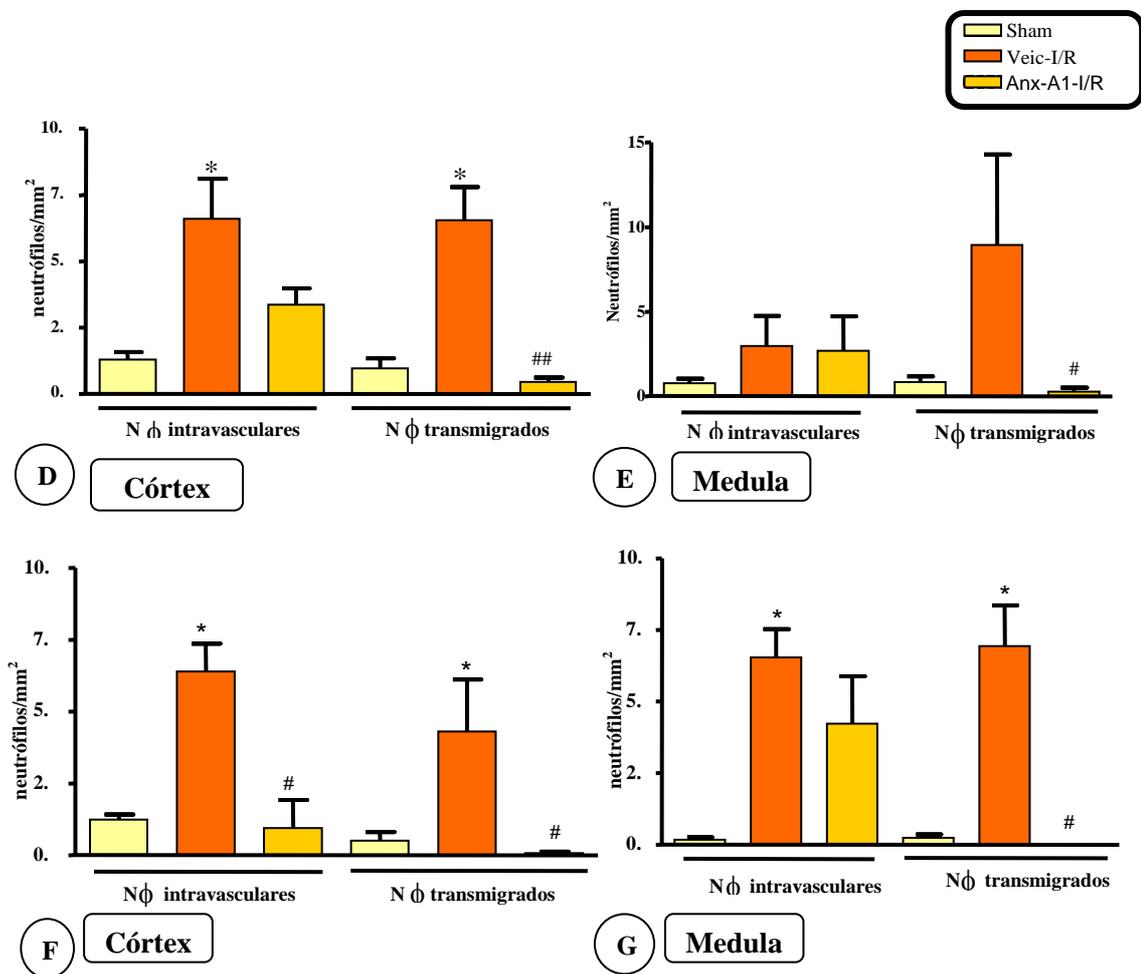
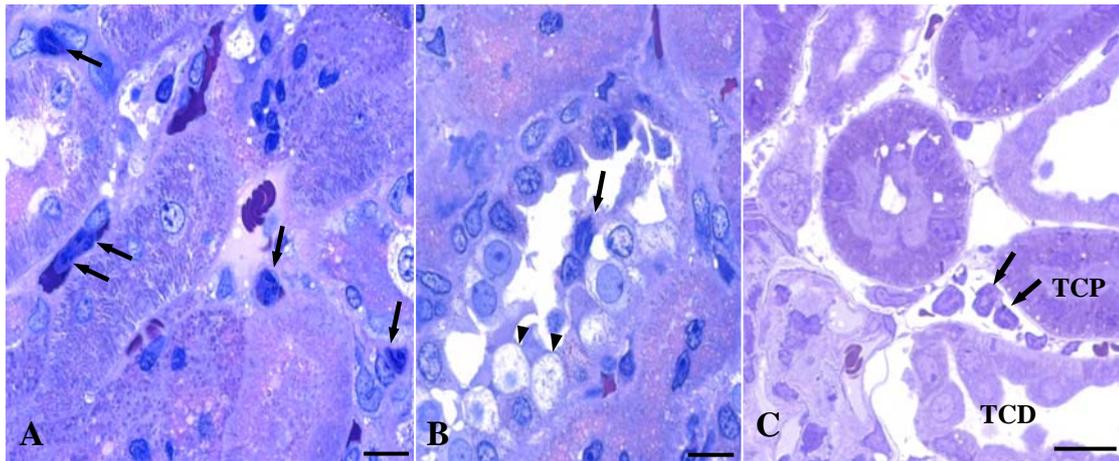


Figura 9. Neutrófilos no córtex e na medula em I/R.

**Grupo I/R: (A)** Presença de neutrófilos transmigrados (setas) entre os tubos coletores da medula. **(B)** Detalhe de células em necrose (cabeças-de-setas) e neutrófilo (seta) no interior de um tubo coletor.

**Grupo I/R tratado com Anx-A1: (C)** Presença de leucócitos intravasculares (setas) entre os túbulos contorcidos proximal (TCP) e distal (TCD) do córtex renal. Coloração: Azul de toluidina. Barras: 10 $\mu$ m

**Análise quantitativa de neutrófilos intravasculares e transmigrados:**

**Dois dias pós-reperfusão:** Córtex **(D)** e medula **(E)** renal de ratos sham-operados, submetidos a isquemia (I/R) e tratados com Anx-A1 antes da isquemia (Anx-A1-I/R). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de média de neutrófilos (n= 8 animais por grupo). \* p<0,05 versus Sham; \*\* p<0,01 versus Sham; # p<0,05 versus I/R; ### p<0.001 versus I/R. (Análise de variância seguida pelo teste de Bonferroni).

**Sete dias pós-reperfusão:** Córtex **(F)** e medula **(G)** renal de ratos Sham-operados, submetidos a isquemia (I/R) e tratados com Anx-A1 antes da isquemia (Anx-A1-I/R). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de média de neutrófilos (n= 8 animais por grupo). \* p<0,05 versus sham; \*\* p<0,01 versus Sham; # p<0,05 versus I/R; ## p<0,01. (Análise de variância seguida pelo teste de Bonferroni).

Tabela 1. Análise quantitativa de neutrófilos em isquemia e reperfusão renal em ratos.

**2 dias**

	Neutrófilos / mm <sup>2</sup>					
	Sham		I/R		Anx-A1-I/R	
	Transmigrado	Intravascular	Transmigrado	Intravascular	Transmigrado	Intravascular
Córtex	1,0 ± 0,4	1,3 ± 0,3	6,5 ± 1,3**	6,6 ± 1,5*	0,5 ± 0,2###	3,4 ± 0,6
Medula	0,8 ± 0,3	0,8 ± 0,3	8,9 ± 5,3**	3,0 ± 1,8	0,3 ± 0,2#	2,7 ± 2,1

**A****7 dias**

	Neutrófilos / mm <sup>2</sup>					
	Sham		I/R		Anx-A1-I/R	
	Transmigrado	Intravascular	Transmigrado	Intravascular	Transmigrado	Intravascular
Córtex	0,5 ± 0,3	1,2 ± 0,2	4,3 ± 1,8*	6,4 ± 1,0**	0,1 ± 0,1#	1,0 ± 1,0##
Medula	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	6,9 ± 1,4*	6,5 ± 1,0*	0 ± 0#	4,2 ± 1,6

**B**

**Redução pela Anexina1 do extravasamento de neutrófilos em inflamação renal.** Ratos (n=8) Sham foram operados, submetidos a isquemia e reperfusão e tratados 30 minutos antes da isquemia com Anx-A1 (100µg). Fragmentos do córtex e da medula foram analisados com 2 dias (A) e 7 dias (B) após reperfusão. Como media ± SEM. \*p<0.05 versus sham; \*\* p <0.01 versus Sham; # p<0.05 versus I/R; ### p<0.001 versus I/R.

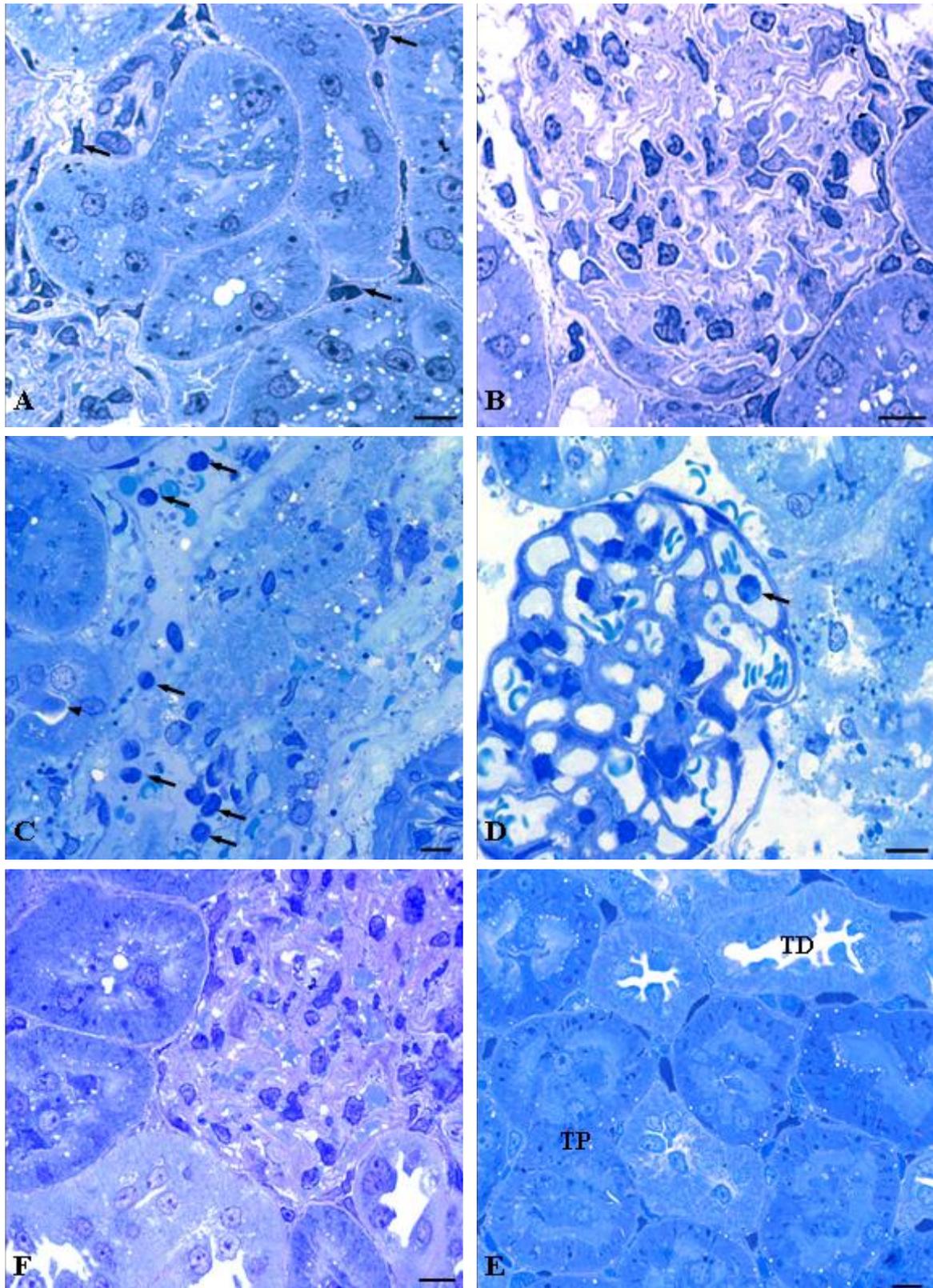


Figura 10. Córtex renal de ratos analisados após sete dias de reperusão.

(coloração azul de toluidina, barras: 10um)

**Grupo Sham-operados: (A)** Conjunto de túbulos contorcidos proximais, mostrando elementos do tecido conjuntivo associados a túbulos (setas). **(B)** Glomérulo renal mostrando o vaso aferente (seta) junto ao pólo vascular.

**Grupo Isquêmico: (C)** Vaso sanguíneo com a presença de numerosos monócitos (setas) e debris celulares no interior de um túbulo contorcido proximal (cabeça-de-seta). **(D)** Capilares dilatados do glomérulo, mostrando neutrófilo intravascular (seta). À direita da fotomicrografia, notar a evidente necrose tubular.

**Grupo tratado com Anx-A1: (E) e (F)** Preservação dos elementos corticais: túbulos contorcidos proximal (TP) e distais (TD), e glomérulo renal.

Coloração: Azul de toluidina

Barras: 10 $\mu$ m

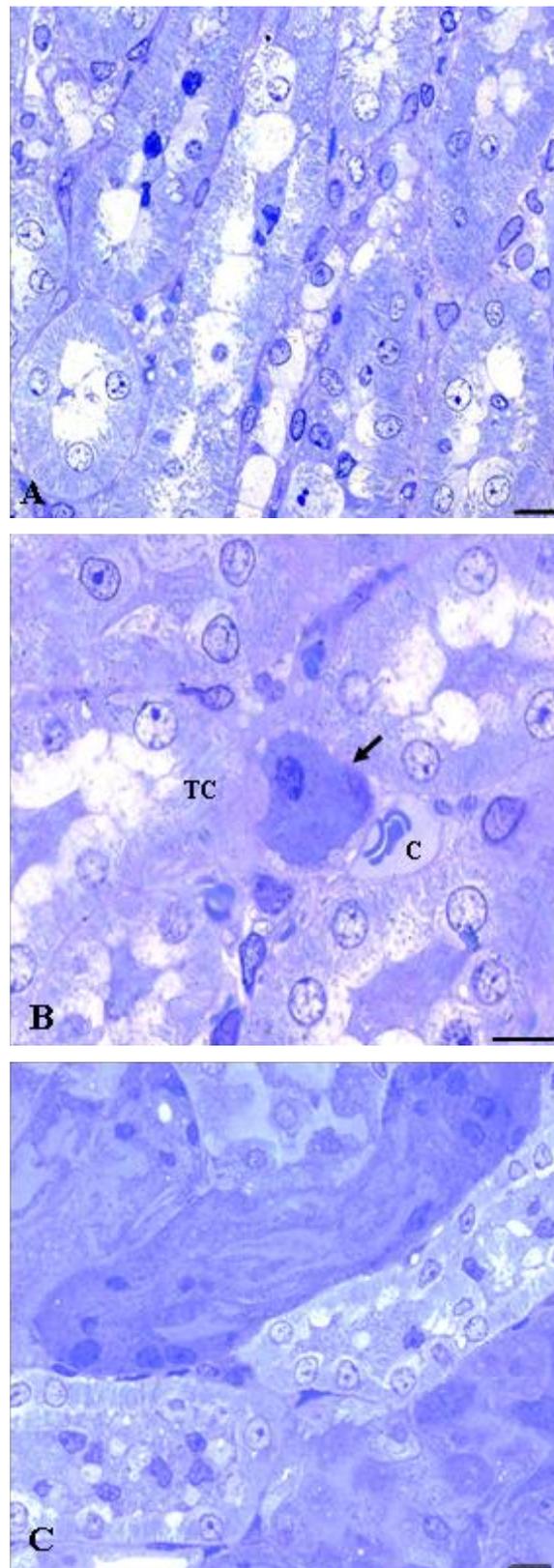


Figura 11. Medula renal de ratos analisados após sete dias de reperusão.

(coloração azul de tolúídina, barras:10um)

**Grupo Sham-operados: (A)** Visão geral do arranjo medular composto por estruturas tubulares e vasculares.

**Grupo Isquêmico: (B)** Alteração celular dos tubos coletores (TC) em processo de necrose e presença de macrófago.

**Grupo tratado com Anx-A1:** Tubos coletores em processo de regeneração.

## **4. DISCUSSÃO**

---

#### 4. DISCUSSÃO

Este estudo, realizado no laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, é o primeiro a demonstrar o potencial terapêutico da proteína anexina1 (Anx-A1), em relação à lesão de I/R renal. Utilizamos o modelo de isquemia quente devido às vantagens de ser um procedimento simples e reproduzível, onde ocorre exuberante resposta inflamatória. Optou-se pela isquemia de 30 minutos, em função desta induzir lesão renal grave, porém reversível e ser bastante bem estudada na literatura. Como todos os modelos experimentais, este também apresenta semelhanças e diferenças em relação às lesões encontradas em humanos.<sup>(26)</sup>

As alterações causadas pela I/R podem ser consideradas como um fenômeno inflamatório e vasomotor.<sup>(28)</sup> A resposta inflamatória inclui a resposta aguda e a resposta crônica. A resposta aguda faz parte da imunidade inata adquirida, de caráter inespecífico, cuja seqüência de eventos geralmente independe do tipo de agente agressor. A resposta crônica, usualmente envolve linfócitos T (memória e citotóxico) e B (produção de anticorpos). A IRA associada à inflamação é grave conseqüência da lesão de isquemia/reperfusão renal, acarretando elevada mortalidade e morbidade.<sup>(32)</sup> Vários mecanismos tem sido relacionados ao processo inflamatório após lesão de isquemia e reperfusão, como ativação endotelial, aumento da adesão leucocitária, liberação de mediadores inflamatórios e alterações na microvasculatura renal.<sup>(33,34)</sup>

A lesão de I/R é do tipo aguda. No local onde ocorre a resposta inflamatória a rede vascular é afetada, aumentando o fluxo sanguíneo e

causando a saída de plasma e recrutamento de células para a remoção direta dos vasos pela fagocitose. Varias células estão envolvidas no processo inflamatório, incluindo os mastócitos e seus mediadores farmacológicos, que são fundamentais para mediar o recrutamento dos leucócitos *in vivo*. O extravasamento de granulócitos (neutrófilos e eosinófilos) e monócitos ocorre especificamente nas vênulas pós-capilares, devido à composição particular de moléculas de adesão das mesmas.

Os efeitos da I/R afetam inicialmente regiões renais mais vulneráveis à hipóxia, desencadeando uma cascata de eventos inflamatórios. Os rins recebem 25% do débito cardíaco, sendo a maior parte deste fluxo direcionado para o córtex renal.<sup>(35)</sup> Conseqüentemente, a medula renal, responsável pela concentração urinária, tem menor fluxo sanguíneo, sendo a região com maior risco de lesão. Pequenas alterações do fluxo sanguíneo e da tensão de oxigênio na medula podem produzir lesões de isquemia e reperfusão. e disfunção tubular<sup>(27,36)</sup> A hipóxia medular leva à depleção de energia celular e à ruptura da actina do citoesqueleto das células endoteliais, resultando em deformidades celulares ao redor de toda área isquêmica,<sup>(37,38)</sup> e na migração de células inflamatórias. Todas estas alterações foram encontradas nos animais do grupo placebo, isto é queda importante da filtração glomerular, necrose tubular aguda e infiltrado de leucócitos no interstício renal.

Neste estudo demonstramos que a anexina 1 administrada antes da isquemia renal conferiu importante proteção funcional e estrutural contra a lesão de isquemia/reperfusão ao mesmo tempo que impediu a transmigração dos neutrófilos do compartimento intravascular para o interstício renal. As

doses utilizadas de anexina1 basearam-se em estudos prévios em que esta proteína protegeu contra lesão de isquemia/reperfusão em coração de ratos.<sup>(14)</sup> É interessante que enquanto nos estudos de isquemia cardíaca a administração de anexina1 após a isquemia protegeu contra a lesão, isto não ocorreu com o rim. A tentativa de administrar anexina1 após a isquemia não resultou em proteção (dados não demonstrados), provavelmente devido às características particulares da circulação renal.

Os neutrófilos têm sido bastante estudados em modelos de lesão de isquemia/reperfusão e inflamação. Sua migração para o cérebro e para o tecido cardíaco, após I/R está bem demonstrada.<sup>(39)</sup> Existem também evidências de que os neutrófilos medeiam o dano tecidual e tem papel fundamental no desenvolvimento da lesão renal pós-isquêmica.<sup>(40)</sup> Estas evidências provém de estudos experimentais de insuficiência renal aguda isquêmica que mostram acúmulo renal de neutrófilos, redução do dano estrutural renal com sua depleção, e benefício com tratamento anti-moléculas de adesão.<sup>(40)</sup>

Hellberg e Kallskog descreveram aumento de neutrófilos no córtex e região medular após modelo de I/R e obtiveram proteção da lesão renal quando os ratos tiveram os neutrófilos depletados.<sup>(41)</sup> Linas *et al.*<sup>(40)</sup> realizaram isquemia *in vivo* seguida de isolamento do rim e perfusão *ex vivo*. Adicionando e retirando os neutrófilos do líquido de perfusão demonstraram que estes contribuem para os danos estruturais e funcionais após isquemia-reperfusão renal. Além disso, mostraram que o número de neutrófilos encontrados no tecido renal foi dependente da duração da isquemia renal. Por outro lado, Paller *et al.*<sup>(42)</sup> estudando o dano renal após isquemia/reperfusão em ratos

submetidos à depleção prévia de neutrófilos através de anticorpos anti-neutrófilos não encontraram diferença entre os grupos controle e tratado. É possível que estas diferenças em relação aos resultados de diferentes estudos estejam relacionadas a maior ou menor eficiência das manobras realizadas para depleção de neutrófilos. No presente estudo, o mecanismo usado foi fisiológico. A anexina1 impediu a transmigração dos neutrófilos mas não interferiu com o seu número, como pode ser observado pela contagem de neutrófilos no compartimento intravascular dos animais tratados.

A adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular é mediada pelo fator ativador plaquetário, pela expressão de moléculas de adesão intercelulares (molécula de adesão intercelular-1 – ICAM-1, selectina-E, selectina-P) e por um grupo de glicoproteínas de superfície do neutrófilo, chamado de moléculas de adesão leucocitária ou integrinas da família CD11/CD18.<sup>(42)</sup> São conhecidos vários mecanismos e estímulos relacionados às células endoteliais para aumentar a adesão dos neutrófilos. Estes mecanismos são tempo-dependente em relação ao estímulo inicial. Por exemplo, trombina ou leucotrieno C4 são capazes de estimular as células endoteliais resultando em aumento da aderência de neutrófilos, que se torna ótima em minutos e envolvem maior expressão de selectina-P e síntese do fator ativador plaquetário. A IL-1 ou fator de necrose tumoral induz a expressão de selectina-E e IL-8. O aumento desta expressão leva horas, necessita da síntese proteica e também está envolvido na aderência de neutrófilos. Estudos *in vitro* mostram que a própria hipóxia isoladamente pode ativar as células endoteliais, contribuindo para o aumento da aderência endotelial e migração de neutrófilos observada em tecidos

isquêmicos.<sup>(43)</sup> Índícios indiretos da importância dos neutrófilos na lesão de I/R renal tem sido obtidos a partir de diferentes manobras que bloqueiam as substâncias e as moléculas de adesão relacionadas à adesão endotelial e subsequente migração tecidual dos neutrófilos ao local de inflamação.<sup>(43)</sup> Linas *et al.*<sup>(40)</sup> utilizando-se de um modelo de rim isolado perfundido e anticorpos anti-ICAM-1, observou que a sequestração de neutrófilos após a isquemia foi ICAM dependente. Chana e Wheller mostraram que a administração exógena do fator de necrose tumoral (TNF) altera de modo importante a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular) na célula renal mesangial. O TNF aumentou a expressão da ICAM-1 em 505% e a expressão da VCAM-1 em 179%; conseguindo assim um aumento na ligação célula mesangial-monócito (macrófago) de 335%.<sup>(44)</sup> Assim, muitos estudos tem demonstrado os benefícios da terapia com Ac anti-ICAM em isquemia reperfusão ou inflamação aguda.<sup>(40)</sup> Wu *et al.*,<sup>(45)</sup> utilizando-se um modelo de nefrite nefrotóxica, mostrou que a administração do anticorpo monoclonal anti CD 11b (OX42) 16 horas antes do início da doença acarreta em diminuição importante da proteinúria (80%) e diminuição do número de neutrófilos encontrados no glomérulo.

Estudos recentes confirmam que a cinética e marginalização dos neutrófilos em situações de hipóxia são regulados pelos mesmos mediadores da resposta inflamatória. A produção de radicais livres de oxigênio (espécies reativas tóxicas do oxigênio) representa o evento inicial. São produzidos pelo endotélio vascular, com pico nos primeiros cinco minutos, prolongando-se por várias horas. Estes radicais livres induzem fluxo de cálcio trans-membrana, ativando a fosfolipase A2 a partir das células endoteliais. A ativação da

fosfolipase A2 mobiliza lipídios de membrana, especialmente o ácido aracdônico e resulta na geração de produtos derivados da lipo-oxigenase, ciclo-oxigenase e fator ativador plaquetário.<sup>(40)</sup> Acreditava-se que a liberação extra-celular de produtos citotóxicos do neutrófilo somente ocorria com sua morte. Reconhece-se que esta liberação de produtos citotóxicos para o espaço extra-celular pode ocorrer sem que ocorra a morte do neutrófilo. As substâncias citotóxicas são divididas em dois grupos: localizadas na membrana plasmática e no citoplasma. Na membrana plasmática do neutrófilo ativado encontra-se a NADPH oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase), que gera a família de compostos químicos reativos (espécies reativas tóxicas do oxigênio). No citoplasma encontram-se grânulos específicos contendo peptídeos microbicidas, proteínas e enzimas. Além disso, produtos da fosfolipase tais como leucotrienos e fator ativador plaquetário contribuem para alterações vasculares na inflamação aguda e promovem o dano tecidual mediado por neutrófilos.<sup>(41)</sup>

A queima oxidativa nos neutrófilos é desencadeada por fagocitose ou quando esta via é ativada por um estímulo específico in vivo. Este mecanismo oxidativo resulta em uma produção seqüencial de compostos intermediários reativos ao oxigênio (anion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil). Além da função anti-microbiana, estes compostos influenciam outras funções celulares: marginalização de neutrófilos, transdução de sinal entre leucócitos e células renais e mesangiais.<sup>(12)</sup>

Shah<sup>(46)</sup> evidenciou que os compostos reativos ao oxigênio estão implicados na fisiopatologia glomerular. Os efeitos destes compostos podem

---

contribuir para o desenvolvimento de proteinúria, alteração da taxa de filtração glomerular e mudanças morfológicas nas células glomerulares. Vários estudos indicam que não só os neutrófilos, mas também células mesangiais e células epiteliais glomerulares podem produzir compostos reativos ao oxigênio. Linas *et al.*<sup>(40)</sup> demonstraram a conexão entre liberação de compostos reativos ao oxigênio e lesão glomerular. Quando neutrófilos de pacientes com doença granulomatosa crônica foram reperfundidos em rins isquêmicos o dano renal não foi acentuado, contrastando com o aumento marcante do dano em rins que foram perfundidos com neutrófilos normais (controle). O único defeito reconhecido em neutrófilos de pacientes com doença granulomatosa crônica é a falha na produção de superóxido, indicando assim, o papel fundamental destes compostos reativos ao oxigênio no dano renal mediado por neutrófilos.

O mecanismo de destruição tecidual causado por neutrófilos de forma não oxidativa relaciona-se a enzimas hidrolíticas e polipeptídeos antimicrobianos. O conteúdo dos grânulos inclui mais de vinte enzimas, porém, serina proteinase, elastase e duas metaloproteinases (colagenase e gelatinase) são provavelmente os mediadores de maior potencial para a destruição tecidual. Cada uma destas proteinases é capaz de degradar componentes chaves da matriz extra-celular, que é composta por colágeno, elastina, proteoglicanos e glicoproteínas. Assim, a dissolução da matriz extra-celular mediada pelo neutrófilo pode danificar estruturas celulares ou a função celular e induzir a um dano agudo e potencialmente irreparável.

Os mecanismos de lesão tecidual oxidativo e não-oxidativo agem simultaneamente e de forma sinérgica, potencializando seus efeitos na lesão tecidual.<sup>(12)</sup>

A administração prévia de Anx-A1 conferiu importante proteção contra os efeitos da lesão de isquemia e reperfusão nas funções glomerulares e tubulares, possivelmente inibindo os mecanismos de lesão desencadeados a partir da infiltração tecidual dos neutrófilos. Este estudo contrasta com vários estudos realizados para minimizar o dano renal em modelos de I/R, pois estes obtiveram proteção renal parcial ou diminuição lesão tecidual, ao contrário do presente estudo onde verificou-se proteção precoce praticamente total com a utilização de Anexina1.<sup>(42)</sup> É interessante notar que os ratos tratados com anexina1 apresentaram fração de excreção de sódio e osmolalidade sugestivas de lesão pré-renal, isto é presença de um túbulo proximal funcionando na vigência de isquemia renal. Em contraste os indicadores de função tubular nos grupos Veic-I/R indicam lesão celular, o que é consistente com os achados histológicos, indicando novamente que a inflamação pós I/R tem papel importante na lesão tubular.

Quando há adesão de neutrófilos nas células endoteliais, a produção autócrina e parácrina da anexina1, é estimulada pelos glicocorticóides, para evitar o processo de diapedese e lesão tecidual.<sup>(47)</sup> O que deve ocorrer é que esta produção endógena nem sempre consegue contrabalançar eficientemente o estímulo pró-inflamatório, dependendo da intensidade inicial deste, o que possivelmente explica a eficácia de uma dose supra-fisiológica exógena de anexina1 encontrada no presente estudo.

De fato, existem vários relatos na literatura que indicam o aumento da anexina1 endógena em modelos experimentais, sobretudo em processos inflamatórios, assim como a capacidade dos glicocorticóides em induzir e amplificar a sua transcrição e produção.<sup>(48)</sup> A anexina1 é predominantemente encontrada na membrana de neutrófilos intravasculares aderentes ao endotélio. Uma vez no espaço extravascular, a maior parte da proteína contida nos neutrófilos é clivada na região N-terminal. Essa região tem sido caracterizada como promotora da ação antiinflamatória da Anx-A1.<sup>(49)</sup> Verificou-se que a análise quantitativa de neutrófilos em isquemia e reperfusão renal em ratos, com 2 e 7 dias foram bastante intensas nos grupos I/R-Veic., conforme demonstrado pela grande quantidade de neutrófilos encontrados no compartimento intravascular e neutrófilos transmigrados para as áreas do córtex e medula. Na análise quantitativa de neutrófilos dos grupos Anx-A1-I/R demonstrou-se insignificante quantidade de neutrófilos transmigrados apesar da presença destes no compartimento intravascular. Estes dados são consistentes com estudos anteriores aonde notou-se que a utilização de Anx-A1, antes do período de isquemia quente, inibiu a migração leucocitária em mesentério e cérebro.<sup>(48)</sup> Recentemente, demonstrou-se que a Anx-A1 exógena reduziu o dano miocárdio e a presença de leucócitos associados com o processo isquemia/reperfusão em tecido cardíaco.<sup>(14)</sup> Sugeriu-se que esta proteção poderia ter aplicação clínica, se a anexina1 fosse administrada logo após o período de isquemia miocárdica.<sup>(32)</sup>

No presente estudo notou-se menor proteção em relação à filtração glomerular nos ratos dos grupos (Anx-A1) no dia 7 após reperfusão. Esses

dados sugerem que, provavelmente em uma fase mais tardia da lesão de isquemia/reperfusão, possa haver a ação de outras células pró-inflamatórias não inibidas completamente pela Anx-A1, como linfócitos T e macrófagos que dependendo do tipo e tempo de exposição da lesão renal permanecem localizados predominantemente em zonas da medula que sofreram dano mais grave.<sup>(50)</sup>

Nas últimas décadas ocorreram grandes avanços no entendimento dos mecanismos envolvidos no desencadeamento e manutenção da IRA experimental. Entretanto, poucos desses conhecimentos foram traduzidos em medidas clínicas com capacidade de prevenir, tratar ou acelerar a recuperação da função renal em pacientes com IRA. Assim, a taxa de mortalidade dos pacientes com IRA permanece elevada, podendo atingir mais de 60% quando são analisados apenas pacientes de UTI.<sup>(51)</sup> Em transplante renal onde temos isquemia fria e reperfusão, a perda da função renal é uma complicação relativamente comum, ocorrendo entre 20-60% em transplantes de doadores-cadáveres.<sup>(52)</sup> Essa complicação prolonga o período de hospitalização e reduz o tempo de sobrevida do enxerto.<sup>(53,54)</sup> Assim, pesquisas em unidades de transplantes têm dado maior atenção na identificação de novas drogas que evitem, estabilizem ou revertam as lesões I/R.<sup>(28)</sup> Neste sentido, os achados do presente estudo representam uma promessa com alto potencial de aplicabilidade clínica, se os resultados encontrados em roedores forem confirmados em humanos.

Em resumo, os resultados deste estudo sugerem que a anexina1 e os neutrófilos tem papel importante nos mecanismos de lesão funcional e estrutural desencadeados pela manobra de isquemia/reperfusão em ratos.

## **5. CONCLUSÕES**

---

## **5. CONCLUSÕES**

1. A administração de Anx-A1, 30 minutos antes da isquemia quente, previne a transmigração de neutrófilos e confere proteção contra os efeitos iniciais da lesão de isquemia e reperfusão renal em ratos.
2. Esses resultados mostram que a transmigração de neutrófilos levando à inflamação, tem uma grande importância na lesão de isquemia e reperfusão renal.
3. Os achados histopatológicos mostraram que, tanto com 2 ou 7 dias após isquemia quente e reperfusão, os grupos tratados com Anx-A1 tiveram preservadas as estruturas corticais e medulares, tais como túbulos contorcidos proximais, distais e glomérulos renais.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zager RA. Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure. *Kidney Int* 1996 Feb.;49(2):314-26.
2. Costa MC, Yu L. Insuficiência renal aguda. *ARS Cvrandi* 1997;30(2):115-21.
3. Yu L, Gengaro PE, Niederberger M, Burke TJ, Schrier RW. Nitric oxide: a mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. *Proc Natl Acad Sci* 1994 Mar.;91(5):1691-5.
4. Bihari D, Neild G. *Acute renal failure in intensive therapy unit*. London: Spring-Verlag; 1990.
5. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1993 May;43(5):1160-78.
6. De Greef KE, Ysebaert DK, Ghielli M, Vercauteren S, Nouwen EJ, Eyskens EJ, *et al.* Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury. *J Nephrol* 1998 May-Jun.;11(3):110-22.
7. Turney JH. Outcome in acute renal failure: 32 years experience. In: Rainford D, Sweny P, editors. *Acute renal failure*. London: Farrandy Press; 1990. p. 300-19.

8. Simpson PJ, Mickelson JK, Lucchesi BR. Free radical scavengers in myocardial ischemia. *Fed Proc* 1987 May;46(7):2413-21.
9. Mason J, Welsch J, Torhorst J. The contribution of vascular obstruction to the functional defect that follows renal ischemia. *Kidney Int* 1987 Jan.;31(1):65-71.
10. Paller MS, Greene EI. Role of calcium in reperfusion injury of the kidney. *Ann N Y Acad Sci* 1994 Jun.;723:59-70.
11. Jones DB. Ultrastructure of human acute renal failure. *Lab Invest* 1982 Mar.;46(3):254-64.
12. Ysebaert DK, De Greef KE, Vercauteren SR, Ghielli M, Verpooten GA, Eyskens EJ and De Broe ME. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1562-1574.
13. Oliani SM, Perretti M. Cell localization of the anti-inflammatory protein annexin 1 during experimental inflammatory response. *Ital J Anat Embryol* 2001;106(2 Suppl 1):69-77.
14. D'Amico M, Di Filippo C, La M, Solito E, Mclean PG, Flower RJ, *et al.* Lipocortin 1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by affecting local leukocyte recruitment. *FASEB J* 2000;14(13):1867-9.

15. Flower RJ, Blackwell GJ. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature* 1979 Mar. 29;278(5703):456-9.
16. Geisow MJ, Walker JH. New proteins involved in cell regulation by Ca<sup>2+</sup> and phospholipids. *Trends Biochem Sci* 1986;11(10):420-3.
17. Smith PD, Moss SE. Structural evolution of the annexin supergene family. *Trends Genet* 1994 Jul.;10(7):241-6.
18. Flower RJ. Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *Br J Pharmacol* 1988 Aug.;94(4):987-1015.
19. Flower RJ, Rothwell NJ. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol Sci* 1994 Mar.;15(3):71-6.
20. Raynal P, Pollard HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994 Apr. 5;1197(1):63-93.
21. Pepinsky RB, Tizard R, Mattaliano RJ, Sinclair LK, Miller GT, Browning JL, *et al.* Five distinct calcium and phospholipid binding proteins share homology with lipocortin I. *J Biol Chem* 1988 Aug.;263(22):10799-811.

22. Munn TZ, Mues GI. Human lipocortin similar to *ras* gene products. *Nature* 1986 Jul. 24-30;332(6077):314-5.
23. Saris CJ, Tack BF, Kristensen T, Glenney JR Jr, Hunter T. The cDNA sequence for the protein-tyrosine kinase substrate p36 (calpactin 1 heavy chain) reveals a multidomain protein with internal repeats. *Cell* 1986 Jul. 18;46(2):201-12.
24. Mollitoris BA. Putting the actin cytoskeleton into perspective: pathophysiology of ischemic alterations. *Am J Physiol* 1997 Apr.;272(4 Pt 2):F430-3.
25. Badenoch AW, Darmady EM. The effects of temporary occlusion of the renal artery in rabbits and its relationship to traumatic uraemia. *J Pathol Bacteriol* 1997;59(1-2):79-94.
26. Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278(1):F1-F12.
27. Mollitoris BA. Ischemia-induced loss of epithelial polarity: potential role of the actin cytoskeleton. *Am J Physiol* 1991 Jun.;260(6 Pt 2):F769-78.

28. Mister M, Noris M, Szymczuk J, Azzollini N, Aiello S, Abbate M, *et al.* Propionyl-L-carnitine prevents renal function deterioration due to ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 2002 Mar.;61(3):1064-78.
29. Franklin WA, Ganote CE, Jennings RB. Blood reflow after renal ischemia. Effects of hypertonic mannitol on reflow and tubular necrosis after transient ischemia in the rat. *Arch Pathol* 1994 Aug.;98(2):106-11.
30. Schmidt-Nielsen B, O'Dell R. Structure and concentrating mechanism in the mammalian kidney. *Am J Physiol* 1991 Jun.;200:1119-24.
31. Zager RA, Gamelin LM. Pathogenetic mechanism in experimental hemoglobinuric acute renal failure. *Am J Physiol* 1989 256:446-455.
32. La M, D'Amico M, Bandiera S, Di Filippo C, Oliani SM, Gavins FN, *et al.* Annexin 1 peptides protect against experimental myocardial ischemia-reperfusion: analysis of their mechanism of action. *FASEB J* 2001 Oct.; 15(12):2247-56.
33. McNeil HP, Gotis-Graham I. Human mast cell subsets – distinct functions in inflammation? *Inflamm Res* 2000 Jan.;49(1):3-7.
34. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994; May;55(5):662-75.

35. Chou SY, Porush JG, Faubert PF. Renal medullary circulation: hormonal control. *Kidney Int* 1990 Jan;37(1):1-13.
36. Kwon O, Corrigan G, Myers BD, Sibley R, Scandling JD, Dafoe D, *et al.* Sodium reabsorption and distribution of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase during postischemic injury to the renal allograft. *Kidney Int* 1999 Mar.;55(3):963-75.
37. Kwon O, Phillips CL, Molitoris BA. Ischemia induces alterations in actin filaments in renal vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002 Jun.;282(6):F1012-9.
38. Sutton TA, Mang HE, Campos SB, Sandoval RM, Yoder MC, Molitoris BA. Injury of the renal microvascular endothelium alters barriers function after ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003 Aug.;285(2):F191-8.
39. Stevens SL, Bao J, Hollis J, Lessov NS, Clark WM, Stensel-Poore MP. The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 2002 Apr. 5;932(1-2):110-9.
40. Linas SL, Whittenburg D, Parsons PE, Repine JE. Ischemia increases neutrophil retention and worsens acute renal failure: role of oxygen metabolites and ICAM-1. *kidney Int* 1995, 48:1584-1591.

41. Hellberg PO, Kallskog TO. Neutrophil-mediated post-ischemic tubular leakage in the rat kidney. *Kidney Int* 1989, 36:555-561.
42. Paller MS. Effect of neutrophil depletion on ischemic renal injury in the rat. *J Lab Clin Med* 1989, 113:379-386.
43. Riera M, Torras J, Herrero I, Valles J, Paubert-Braquet M, Cruzado JM, Alsina J and Grinyo JM. Neutrophils accentuate renal cold ischemia-reperfusion injury. Dose-dependent protective effect of a platelet-activating factor receptor antagonist. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997, 280(2):786-794.
44. Chana RS, Wheeler DC. Fibronectin augments monocyte adhesion to low-density lipoprotein-stimulated mesangial cells. *kidney Int.* 1999, 55:179-188.
45. Wu X, Dolecki GJ, Lefkowitz JB: GRO chemokines: A transduction, integration, and amplification mechanism in acute renal inflammation. *Am J Physiol* 1995, 269:F248-F256.
46. Shah SV. The role of reactive oxygen metabolites in glomerular disease. *Annu Rev Physiol* 1995, 57:245-262.

47. Perretti M, Croxtall JD, Wheller SK, Goulding NJ, Hannon R, Flower RJ. Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. *Nat Med* 1996 Nov.;2(11):1259-62.
48. Perretti M, Getting SJ, Solito E, Murphy PM, Gao JL. Involvement of the receptor for formylated peptides in the in vivo anti-migratory actions of annexin 1 and its mimetics. *Am J Pathol* 2001 Jun.;158(6):1969-73.
49. Perretti M. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction, *Trends Pharmacol Sci* 18:418-425,1997.
50. Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Tilney NL: Prevention of late renal changes after initial ischemia/reperfusion injury by blocking early selectin binding. *Transplantation* 64:1520-1525,1997.
51. Santos WJQ. Comparação da morbidade e mortalidade entre necrose tubular aguda de origem isquêmica com a necrose tubular aguda de origem nefrotóxica e mista em pacientes internados em unidades de terapia intensiva [dissertação]. São José do Rio Preto: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto; 2003.
52. Cecka JM, Cho YW, Terasaki PI. Analyses of the UNOS Scientific Renal Transplant Registry at three years. Early events affecting transplant success. *Transplantation* 1992 Jan.;53(1):59-64.

53. Shoskes DA, Halloran PF. Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J Urol* 1996 Jun.;155(6):1831-40.
  
54. Lu CY. Ischemia, injury and renal allograft rejection. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996 Mar.;5(2):107-10.

## **7. APÊNDICE**

---

## 7. APÊNDICES

Apêndice 1. Aprovação do Comitê de Ética na Experimentação Animal.



Processo nº 4918/2004

### COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O projeto "Efeitos da Anexina-1 em isquemia e reperfusão renal em ratos", sob responsabilidade do Dr. Fernando Nestor Facio Junior avaliado por este comitê por cumprir com os princípios éticos exigidos em experimentação animal, foi aprovado pelo CEEA-FAMERP. Lembramos ao responsável a necessidade de apresentação de relatório ao término do estudo.

São José do Rio Preto, 21 de Fevereiro de 2005.

Prof. Dr. Valquiria Bueno  
Presidente CEEA - FAMERP

Apêndice 2. Comparação entre grupos das médias do peso inicial (g.), dos ratos com 2 dias de experimentação.

<b>Resumo dos Dados</b>					
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão da média</b>	<b>Mediana</b>
Anexina	8	275,50	11,514	4,071	279,00
Isquemia	8	272,75	14,587	5,157	269,00
Sham	8	276,00	9,754	3,449	277,50

<b>Intervalo de Confiança 95%</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>De</b>	<b>Para</b>
Anexina	260,00	295,00	265,87	285,13
Isquemia	259,00	300,00	260,55	284,95
Sham	260,00	290,00	267,84	284,16

Apêndice 3. Comparação entre grupos das média do peso inicial (g.), dos ratos com 7 dias de experimentação.

<b>Resumo dos Dados</b>					
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão da Média</b>	<b>Mediana</b>
Anexina	8	267,88	12,438	4,397	267,50
Isquemia	8	262,50	14,142	5,000	265,00
Sham	8	273,50	13,916	4,920	271,50

<b>Intervalo de Confiança 95%</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>De</b>	<b>Para</b>
Anexina	250,00	283,00	257,48	278,27
Isquemia	240,00	280,00	250,68	274,32
Sham	255,00	295,00	262,11	285,39

Apêndice 4. Comparação entre grupos da média do volume urinário dos ratos com 2 dias de experimento (ml).

<b>Resumo dos Dados</b>					
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão da Média</b>	<b>Mediana</b>
Anexina	8	11,888	2,383	0,8425	11,800
Isquemia	8	9,288	0,8806	0,3114	9,100
Sham	8	15,663	4,075	1,441	17,350

<b>Intervalo de Confiança 95%</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>De</b>	<b>Para</b>
Anexina	9,000	16,300	9,895	13,880
Isquemia	8,000	10,800	8,551	10,024
Sham	9,500	20,000	12,255	19,070

Apêndice 5. Comparação entre grupos da média do volume urinário dos ratos com 7 dias de experimento (ml).

<b>Resumo dos Dados</b>					
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão da Média</b>	<b>Mediana</b>
Anexina	8	14,900	4,619	1,633	13,400
Isquemia	8	9,825	0,7146	0,2527	10,000
Sham	8	15,513	2,669	0,9437	14,100

<b>Intervalo de Confiança 95%</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>De</b>	<b>Para</b>
Anexina	10,600	24,000	11,038	18,762
Isquemia	8,400	10,500	9,227	10,423
Sham	12,800	20,500	13,281	17,744

Apêndice 6. Comparação entre grupos da média de taxa de filtração glomerular (Cin,ml/min/100g), com 2 dias de experimento.

<b>Resumo dos Dados</b>					
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão da Média</b>	<b>Mediana</b>
Anexina	8	0,8663	0,1613	0,05704	0,8550
Isquemia	8	0,4250	0,07635	0,02699	0,4250
Sham	8	1,016	0,3456	0,1222	1,050

<b>Intervalo de Confiança 95%</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>De</b>	<b>Para</b>
Anexina	0,6300	1,100	0,7314	1,001
Isquemia	0,3000	0,5200	0,3612	0,4888
Sham	0,5900	1,500	0,7273	1,305

Apêndice 7. Comparação entre grupos da média de taxa de filtração glomerular (Cin,ml/min/100g), com 7 dias de experimento

<b>Resumo dos Dados</b>					
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão da Média</b>	<b>Mediana</b>
Anexina	8	0,7363	0,1395	0,04931	0,6950
Isquemia	8	0,4875	0,1671	0,05909	0,4200
Sham	8	1,103	0,2592	0,09165	1,045

<b>Intervalo de Confiança 95%</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>De</b>	<b>Para</b>
Anexina	0,6200	1,000	0,6169	0,8529
Isquemia	0,2800	0,7200	0,3477	0,6273
Sham	0,7900	1,530	0,8858	1,319

Apêndice 8. Comparação entre grupos da média do índice de excreção fracional de sódio(%), com 2 dias de experimento.

<b>Resumo dos Dados</b>					
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão da Média</b>	<b>Mediana</b>
Anexina	8	0,1788	0,04190	0,01481	0,1750
Isquemia	8	0,4213	0,1006	0,03558	0,4200
Sham	8	0,2188	0,05111	0,01807	0,2200

<b>Intervalo de Confiança 95%</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>De</b>	<b>Para</b>
Anexina	0,1200	0,2500	0,1437	0,2138
Isquemia	0,2400	0,5900	0,3371	0,5054
Sham	0,1300	0,2800	0,1760	0,2615

Apêndice 9. Comparação entre grupos da média do índice de excreção fracional de sódio(%), com 7 dias de experimento.

<b>Resumo dos Dados</b>					
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão da Média</b>	<b>Mediana</b>
Anexina	8	0,2700	0,09681	0,03423	0,2900
Isquemia	8	0,5275	0,1130	0,03994	0,5100
Sham	8	0,2913	0,05463	0,01931	0,2750

<b>Intervalo de Confiança 95%</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>De</b>	<b>Para</b>
Anexina	0,1200	0,3900	0,1891	0,3509
Isquemia	0,3300	0,7200	0,4330	0,6220
Sham	0,2000	0,3600	0,2456	0,3369

Apêndice 10. Comparação entre grupos da média dos índices de fração de excreção de potássio(%), com 2 dias de experimento.

<b>Resumo dos Dados</b>					
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão da Média</b>	<b>Mediana</b>
Anexina	8	32,375	5,548	1,961	34,150
Isquemia	8	60,313	9,155	3,237	59,600
Sham	8	34,638	4,484	1,585	35,350

<b>Intervalo de Confiança 95%</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>De</b>	<b>Para</b>
Anexina	21,100	37,600	27,736	37,014
Isquemia	43,000	73,700	52,658	67,967
Sham	26,700	39,500	30,888	38,387

Apêndice 11. Comparação entre grupos da média dos índices de fração de excreção de potássio(%), com 7 dias de experimento.

<b>Resumo dos Dados</b>					
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão da Média</b>	<b>Mediana</b>
Anexina	8	29,988	5,615	1,985	30,150
Isquemia	8	68,700	14,390	5,088	66,800
Sham	8	36,900	4,724	1,670	36,550

<b>Intervalo de Confiança 95%</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>De</b>	<b>Para</b>
Anexina	24,100	36,400	25,293	34,682
Isquemia	49,200	87,100	56,668	80,732
Sham	31,000	45,400	32,950	40,850

Apêndice 12. Comparação entre grupos da média da razão das osmolalidade urinário/plasmáticas (U/P osm), com 2 dias de experimento.

<b>Resumo dos Dados</b>					
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão da Média</b>	<b>Mediana</b>
Anexina	8	1368,9	178,17	62,992	1310,5
Isquemia	8	876,25	118,36	41,847	866,50
Sham	8	1111,0	109,40	38,679	1104,5

<b>Intervalo de Confiança 95%</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>De</b>	<b>Para</b>
Anexina	1159,0	1664,0	1219,9	1517,9
Isquemia	720,00	1100,0	777,28	975,22
Sham	939,00	1233,0	1019,5	1202,5

Apêndice 13. Comparação entre grupos da média da razão das osmolalidade urinário/plasmática(U/P osm), com 7 dias de experimento.

<b>Resumo dos Dados</b>					
<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro Padrão da Média</b>	<b>Mediana</b>
Anexina	8	1167,0	198,07	70,028	1218,5
Isquemia	8	925,63	213,93	75,637	825,50
Sham	8	1283,1	114,78	40,583	1284,5

<b>Intervalo de Confiança 95%</b>				
<b>Grupo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>De</b>	<b>Para</b>
Anexina	704,00	1321,0	1001,4	1332,6
Isquemia	748,00	1307,0	746,74	1104,5
Sham	1073,0	1492,0	1187,1	1379,1