FELIPE CAETANO BERALDO

# PARTICIPAÇÃO DE MASTÓCITOS NA LESÃO RENAL INDUZIDA POR ISQUEMIA/REPERFUSÃO

**CAMPINAS** 

2007

i

## PARTICIPAÇÃO DE MASTÓCITOS NA LESÃO RENAL INDUZIDA POR ISQUEMIA/REPERFUSÃO

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas.

ORIENTADORA: PROF. DRA. MARILDA MAZZALI

**CAMPINAS** 

2007

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

B45p	Beraldo, Felipe Caetano Participação de mastócitos na lesão renal induzida por isquemia / reperfusão / Felipe Caetano Beraldo. Campinas, SP : [s.n.], 2007.
	Orientador : Marilda Mazzali Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
	<ol> <li>Mastócitos. 2. Isquemia. 3. Reperfusão (Fisiologia). 4 Insuficiência renal aguda 5. Inflamação. I. Mazzali, Marilda. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</li> </ol>

#### Título em inglês : "Role of mast cells in ischemic acute renal failure"

#### Keywords: • Mast cells

- Ischemia
- Reperfusion (Physiology)
- Acute renal failure
- Inflammation

Titulação: Mestre em Clínica Médica Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Profa. Dra Marilda Mazzali Profa. Dra. Miriam Aparecida Boim Prof Dr José Antonio Gontijo

Data da defesa: 30 - 08 - 2007

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

#### Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilda Mazzali

Mem	bros:	
1.	Prof(a). Dr(a) . Miriam Aparecida Boim_	manger Bald
2.	Prof(a). Dr(a). José Antonio Gontijo	ast
3.	Prof(a). Dr(a). Marilda Mazzali	Quinal

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas, da Faculdade de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/08/2007

200902466

#### DEDICATÓRIA

Ao amigo Adílton Gomes Kós [In memorian].

Aos meus pais, Orlando e Maria, por todo o amor, apoio, incentivo, valores e princípios.

À minha orientadora, Professora Dra. Marilda Mazzali pela oportunidade, ensinamentos, incentivo e amizade.

À minha namorada Georgia Daniela pela ajuda, cumplicidade, dedicação e, principalmente, paciência.

Aos docentes da Disciplina de Nefrologia pela receptividade, oportunidade e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Nefrologia I: Patrícia, Sohemys, Fabiana, Fernanda, Juliana, Renato e Victor pela amizade, pelo descontraído ambiente de trabalho, apoio e ajuda.

Ao Sérgio e Isabel, do Laboratório de Anatomia Patológica Experimental pelo auxílio no processamento do material histológico.

À Disciplina de Nefrologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [FAPESP] pela concessão da bolsa de mestrado [Processo 05/52333-7].

ix

RESUMO	xxxi
ABSTRACT	xxxv
1- INTRODUÇÃO	39
2- HIPÓTESE	55
3- OBJETIVOS	59
3.1- Principal	61
3.2- Secundários	61
4- MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1- Modelo experimental	65
4.2- Técnica cirúrgica	65
4.3- Sacrifício e coleta de material para análise	67
4.4- Desenho do estudo	67
4.5- Parâmetros estudados	67
4.5.1- Peso	67
4.5.2- Função renal – creatinina sérica	68
4.5.3- Análise morfológica	68
4.5.3.1- Processamento do tecido renal	68
4.5.3.2- Avaliação do grau de necrose tubular	69
4.5.4- Histoquímica para mastócitos	70
4.5.5- Imunohistoquímica	71
4.5.5.1- Proliferação celular	72

4.5.5.2- Infiltrado inflamatório	72
4.5.5.2.1- Macrófagos	72
4.5.5.2.2- Linfócitos T	73
4.5.5.3- Marcadores pró-inflamatórios	73
4.5.5.3.1- Osteopontina	73
4.5.5.4- Marcadores de diferenciação	74
4.5.5.4.1- Vimentina	74
4.5.5.5- Marcadores pró-fibróticos	74
4.5.5.5.1- Alfa-actina	74
4.6- Análise estatística	74
5- RESULTADOS	75
5.1- Peso	77
5.2- Função renal	78
5.3- Necrose tubular aguda	79
5.4- Proliferação celular	82
5.5- Infiltrado inflamatórios	86
5.5.1- Mastócitos	86
5.5.2- Macrófagos	88
5.5.3- Linfócitos T	91
5.6- Marcadores pró-inflamatórios	94
5.6.1- Osteopontina	94
5.7- Marcadores de diferenciação	97
5.7.1- Vimentina	97

5.8- Marcadores pró-fibróticos	99
5.8.1- Alfa-actina	99
6- DISCUSSÃO	103
7- CONCLUSÕES	115
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

ACT	alfa-actina
bFGF	fator de crescimento de fibroblastos
CETs	células epiteliais tubulares
EROs	espécies reativas de oxigênio
ICAM-1	molécula de adesão intra-celular 1
IgA	imunoglobulina A
IL	interleucina
I/R	isquemia/reperfusão
IRA	insuficiência renal guda
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
MCP-1	proteína de ativação de monócitos 1
MCSF	fator estimulante de colônias de macrófagos
MPO	mieloperoxidase
NTA	necrose tubular aguda
NO	óxido nítrico
OPN	osteopontina
PAS	ácido periódico/reativo de Schiff
PCNA	antígenos de proliferação nuclear celular
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PMNs	polimorfonucleares
SCF	fator de crescimento de célula tronco
SF	soro fisiológico

- **TEM** transdiferenciação epitélio mesenquimal
- TFG taxa de filtração glomerular
- **TGF-β** fator transformador de crescimento beta
- **TNF-** $\alpha$  fator de necrose tumoral alfa
- **VEGF** fator de crescimento de célula endotelial
- VIM vimentina

Tabela 1-	Variação do peso [gramas] dos animais nos diferentes pontos do estudo	77
Tabela 2-	Valores de creatinina sérica [mg/dL] nos diferentes períodos do estudo	78
Tabela 3-	Perncetual de túbulos íntegros, túbulos em degeneração, túbulos completamente degenerados/"carecas" e túbulos em regeneração pós-I/R	80
Tabela 4-	Proliferação celular [células PCNA+] nos segmentos tubulares proximais, distais e medulares, interstício cortical e medular pós-I/R	82
Tabela 5-	Infiltração de mastócitos [células/mm2] em córtex e medula nos grupos estudados	86
Tabela 6-	Infiltração de macrófagos [células/mm <sup>2</sup> ] em córtex e medula nos grupos estudados	88
Tabela 7-	Infiltração de linfócitos T [células/mm <sup>2</sup> ] em córtex e medula nos diferentes grupos	91
Tabela 8-	Expressão de osteopontina [%área] em córtex e medula nos grupos estudados	94
Tabela 9-	Expressão de vimentina [%área] em córtex e medula nos grupos estudados	97
Tabela 10-	Expressão de alfa-actina [%área] em córtex e medula nos grupos estudados	100

Figura 1-	Procedimento cirúrgico. Clampeamento da artéria renal [A] e rim isquêmico [B]	66
Figura 2-	Necrose tubular aguda [PAS,1000x]. Túbulos íntegros [A], túbulos em degeneração com perda de bordadura em escova e destacamento de células tubulares [setas] [B], túbulos completamente degenerados ["carecas"] com exposição da membrana basal tubular [C] e células tubulares em regeneração, com núcleos aumentados e citoplasma tumefeito [setas] [D]	70
Figura 3-	Histoquímica para mastócitos [Azul de toluidina, 1000x]. Coloração citoplasmática ortocromática azul em mastócitos no interstício renal [A] e violeta em mastócitos de cápsula [B]	71
Figura 4-	Necrose tubular aguda foi mais intensa nas primeiras horas pós-reperfusão [D1 e D3] com redução gradativa nos grupos subsequentes [D5 à D14]. Coloração de PAS [100x]	81
Figura 5-	Proliferação celular em córtex. No interstício cortical, a proliferação teve pico em D7. Células PCNA positivas coradas em marrom, contra-coloração com PAS [200x]	84
Figura 6-	Proliferação celular em medula foi mais precoce do que em córtex [D3]. Células PCNA positivas coradas em marrom, contra-coloração com PAS [200x]	85

Figura 7-	Infiltração de mastócitos. Em córtex [A], o aumento de	
	mastócitos foi significativo apenas em D7. Na região medula	
	[B], o infiltrado ocorreu precocemente [D1], mantendo-se	
	estável durante a primeira semana pós-I/R [D1-D7] e	
	apresentando pico tardio em D14. Mastócitos corados em	
	azul [setas] a partir da coloração com azul de toluidina	
	[1000x]	87
Figura 8-	Infiltração de macrófagos em córtex. Pico de infiltração	
	observado em D7, com redução em D14. Macrófagos	
	corados em marrom, contra-coloração com hematoxilina de	
	Harris [200x]	89
Figura 9-	Infiltração de macrófagos em medula. Elevação a partir de	
	D3, com pico entre D5 e D7 e redução em D14. Macrófagos	
	corados em marrom, contra-coloração com hematoxilina de	
	Harris [200x]	90
Figura 10-	Infiltração de linfócitos T em córtex. Aumento do infiltrado	
	deste tipo celular a partir de D1, mantendo-se estável nos	
	grupos subsequentes. Linfócitos T corados em marrom,	
	contra-coloração com hematoxilina de Harris [200x]	92
Figura 11-	Infiltração de linfócitos T em medula. Aumento do infiltrado	
_	a partir de D3, com tendência de redução a partir de D7.	
	Linfócitos T corados em marrom, contra-coloração com	
	hematoxilina de Harris [200x]	93
Figura 12-	Expressão de osteopontina em córtex. Elevação progressiva a	
	partir de D1, com pico em D3 e redução progressiva até D14.	
	Osteopontina em marrom, contra-coloração com	
	hematoxilina de Harris	95

Figura 13-	Expressão de osteopontina em medula. Expressão precoce	
	[D1] e constante até D7. Osteopontina em marrom,	
	contra-coloração com hematoxilina de Harris	96
Figura 14-	Expressão de vimentina em córtex. Maior expressão	
	observada em D3 e D7. Vimentina em marrom,	
	contra-coloração com hematoxilina de Harris	98
Figura 15-	Expressão de vimentina em medula. Elevação a partir de D3,	
	pico em D5 e D7 e redução em D14. Vimentina em marrom,	
	contra-coloração com hematoxilina de Harris	99
Figura 16-	Expressão de alfa-actina em córtex. Elevação a partir de D1,	
	permanecendo constante nos grupos subsequentes.	
	Alfa-actina em marrom, contra-coloração com hematoxilina	
	de Harris	101
Figura 17-	Expressão de alfa-actina em medula. Elevação a partir de	
	D3, com aumento progressivo até D7 e tendência à redução	
	em D14. Alfa-actina em marrom, contra-coloração com	
	hematoxilina de Harris	102

Gráfico 1-	Variação do peso [gramas] entre a data da cirurgia e a data do	
	sacrifício	77
Gráfico 2-	Creatinina sérica [mg/dL] nos períodos do estudo	78
Gráfico 3-	Percentual de túbulos íntegros [A], túbulos em degeneração [B], túbulos "carecas" [C] e túbulos em regeneração [D] pós-I/R	80
Gráfico 4-	Proliferação celular em túbulos proximais [A], túbulos distais [B], interstício cortical [C], túbulos medulares [D] e interstício	
	medular [E] pós-I/R	83

## RESUMO

A lesão renal causada pela isquemia é a principal causa de insuficiência renal aguda [IRA] em rins nativos e transplantados. A fisiopatologia da IRA induzida por isquemia/reperfusão [I/R] envolve alterações na hemodinâmica renal, lesão de células endoteliais e tubulares e os processos inflamatórios, que resultam na ativação e lesão de células endoteliais, aumento da adesão entre células endoteliais e leucócitos, migração de leucócitos para o tecido afetado e comprometimento microvascular. Dentre as células inflamatórias envolvidas no modelo I/R, estudos demonstram a participação de macrófagos e leucócitos. Os mastócitos, apesar de participarem ativamente do processo de fibrose intersticial renal, são pouco estudados neste modelo. Estudos anteriores demonstraram que a presença de mastócitos em transplantes renais humanos com necrose tubular aguda [NTA] apresentou correlação com o desenvolvimento de fibrose intersticial. Assim, o presente estudo tem como hipótese que a presença de mastócitos no modelo de I/R seria um fator de risco para o desenvolvimento de nefropatia crônica. Para tanto, animais [ratos Wistar machos] foram submetidos ao procedimento clássico de isquemia/reperfusão e sacrificados a períodos variáveis de 0 a 14 dias. Ao final de cada período foram analisadas a função renal [creatinina sérica], a presença de células inflamatórias [macrófagos, mastócitos, linfócitos T], a proliferação celular, a expressão de fatores pró-inflamatórios [osteopontina], de diferenciação epititélio-mesenquimal [vimentina] pró-fibróticos [alfa-actina] através e de imunohistoquímica. Os animais desenvolveram IRA, confirmada pela presença de elevação de creatinina sérica a partir de D1 e pela presença de alterações degenerativas tubulares, especialmente em camada medular externa. A partir do D7 pós reperfusão teve início o processo regenerativo tubular, com redução dos níveis séricos de creatinina e aumento do número de túbulos com regeneração celular. O infiltrado inflamatório medular, detectado por aumento de expressão de células PCNA + apresentou pico em D3. Os mastócitos foram as primeiras células a apresentar aumento de expressão (D1), seguidas de linfócitos e macrófagos em D3. Entretanto, enquanto o infiltrado de macrófagos e linfócitos diminuiu a partir de D7, o número de mastócitos permaneceu crescente, com pico em D14. A expressão de osteopontina em camada medular foi precoce (D1) e constante até D7, enquanto vimentina apresentou elevação a partir de D3, com pico em D5-7. Em D14, tanto a expressão de osteopontina como de vimentina foram menos intensas, porém ainda significativamente superiores às dos animais controle (Sham). Miofibroblastos,

identificados através de imunohistoquímica para alfa actina apresentaram aumento significativo a partir de D3, e persistiram elevados até o período final do estudo (D14). Estes dados sugerem que os mastócitos participam do processo de resposta renal à isquemia, com infiltração precoce e persistência durante o processo de regeneração/cicatrização. A associação com macrófagos e linfócitos sugere sua participação no processo inflamatório inicial. Entretanto, a persistência de mastócitos e a associação com expressão de vimentina e de alfa actina sugerem que estas células também tem participação no processo de regeneração e de cicatrização tecidual.

## ABSTRACT

Renal ischemia is the main cause of acute renal failure in both native and transplanted kidneys. Ischemia/reperfusion lesion includes changes in renal hemodynamic, endothelial and tubular cell lesion, and inflammatory process, resulting in endothelial cell activation, increased adhesion of endothelial cells and leukocytes, migration of circulating cells to damaged tissue and microvascular dysfunction. While macrophages and T cells are usually analyzed in this model, mast cells, another group of inflammatory cells, are forgotten. Previous studies have shown that mast cells are involved in renal fibrosis, but its participation in the acute phase of renal injury remains unknown. In this study we hypothesized that the presence of mast cells in response to ischemia reperfusion lesion could be a risk factor for the development of renal fibrosis. Male Wistar rats undergone bilateral renal artery clamping for 45 minutes, and were sacrificed from 0 to 14 days after reperfusion. At each study point, renal function, (serum creatinine) and renal morphology (PAS staining), presence of cell proliferation (PCNA), inflammatory cells (macrophages, T cells and mast cells), as well as the expression of pro inflammatory (osteopontin), de-differentiation (vimentin) and pro fibrotic ( $\alpha$  smooth muscle cell actin-  $\alpha$ SMA ) markers were analyzed. All studied animals developed acute renal failure, confirmed by the increase in serum creatinine and presence of degenerative tubular cell lesions in outer medulla, from D1. Seven days after reperfusion the regenerative process started, with decrease in serum creatinine levels and increase in number of regenerative tubular cells. Interstitial inflammatory response in medulla, analyzed by PCNA stained, peaked at D3. Mast cells was the early detected cell type (D1), followed by both macrophages and T cells at D3. However, while macrophages and T cells infiltrates decreased from D7, mast cell remained in medullar interstitium, with a peak in D14. Osteopontin expression in medulla was observed at early points (D1), and remained constant till D7. Vimentin increased from D3, peaking from D5-D7. Despite a reduction of osteopontin and vimentin expression was observed at D14, these values were still higher than in control animals (Sham). Myofibroblasts, identified by aSMA staining were observed in medulla from D3, and persisted until the end of study period (D14). These data suggests that mast cells are involved in the tissue response to ischemic injury, with an early infiltration and persisting during the repare/scare phase. Association with macrophages and T cells suggests the participation of mast cells in the early inflammatory response. However, its persistence and association with vimentin and myofibroblasts suggests the participation in both renal repare and scarring process.

# 1- INTRODUÇÃO

A isquemia de um órgão ou tecido é caracterizada pela deficiência na oferta de oxigênio e nutrientes em quantidades necessárias para a manutenção das funções celulares por um período de tempo. Esta deficiência é resultado da interrupção do fluxo sanguíneo, que desencadeia um processo de lesão celular e tecidual com graus variados de disfunção orgânica [Scannel, 1996].

A lesão por isquemia e reperfusão [I/R] está associada à alta mortalidade e morbidade e é fator etiológico de várias doenças, como embolia pulmonar, acidente vascular cerebral e doença coronariana [Thadani et al, 1996]. No tecido renal, a lesão por I/R é a principal causa de insuficiência renal aguda [IRA] [Thadani *et al*, 1996] em rins nativos [Raab *et al*, 1997] e transplantados [Shoskes & Halloran, 1996].

A insuficiência renal aguda é caracterizada por uma perda repentina das funções renais, com inabilidade em excretar produtos metabólicos, concentrar a urina, conservar eletrólitos e manter o balanço hídrico do organismo [Schrier et al, 2004]. A mortalidade varia de acordo com o grau de acometimento do órgão, entre 20 a 70% [Shoskes & Halloran, 1996]. Apesar de todos os avanços médicos, a IRA continua sendo o maior desafio na medicina clínica, com índices de mortalidade e morbidade pouco alterados nas últimas duas décadas [Ysebaert *et al*, 2000].

No transplante renal, sinais de isquemia são observados imediatamente após a retirada do órgão e seus efeitos a longo prazo têm grande importância na sobrevida do enxerto [Van Es *et al*, 1983]. Mesmo com acondicionamento correto, refrigeração e uso de soluções de preservação adequadas, a isquemia leva a alterações moleculares na microvasculatura e no interstício do órgão. A lesão por I/R promove perda de células tubulares renais por necrose e/ou apoptose, levando a pior função imediata do órgão e, em longo prazo, à menor sobrevida do enxerto [Azuma *et al*, 1997]. Após o implante do órgão ocorre a reperfusão, levando a uma resposta inflamatória aguda [Gueler *et al*, 2004]. É ainda pouco claro como os mecanismos inflamatórios desencadeados pela I/R afetam, a longo prazo, as funções do rim transplantado e o quanto esta lesão atua no desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto [Ysebaert *et al*, 2004].

O tecido renal é extremamente vulnerável aos efeitos deletérios do processo de isquemia [Ysebaert *et al*, 2004]. O rim é o órgão mais perfundido do organismo, recebendo, em média, um aporte sanguíneo de 80mL/min x 100g peso [Brezis et al, 1984]. No entanto, a tensão de oxigênio no parênquima renal, em especial na região medular, é a menor encontrada entre os órgãos [Lubbers & Baumgartl, 1997]. Esta aparente discrepância é resultado da arquitetura única da vasculatura renal. Os arranjos paralelos de veias e artérias, correndo em contato íntimo em córtex e medula, permitem a difusão de oxigênio do sistema arterial para o venoso antes da entrada do sangue na rede capilar [Zhang & Edwards, 2002]. Ao mesmo tempo, a maioria dos segmentos tubulares possui capacidade reduzida de trabalho anaeróbico, necessitando do aporte de oxigênio para manter suas funções de reabsorção de solutos, principalmente sódio. A combinação entre suprimento limitado de oxigênio e alta demanda é considerada a principal causa da alta suscetibilidade do tecido renal à lesão isquêmica [Brezis & Rosen, 1995].

A resposta do rim à isquemia é heterogênea. Os efeitos são observados inicialmente nas regiões mais vulneráveis à hipóxia [Bonventre & Zuk, 2004]. A *vasa recta* da medula renal [Friedewald & Rabb, 2004], a porção S3 do túbulo contorcido proximal e a porção espessa da alça de Henle são as regiões mais suscetíveis à lesão isquêmica [Reimer *et al*, 1972] devido à sua alta atividade metabólica [Brezis & Epstein, 1993].

A lesão isquêmica promove alterações morfológicas nas células epiteliais tubulares [CETs] como perda da polaridade, de bordadura em escova e das junções célulascélula na porção basal, além da re-distribuição de integrinas da porção basolateral para a apical [Molitoris et al, 1989]. Como todas as células aderentes, as CETs necessitam de adesão completa à membrana basal para desempenhar suas funções. A ancoragem destas células é mediada por integrinas e receptores transmembrana aderidos à proteínas de matriz extracelular. A lesão isquêmica leva à necrose e destacamento das células epiteliais tubulares, com obstrução da luz tubular [Nony & Schnellmann, 2002]. A bordadura em escova destacada e os *debris* celulares obstruem as porções distais do néfron, levando à dilatação tubular proximal característica de biópsias com IRA [Oliver et al, 1951]. Além disso, o comprometimento das células epiteliais tubulares proximais leva à redução na absorção de íons sódio, o que ativa o *feedback* túbulo-glomerular, diminuindo a taxa de filtração glomerular [TFG] [Schnermann & Hommer, 2003]. A perda de células epiteliais tubulares viáveis leva ao vazamento de filtrado glomerular de volta à circulação, mecanismo conhecido como *back-leack*, o que eleva os níveis de creatinina sérica, outro indicador de IRA. Ao contrário do observado em modelos animais, este fenômeno é dificilmente observado em humanos [Edelstein & Schrier, 2001].

Na fase de reperfusão também ocorre lesão tecidual, através da ativação de mecanismos inflamatórios e da liberação de espécies reativas de oxigênio [EROs]. A resposta inflamatória parecer ser o principal componente deste processo, e resulta em ativação e lesão de células endoteliais, aumento da adesão entre células endoteliais e leucócitos, migração de leucócitos para o tecido afetado e comprometimento microvascular [Linas *et al*, 1988].

Desta forma, a fisiopatologia da insuficiência renal aguda induzida por isquemia/reperfusão envolve uma complexa relação entre lesão de células tubulares, alterações na hemodinâmica renal, lesão de células endoteliais e processos inflamatórios [Molitoris & Sutton, 2004].

O endotélio é centro de inúmeros de processos biológicos. A perda das funções regulatórias das células endoteliais tem grande impacto sobre as funções renais. A lesão e disfunção do endotélio são fatores cruciais na alteração das funções vasculares durante a fase inicial e extensa da lesão renal induzida por I/R [Molitoris & Sutton, 2004]. Com a ativação das células endoteliais ocorre aumento da permeabilidade vascular, aumento na expressão de moléculas de adesão, como a ICAM-1 [Halloran *et al*, 1997], aumento na expressão de selectinas P e E na membrana [Eppiximer *et al*, 1997] e redução da produção de óxido nítrico [NO] [Brodsky *et al*, 2002].

As moléculas de adesão são cruciais para o recrutamento e infiltração de células efetoras para o tecido [Hancock *et al*, 1993]. Estas moléculas são mediadores das interações entre as células endoteliais e os leucócitos, desempenhando papel chave no acúmulo de leucócitos no local da lesão [Molitoris & Sutton, 2004].

Estudos recentes mostram que o bloqueio da adesão leucócito-endotélio [Bonventre & Kelly, 1996b], a inibição da expressão de moléculas de adesão [Kelly *et al*, 1996], a redução na ativação de células endoteliais [Ghielli *et al*, 1998] bem como a inibição de selectinas P e E [Takada *et al*, 1997] previnem ou reduzem os danos causados ao tecido pela lesão isquêmica. Além disso, a ativação de células endoteliais e o aumento da expressão de moléculas de adesão podem levar à formação de aglomerados celulares e redução na luz vascular, favorecendo fenômenos trombóticos e levando à obstrução mecânica de pequenos vasos [Bonventre, 1996<sup>a</sup>]. Esta redução no fluxo sanguíneo resulta na diminuição significativa da taxa de filtração glomerular, característica de IRA [Ghielli *et al*, 1998]. Outro mecanismo postulado para o desenvolvimento de obstrução de microvasculatura é a ocorrência de deformidades celulares secundárias à hipóxia medular, com perda dos estoques de energia celular e dissociação do citoesqueleto de actina das células endoteliais [Sutton *et al*, 2003], que facilitam a interação endotélio-leucócito e a trombose de microvasculatura.

As alterações locais no fluxo sanguíneo renal persistem após o evento isquêmico inicial e desempenham papel importante na lesão tecidual. Durante a fase de reperfusão, redução do fluxo sanguíneo para 40-50% do normal tem sido descrita em modelos animais e humanos [Lieberthal, 1997]. Este déficit sanguíneo é mais intenso na medula do que no córtex [Olof *et al*, 1991]. Os mecanismos envolvidos na alteração do fluxo sanguíneo renal pós-reperfusão não estão completamente esclarecidos [Molitoris & Sutton, 2004].

Com a restituição do fluxo sanguíneo [reperfusão], há um período de recuperação inicial e relativa quiescência tecidual. Entretanto, nesta fase têm início as alterações morfológicas progressivas, com proteinúria, glomerulosclerose, obstrução arterial e fibrose intersticial. Esse fenômeno é acompanhado da re-expressão de moléculas de adesão, infiltração progressiva de linfócitos e de seus produtos associados [Gueler *et al*, 2004].

Embora o número de estudos sobre a ação dos leucócitos na lesão renal induzida por I/R seja abundante, os mecanismos de ativação e ação destas células no tecido, nas fases iniciais e finais do processo de I/R ainda são pouco entendidos [Ysebaert *et al*, 2004].

Os leucócitos são ativados por mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e EROs, e recrutados por quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e TNF- $\alpha$  [Donnahoo *et al*, 2000]. A lesão intersticial pode ter diferentes apresentações, de acordo com o subgrupo de leucócitos ativado [Hellberg *el al*, 1989].

A adesão dos leucócitos às células endoteliais potencializa a resposta inflamatória, através da liberação de novos mediadores pró-inflamatórios [Gueler *et al*, 2004]. A exposição de leucócitos às citocinas circulantes diminui a deformidade celular e aumenta a probabilidade de migração destas células para o tecido [Suwa *et al*, 2001].

Na fase crítica inicial, leucócitos ativados aderem ao endotélio vascular e bloqueiam ou reduzem a velocidade do fluxo sanguíneo na rede capilar. Estas células retornam, posteriormente, à circulação sistêmica [fenômeno conhecido como *hit-and-run*]. Na fase tardia, estes leucócitos aderem firmemente ao endotélio e sofrem diapedese, migrando para o tecido [Savransky et al, 2006].

Da mesma forma que os leucócitos e as células endoteliais, as células epiteliais tubulares também geram mediadores que potencializam o processo inflamatório na lesão renal induzida por isquemia. Dentre eles, destacam-se as citocinas pró-inflamatórias [TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ] e citocinas "quimioatrativas", como a proteína de ativação de macrófagos 1 [MCP-1] [Daha & Van Kooten, 2000]. Células epiteliais atuam diretamente na resposta à hipóxia gerando, também, moléculas de adesão e óxido nítrico, fatores que já foram demonstrados como sendo resposta à lesão por isquemia/reperfusão.

Quimiocinas são sintetizadas rapidamente no rim logo após a isquemia [Miura et al, 2001]. Em resposta à hipóxia, a necrose celular libera uma série de fatores inflamatórios [Nathan, 2002]. No entanto, é difícil distinguir sinais inflamatórios gerados pelas células renais em resposta ao insulto da cascata de fatores ativada com o início da inflamação [Thurman, 2006].

Diferentes populações de leucócitos participam do processo inflamatório em resposta à I/R. Os neutrófilos são as células mais estudadas neste modelo de lesão. Embora sejam identificados no tecido renal após o insulto isquêmico, há um pequeno infiltrado

inflamatório encontrado em biopsias humanas com IRA. É pouco provável que os neutrófilos afetem diretamente a função tubular, estando relacionados apenas à liberação de radicais livres de oxigênio e proteases [Ysebaert *et al*, 2000].

Outro grupo celular, cujo efeito é pouco conhecido, são os linfócitos B e T. Estudos recentes sugerem papel modulador destas células em modelos experimentais de I/R. Camundongos *knockout* para CD4 e CD8 [Rabb *et al*, 2000] e para células B [Burne *et al*, 2003], apresentaram proteção significativa contra lesão por I/R quando comparados aos controles selvagens. O bloqueio de mecanismos de vias de ativação de linfócitos T mostrou, em modelo de I/R, menor comprometimento de função renal e menor infiltrado mononuclear [Takada et al, 1997]. Em modelo de I/R hepática, utilizando ratos deficientes de linfócitos T, atímicos, foi observada proteção do órgão contra o insulto isquêmico [Zwacka et al, 1997]. Há evidências de que linfócitos são mediadores precoces da lesão isquêmica em rim, pulmão e intestino [Savransky et al, 2006].

A participação dos macrófagos no modelo I/R ainda não está bem definida. Sabe-se que estas células migram para a medula externa de rins de ratos após lesão por I/R [Liu *et al*, 1996]. Há aumento na expressão de MCP-1 durante a lesão [Burne *et al*, 2001]. Acredita-se que os macrófagos estejam envolvidos também no reparo do tecido, através de fibrose. Estudos com camundongos *knockout* para osteopontina [OPN], um fator de ativação de macrófagos, mostram redução na infiltração de macrófagos após a isquemia [Persy *et al*, 2003]. Estudo com o bloqueio de M-CSF [fator estimulante de colônias de macrófagos] mostra proteção do órgão à lesão da I/R [Jose *et al*, 2003].

Os monócitos representam 60% das células do infiltrado em modelos de I/R. Estas células migram para o tecido logo após a reperfusão, e são observadas no interstício e ao redor dos vasos sanguíneos. São recrutados por quimiocinas expressas pelas células endoteliais ativadas, como o MCP-1, e regulados, após a ativação, por células T [Gueler *et al*, 2004]. O infiltrado de monócitos é um pré-requisito para a fibrose e conseqüente deterioração do tecido. Entretanto, os mecanismos de sobrevivência, proliferação e diferenciação destas células na patogênese de nefropatia crônica ainda não são totalmente conhecidos [Gueler *et al*, 2004]. O número de monócitos e macrófagos infiltrados nas primeiras 24 horas após isquemia é 12 a 25 vezes maior do que de células polimorfonucleares [PMNs]. Os macrófagos, como as PMNs, são capazes de secretar uma série de EROs, NO, mieloperoxidase [MPO] e citocinas pró-inflamatórias quando ativados [Heinecke *et al*, 1993]. O aumento da atividade de MPO reflete a infiltração e ativação de PMNs e macrófagos [Ysebaert et al, 2000].

Os polimorfonucleares, recrutados para o tecido renal após a reperfusão, têm sido consideradas mediadores críticos de lesão parenquimatosa precoce na IRA isquêmica. A presença de monócitos/macrófagos e células T em modelos experimentais de I/R é consistente, e o infiltrado destas células predomina em camada medular externa, a região com maior grau de lesão [Ysebaert et al, 2000]. Diversos estudos mostram que o recrutamento pós-isquemia de PMNs ocorre predominantemente na medula externa [Vukicevic et al, 1998] e, em menor proporção, no córtex [Welbourn et al, 1991].

Os mastócitos são células derivadas da medula óssea, raramente encontradas em tecidos maduros [Roberts *et al*, 2000] e capazes de estocar e sintetizar uma série de fatores pró-inflamatórios, pró-fibróticos, vasoativos, citocinas e enzimas. Possuem múltiplas funções biológicas e participam da patogênese de muitas doenças [Schwartz et al, 1981].

Em adição à reação de hipersensibilidade I, atuam na resposta inflamatória aguda e crônica [Wershil et al, 1988], na modulação da resposta imune [Gershon et al, 1975], na angiogênese [Meninger & Zetterl, 1992], no *turnover* de tecido conectivo e na fibrose intersticial [Hiromura *et al*, 1998].

No tecido renal normal, a quantidade de mastócitos é mínima. Todavia, diversos estudos descrevem aumento significativo no número de mastócitos no interstício renal em doenças variadas [Blank et al, 2007], como glomerulonefrites [Toth *et al*, 1999], nefropatia por IgA, glomeruloesclerose focal e segmentar [Hiromura *et al*, 1998], nefropatia diabética [Ruger et al, 1996] e rejeição de enxerto [Yamada *et al*, 2001].

Os mastócitos são detectados classicamente por técnicas de histoquímica que utilizam as características metacromáticas dos seus grânulos. Corantes catiônicos, como safranina, azul de alcian e azul de toluidina ligam-se aos glicosaminoglicanos sulfatados dos grânulos citoplasmáticos. O uso de azul de toluidina permite a distinção de mastócitos entre outros tipos celulares devido à coloração citoplasmática ortocromática azul [Mayrhoferl, 1980]. No entanto, as técnicas histoquímicas para coloração de mastócitos apresentam limitações. O número destas células no tecido pode variar de acordo com os métodos de fixação empregados. Solução de Carnoy é a mais indicada para a detecção e visualização do fenômeno metacromático, enquanto que tecidos fixados em formol apresentam-se menos eficientes [Wingren & Enerback, 1983].

A descoberta de anticorpos anti-protease específicos, como triptase [Schwartz *et al*, 1981] e quimase [Schechter *et al*, 1983], permitiu a detecção de mastócitos em biópsias de forma mais eficiente.

A triptase de mastócitos é um mitógeno para células epiteliais, estimulando a expressão de IL-8 e ICAM-1 [Cairns & Walls, 1996]. Atua também sobre células endoteliais, induzindo a angiogênese [Blair *et al*, 1997]. Promove, ainda, a proliferação de fibroblastos renais e síntese de colágeno tipo I e fibronectina *in vitro* [Kondo *et al*, 2001].

A quimase é uma potente enzima envolvida na síntese de angiotensina II [Urara *et al*, 1990], no controle da permeabilidade epitelial [Greenberg & Burnstock, 1983] e na regulação de fator transformador de crescimento beta [TGF- $\beta$ ], potente fator pró-fibrótico [Lindstedt et al, 2001]. Estudos descrevem aumento na expressão de quimase em biopsias de transplante renal com fibrose intersticial franca [Yamada et al, 2001].

Os grânulos de heparina dos mastócitos têm efeito sobre a proliferação celular dos fibroblastos [Del Vecchio *et al*, 1988], na síntese de citocinas [Ceol *et al*, 2001], e de colágeno tipo I *in vitro* [Ferrao & Mason, 1993].

Em contraste com outras células derivadas de medula, os mastócitos deixam a medula óssea na forma imatura, sofrendo diferenciação no local de migração [Church & Levischaffer, 1997]. Grande número de fatores responsáveis por este processo já

foram identificados [Eddy, 2001]: quimiocinas [Nilsson *et al*, 1999], fator de célula-tronco [SCF] [Valent, 1995], TGF-β [Gruber *et al*, 1994], laminina [Thompson *et al*, 1989], fator de crescimento derivado de plaquetas [PDGF], fator de crescimento de fibroblastos [bFGF] e fator de crescimento de endotélio vascular [VEGF] [Meninger & Zetter, 1992].

O acúmulo de células inflamatórias no interstício renal desempenha papel importante no desenvolvimento de fibrose intersticial [Roberts et al, 1997]. Estas células secretam mediadores fibróticos que estimulam as células produtoras de matriz extracelular [Razzaque & Taguchi, 2002]. O estímulo para este infiltrado celular pode ser originário de sobre fibroblastos células epiteliais tubulares, que atuam os intersticiais [Johnson et al, 1998] a partir da síntese de citocinas, estimulando a infiltração de células T e macrófagos [Ong & Fine, 1994]. Em adição, estas células epiteliais tubulares são capazes de se transdiferenciar em miofibroblastos, atuando, elas próprias, na síntese de matriz extracelular [Tang et al, 1997]. A proliferação de fibroblastos é paralela ou precede o desenvolvimento de fibrose intersticial em humanos e em modelos experimentais [Remuzzi & Bertani, 1998]. A fibrose intersticial é um caminho conhecido para a lesão renal progressiva na maioria das doenças renais, havendo associação direta entre o grau de fibrose e o grau de disfunção renal [Eknovan et al, 1990].

Até recentemente, a contribuição de mastócitos no desenvolvimento de fibrose intersticial vinha sendo ignorada, diferentemente de macrófagos e linfócitos [Roberts *et al*, 2000]. Mastócitos estão relacionados e/ou envolvidos em diversos processos fibróticos em outros tecidos, como pulmão [Qu *et al*, 1995], coração [Turlington & Edwards, 1988], figado [Armbrust *et a*], 1997] e pele [Claman, 1989].

A presença de mastócitos no interstício renal está associada à síntese de colágeno por miofibroblastos [Toth *et al*, 1999]. Mastócitos contém diversos mediadores que, direta ou indiretamente, afetam a progressão de fibrose no tecido renal [Metcalfe *et al*, 1997]. Além de estimular a produção de matriz extracelular pelos fibroblastos [Gordon & Galli, 1994], os mastócitos também são capazes de produzi-la [Thompson *et al*, 1991]. Assim, há íntima relação entre a presença de mastócitos, fibrose intersticial e perda da função renal [Hiromura *et al*, 1998].

Estudos em biopsias de rins transplantados demonstram que a rejeição imunológica e isquemia são, provavelmente, os mecanismos de indução da infiltração de mastócitos no tecido renal [De Heer *et al*, 1997]. A relação entre a presença de mastócitos e rejeição de enxerto já foi descrita em transplantes de coração [Ly *et al*, 1992], pulmão [Yousem *et al*, 1997] e intestino [Walgenbach *et al*, 1996] e na rejeição celular aguda em transplante renal aonde a presença de mastócitos no tecido renal indica prognóstico desfavorável do enxerto [Lajoie *et al*, 1996]. Em estudo retrospectivo de análise de biopsias sequenciais de transplantados renais com necrose tubular aguda, observamos um aumento do infiltrado de mastócitos no interstício de enxertos que progrediram para disfunção primária do enxerto, sugerindo que este grupo de células poderia ser utilizado como um marcador precoce de mau prognóstico [Sato et al, 2004].

O tecido renal possui uma notável capacidade regenerativa após a lesão isquêmica, diferentemente de outros tecidos, como o cardíaco e nervoso [Duffield et al, 2005]. A capacidade regenerativa se manifesta pela proliferação e migração de células pouco diferenciadas para as regiões desnudadas de membrana basal dos túbulos lesionados. Estas células sintetizam precursores epiteliais, bordadura em escova pouco desenvolvidas e proteínas filamentosas [Witzgall et al, 1994]. Há varias possibilidade de origem destas células: células epiteliais que passam por de-diferenciação, proliferação e re-difrenciação, células derivadas de medula óssea e células mesenquimais residentes no parênquima renal [Duffield et al, 2005]. A proliferação celular máxima é observada na região medular externa, onde a lesão é mais aparente [Witzlgall et al, 1994].

A resposta à lesão isquêmica tem a participação de diferentes genes [Supavekin et al, 2003] e de algumas proteínas nefrogênicas, como a vimentina [VIM], que são re-expressas em células tubulares proximais em regeneração. Este processo recapitula, em parte, a programação genética do rim durante a fase de organogênese, incluindo apoptose celular [Al-awqati & Oliver, 2002].

A vimentina, um marcador de células mesenquimais e de células completamente de-diferenciadas, desempenha papel crucial durante o desenvolvimento do néfron e permanece detectável apenas em dutos coletores em adultos. Entretanto, estas proteínas são re-expressas no epitélio tubular em regeneração após a lesão isquêmica

[Villanueva *et al*, 2006]. Células tubulares expressando vimentina e outras proteínas fibrogênicas adquirem um estado de diferenciação semelhante ao das células durante período de organogênese, mimetizando este processo durante a fase de recuperação da NTA. Estas mesmas células são as maiores fontes de regeneração renal após lesão isquêmica [Lin *et al*, 2005].

A osteopontina [OPN] é uma proteína multifuncional expressa em diferentes tecidos como osso, endotélio, epitélio, músculo liso, e células como macrófagos e linfócitos [Malyankar *et al*, 1997]. Participa de diversos processos fisiológicos e patológicos, como biomineralização, inflamação, recrutamento de leucócitos e sobrevivência celular [Mazzali *et al*, 2002]. Desempenha papel importante nos processos agudos e crônicos de inflamação e está envolvida no recrutamento e retenção de macrófagos e células T nos locais de inflamação [Mazzali *et al*, 2002].

A expressão tubular de OPN precede a infiltração intersticial de macrófagos em diversos modelos de IRA [Pichler *et al*, 1994]. Mediadores clássicos de inflamação, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  induzem a expressão de OPN [Denhardt & Guo, 1993]. A osteopontina modula, *in vitro*, a expressão de citocinas inflamatórias por macrófagos [Ashkar *et al*, 2000], como TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12, e também de linfócitos T [Adler *et al*, 2001].

A expressão de OPN também está associada à fibrose. É provável que essa reação seja secundária à infiltração de macrófagos para o tecido e a produção associada de TGF- $\beta$  [Ophascharoensuk *et al*, 1999]. Além disso, OPN atua como fator quimiotático para fibroblastos, potencializa fatores de crescimento, media a proliferação de fibroblastos e modula a secreção de MPO pelos fibroblastos [Petrow *et al*, 2000].

A osteopontina é também um fator de sobrevivência celular, protegendo as células do processo de apoptose. O uso de camundongos *knockout* para OPN em modelo de obstrução ureteral mostrou que, além da redução do infiltrado celular de macrófagos e de fibrose tubulointersticial, há aumento na taxa de apoptose em comparação com o grupo selvagem, sugerindo que OPN produza fatores de sobrevivência às células epiteliais *in vivo* [Ophascharoensuk *et al*, 1999].

Em modelo de I/R, camundongos *knockout* para OPN apresentaram maior disfunção renal, aumento na expressão de óxido nítrico sintase [iNOs] tubular e maior grau de lesão histológica em comparação ao grupo selvagem [Noiri *et al*, 1999]. A inibição de iNOS mediada pela OPN protegeria as células renais residentes da citotoxicidade de macrófagos durante a inflamação [Ophascharoensuk *et al*, 1999].

A OPN também é importante no processo de reparo do tecido, e está relacionada com a regeneração celular. Em modelo de IRA induzida por gentamicina, houve correlação entre a expressão de OPN o número de células em proliferação [células PCNA+] [Xie *et al*, 2001]. Além disso, a OPN está envolvida na proliferação de células musculares lisas vasculares e de células mesangiais glomerulares no modelo de lesão renal induzida por hipóxia [Sodhi *et al*, 2001].

A ação de células inflamatórias, de mediadores de inflamação [OPN] e de diferenciação celular [VIM], além da liberação de citocinas, leva ao desenvolvimento de mecanismos de transdiferenciação epitélio mesenquimal e ativação de mecanismos pró fibróticos, com produção de matriz extracelular.

Os mastócitos modulam a atividade de outras células através de liberação de diferentes substâncias sintetizadas e estocadas em seus grânulos citoplasmáticos. Este processo libera mediadores como histamina, heparina, citocinas [IL-4, IL-8, TNF $\alpha$ ] e proteases [quimase e triptase], que estimulam fibroblastos e promovem a recupreração e/ou cicatrização do tecido [Cairns *et al*, 1997; Kinet 2007].

O processo de reparo requer uma ação celular coordenada. Os fibroblastos inicialmente migram para o local de lesão, tornando-se estacionários e então sintetizam componentes de matriz extracelular. Quanto estes fibroblastos tornam-se estacionários de forma prematura, não ocorre a migração para o local da lesão, comprometendo o processo de reparo tecidual. Au et al [2007] demonstrou que esta comunicação entre mastócitos e fibroblastos ocorre através de junções GAP.

A fibrose intersticial que acompanha a doença renal é um processo complexo e envolve desarranjos tanto na síntese quanto na degradação de colágeno e de outras proteínas de matriz. É caracterizada pela perda de túbulos e capilares peritubulares e acúmulo local de miofibroblastos, células intermediárias entre fibroblastos e células musculares lisas, que contém alfa actina em seu citoplasma [Alpers *et al*, 1994] e são capazes de sintetizar colágenos tipo I e VII [Roberts *et al*, 1997, Badid *et al*, 2000].

No rim normal, a presença de miofibroblastos no interstício é rara, havendo aumento considerável nas áreas de fibrose. Estudos experimentais e em nefropatias humanas correlacionam presença de miofibroblastos com a deterioração da função renal e mau prognóstico [Alpers *et al*, 1994]. Inicialmente, acreditava-se que os miofibroblastos eram derivados de fibroblastos circulantes provenientes de medula óssea [Bucala *et al*, 1994]. No entanto, estudos recentes mostraram que este tipo celular é derivado de células renais [Iwano *et al*, 2001], a partir da diferenciação de células tubulares [Hay & Zuk, 1995]. Estas células diferenciadas migram para o interstício, atuando em processos de fibrogênese e neovascularização [Rockey, 2000; Vesey *et a*l, 2002].

Estudos *in vitro* sugerem que estas alterações são induzidas por citocinas pró fibróticas, como TGF- $\beta$  [Li *et al*, 2002], fator de crescimento de fibroblastos [bFGF] [Strutz *et al*, 2002] e IL-1 [Vesey *et al*, 2002]. Em modelos de lesão renal isquêmica, as células tubulares proximais, pela sua alta atividade metabólica, são mais susceptíveis à hipóxia, com maior capacidade de transdiferenciação e aumento da expressão de fatores pró-fibróticos, como colágeno tipo I, TGF $\beta$  e IL-1 [Orphanides *et al*, 1997].

Assim, a fibrose intersticial que acompanham a doença renal é um processo complexo, envolvendo alterações tanto na síntese como na degradação de colágeno e de outras proteínas de matriz. Macrófagos e fibroblastos são as principais fontes de matriz extracelular. Durante a lesão isquêmica renal, células epiteliais tubulares podem sofrer diferenciação em fibroblastos, com envolvimento de citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão. Os mastócitos, células com funções pró-inflamatórias e pró fibróticas apresentam correlação com o grau de fibrose e de deterioração de função renal. Entretanto, sua participação no processo inicial de lesão renal, especialmente em resposta ao estímulo isquêmico, ainda não foi determinada.

# 2- HIPÓTESE
Considerando que os mastócitos participam da resposta inflamatória na lesão renal, através da liberação de mediadores inflamatórios e que, em rins transplantados com necrose tubular aguda, a presença de mastócitos apresentou correlação com a má evolução do enxerto (*primary non function*), levantamos a hipótese que, no modelo de insuficiência renal aguda por isquemia/reperfusão, a presença de mastócitos seria um fator de risco para desenvolvimento de fibrose intersticial.

## **3- OBJETIVOS**

## **3.1- Principal**

Determinar a participação de mastócitos na lesão renal aguda induzida por isquemia/reperfusão.

## 3.2- Secundários

- Determinar a relação temporal do infiltrado inflamatório de mastócitos, macrófagos e linfócitos no interstício renal no modelo de IRA por I/R.
- Correlacionar o infiltrado de mastócitos com o de outras células inflamatórias;
- Correlacionar o infiltrado de mastócitos com marcadores de inflamação [osteopontina], de transdiferenciação epitélio-mesenquimal [vimentina] e de fibrose intersticial [alfa actina].

# 4- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- Modelo experimental

A insuficiência renal aguda isquêmica foi obtida através do clampeamento bilateral dos pedículos renais, durante 45 minutos, em modelo clássico de lesão [Kelly et al, 1996].

O protocolo de estudo foi apresentado ao CEMIB [Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica - UNICAMP], e os experimentos conduzidos de acordo com as boas práticas de manuseio de animais experimentais da Instituição.

Foram utilizados ratos machos, Wistar, pesando de 200 a 250 g, obtidos junto ao CEMIB/UNICAMP. Durante o período experimental, os animais ficaram alojados nas dependências do Laboratório de Nefrologia II, no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental [NMCE/FCM/UNICAMP]. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com no máximo cinco animais/gaiola, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22°C. Água e ração, *ad libitum*, estiveram disponíveis durante todo o período do estudo.

## 4.2- Técnica cirúrgica

Os animais foram submetidos à anestesia, por via intraperitoneal, com solução de Pentobarbital sódico 3% [Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos, São Paulo, Brasil], na dose de 100µL/100g. Depois de anestesiados, os animais foram restritos à mesa cirúrgica em decúbito dorsal, e realizada a antissepsia da pele com álcool iodado a 2%. A laparotomia, por incisão xifopubiana mediana, permitiu a exposição da cavidade e das vísceras abdominais. As vísceras foram deslocadas para o tórax e mantidas umedecidas com gaze embebida em solução fisiológica a 0,9% [SF] [Áster Produtos Médicos, São Paulo, Brasil].

Os pedículos renais, expostos no retroperitônio, foram dissecados e isolados. A isquemia renal foi então promovida pelo clampeamento destes pedículos com clipes microvasculares atraumáticos [Rocca, São Paulo, Brasil] por 45 minutos. Durante esse

período, as vísceras foram deslocadas de volta à cavidade abdominal. Para evitar o ressecamento visceral foi administrado 0,5mL de SF0,9%, intraperitonial, antes do fechamento da cavidade, realizado com o auxílio de fita adesiva [3M, São Paulo, Brasil].

Decorridos os 45 minutos, a cavidade abdominal foi reaberta e os clipes vasculares retirados. Observou-se a completa reperfusão dos rins e a ausência de trauma nos pedículos. O fechamento da cavidade foi feito com pontos cirúrgicos contínuos em dois planos: aponeurose [fio catgut 4.0, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil] e pele [fio de algodão, 3.0, Cirumédica AS, São Paulo, Brasil]. [Figura 1]. Durante todo o período, pré-cirúrgico até o final da recuperação pós-anestesia, os animais foram mantidos aquecidos através de iluminação indireta.

Os animais do grupo Sham foram submetidos aos mesmos procedimentos de anestesia, laparotomia e manipulação de vísceras abdominais, observação por 45 minutos e recuperação pós-anestésica. Entretanto, nos animais deste grupo, após a identificação e isolamento dos pedículos renais, houve manipulação sem clampeamento dos mesmos, e os animais foram mantidos sob anestesia durante 45 minutos.



**Figura 1** – Procedimento cirúrgico. Clampeamento da artéria renal [A] e rim isquêmico [B].

#### 4.3- Sacrifício e coleta de material para análise

Na ocasião do sacrifício, os animais foram anestesiados com solução de Pentobarbital sódico 3% [Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos, São Paulo, Brasil], na dosagem de  $10\mu$ L/100g, por via intraperitonial, e fixados à mesa cirúrgica em decúbito dorsal. Após a antissepsia da pele com álcool iodado a 2%, promoveu-se a laparotomia por incisão xifopubiana mediana, permitindo a exposição da cavidade abdominal. Foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca, seguida de retirada bilateral dos rins.

## 4.4- Desenho do estudo

Os animais foram divididos em sete grupos, com cinco animais cada:

- <u>Tempo zero [D0]</u>: sacrifício imediatamente após o término da reperfusão;
- <u>Dia 1 [D1]</u>: sacrifício após 24 horas do término da reperfusão;
- Dia 3 [D3]: sacrifício após 3 dias do término da reperfusão;
- <u>Dia 5 [D5]</u>: sacrifício após 5 dias do término da reperfusão;
- <u>Dia 7 [D7]</u>: sacrifício após 7 dias do término da reperfusão;
- <u>Dia 14 [D14]</u>: sacrifício após 14 dias do término da reperfusão;
- <u>Sham</u>: simulação de cirurgia, com sacrifício nos mesmos tempos dos demais animais.

## 4.5- Parâmetros estudados

#### 4.5.1- Peso

O peso dos animais, em gramas, foi verificado no dia do procedimento cirúrgico e na data do sacrifício, a fim de avaliar a diferença no peso dos animais entre os dois períodos de tempo.

#### 4.5.2- Função renal

A função renal foi avaliada a partir da dosagem da creatinina sérica. Para cada animal foram realizadas coleta e quantificação nos períodos basal (anterior ao procedimento cirúrgico) e sacrifício (pós I/R).

Para a dosagem basal, foram coletados 500µL de sangue de cada animal por punção da veia da cauda, sob anestesia inalatória com éter. O sangue foi centrifugado por 15 minutos à 8000rpm para a separação do soro. O soro foi mantido em freezer à -20°C para posterior análise. No sacrifício, o volume de sangue coletado foi, em média, 3mL por animal, e procedimento semelhante ao da coleta basal foi realizado para a separação do soro e armazenamento das amostras.

A dosagem de creatinina sérica foi realizada através de método colorimétrico, utilizando kit comercial [CELM, São Paulo, Brasil] e as amostras foram quantificadas em leitor de placa [ELx800 Universal Microplate Reader/ Bio-TeK Instruments, Inc], com comprimento de onda de 490nm. Os valores foram expressos em mg/dL.

## 4.5.3- Análise morfológica

## 4.5.3.1- Processamento do tecido renal

Os rins foram coletados na ocasião do sacrifício em condições assépticas, porém não estéreis. Após a retirada da cápsula, os rins foram cortados longitudinalmente em dois fragmentos aproximadamente simétricos. Um dos rins foi fixado em MethylCarnoy e outro em solução de formalina a 10%, e acondicionados a 4°C em geladeira por 24 horas. Passado esse período, os fragmentos de tecido foram transferidos, respectivamente, para solução de metanol 70% ou etanol 70%, encaminhados para inclusão e processamento em parafina, para posterior montagem de lâminas com fragmentos de 4 µm de espessura [Micrótomo Leica modelo RM2155].

4.5.3.2- Avaliação de necrose tubular

O estudo histomorfométrico avaliou a presença e intensidade da necrose tubular [NT] nos cortes histológicos corados por PAS [ácido periódico/reagente de Schiff]. Foi utilizado o programa de análise computadorizada KS300 [Zeiss] e um microscópio de luz comum.

Foram selecionadas áreas com características de necrose tubular, na medula externa, região mais afetada pela lesão isquêmica. Foram avaliados 25 campos por lâmina, utilizando um aumento final de 400 vezes.

Em cada campo foram quantificados os túbulos sem alterações morfológicas, túbulos em regeneração, túbulos em degeneração e túbulos completamente degenerados ["carecas"]. As biopsias foram analisadas de forma cega e os valores obtidos foram expressos em percentual de túbulos afetados.

Foram consideradas alterações compatíveis com necrose tubular: perda/redução da borda em escova, perda da integridade citoplasmática, perda de células tubulares individuais e/ou presença de cilindros hialinos preenchendo a luz tubular [Solez *et al*, 1979]. Túbulos com descamação completa e exposição de membrana basal tubular, foram quantificados em separado [túbulos "carecas"].

Os túbulos em regeneração foram identificados a partir da observação de características como núcleos com cromatina não condensada, de tamanhos e formas variáveis, presença de vários nucléolos e citoplasma pouco basofílico [Solez *et al*, 1979] [Figura 2].



**Figura 2** – Necrose tubular aguda [PAS,1000x]. Túbulos íntegros [A], túbulos em degeneração com perda de bordadura em escova e destacamento de células tubulares [setas] [B], túbulos completamente degenerados ["carecas"] com exposição da membrana basal tubular [C] e células tubulares em regeneração, com núcleos aumentados e citoplasma tumefeito [setas] [D].

#### 4.5.4- Histoquímica para mastócitos

Para a detecção de mastócitos no tecido renal foi realizada a coloração com azul de toluidina [Sigma; T3260] 0,25%, pH 2,5, incubado por 1 minuto, em temperatura ambiente [Kiernan, 1981]. A presença de mastócitos no tecido renal fica bem evidente nesta coloração devido ao fenômeno de metacromasia. Os grânulos citoplasmáticos de heparina conferem aos mastócitos uma coloração citoplasmática ortocromática azul em mastócitos no interstício, e violeta em mastócitos de cápsula renal [Figura 3].

A quantificação foi realizada através de contagem em microscopia óptica, com o auxílio do programa KS300 [Zeiss]. O aumento utilizado foi de 1000 vezes, com grid 10x10 e o resultado corrigido para número de células/mm<sup>2</sup>. As regiões cortical e medular foram analisadas separadamente.





**Figura 3** – Histoquímica para mastócitos [Azul de toluidina, 1000x]. Coloração citoplasmática ortocromática azul em mastócitos no interstício renal [A] e violeta em mastócitos de cápsula [B].

## 4.5.5- Imunohistoquímica

O tecido para imunohistoquímica, analisado em microscopia de luz, foi fixado em solução de MethylCarnoy e embebido em parafina. Foram obtidos cortes de 4 $\mu$ m [Micrótomo Leica modelo RM2155] dos fragmentos de biopsia de cada um dos animais do estudo. O material foi desparafinizado em xilol, rehidratado numa série decrescente de álcoois (100%, 95% e 70%) e a peroxidase endógena foi inativada com solução de peróxido de hidrogênio 3%.

Foram utilizados controles positivos e negativos. Os controles negativos não recebiam o anticorpo primário, e os controles positivos eram amostras conhecidas de tecido renal de estudos anteriores, com positividade comprovada contra os anticorpos testados.

Em todos os procedimentos, o anticorpo primário foi incubado em câmara úmida, *overnight*, a 4°C. O anticorpo secundário utilizado foi peroxidase de cabra anti IgG de camundongo [Novo Castra; NCL-GAMP] em diluições variadas de acordo com o anticorpo primário, e incubado durante 30 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzina (DAB) [DAKO; K3466] incubado à temperatura ambiente, por 10 minutos. Contra coloração foi realizada com hematoxilina de Harris ou solução de ácido periódico/Schiff de acordo com a necessidade de identificação das membranas basais.

## 4.5.5.1- Proliferação celular [PCNA]

Foi utilizado o anticorpo camundongo anti-proliferação de núcleos celulares [PCNA-Sigma; P8825] na diluição 1:1000, em solução tampão fosfato (pH 7.6) com soroalbumina bovina 1% (1% BS/BSA). A diluição do anticorpo secundário foi de 1:100 em 1%PBS/BSA. Para a contra coloração foi utilizada a técnica de PAS [ácido periódico/reagente de Schiff], sem hematoxilina, para identificação de membranas basais, possibilitando a identificação da proliferação de células tubulares e intersticiais.

A quantificação de células proliferativas foi realizada através de contagem de núcleos corados, em microscopia óptica, com o auxílio do programa KS300 [Zeiss]. O aumento utilizado foi de 400 vezes, com grid 10x10 e o resultado corrigido para número de células/mm<sup>2</sup>. Foi realizada análise em separado para as regiões cortical e medular, com diferenciação de proliferação de células tubulares e intersticiais. Em região cortical, a proliferação de células tubulares foi quantificada em separado para túbulos proximais e distais.

## 4.5.5.2- Infiltrado inflamatório

## 4.5.5.2.1- Macrófagos

Macrófagos foram corados com o anticorpo de camundongo anti-CD68 de rato [Serotec; MCA341R] na diluição 1:100. O anticorpo secundário foi utilizado em 1:200 e a contra coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris [Queel; CO23471] durante 5 segundos.

A quantificação foi realizada através de contagem de células coradas em microscopia óptica, com o auxílio do programa KS300 [Zeiss]. O aumento utilizado foi de 400 vezes, com grid 10x10 e o resultado corrigido para número de células/mm<sup>2</sup>, havendo separação entre regiões cortical e medular.

## 4.5.5.2.2- Linfócitos T

Linfócitos T foram identificados através do anticorpo de camundongo antilinfócito T de rato [Accurate; MAS010P] na diluição 1:50. O anticorpo secundário foi empregado em diluição de 1:200 e a contra coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris [Queel; CO23471] por 5 segundos.

A quantificação foi realizada através de contagem de células positivas sob microscopia óptica, com o auxílio do programa KS300 [Zeiss]. O aumento utilizado foi de 400 vezes, com grid 10x10 e o resultado corrigido para número de células/mm<sup>2</sup>. Houve separação entre região cortical e medular.

## 4.5.5.3- Marcadores pró-inflamatórios

## 4.5.5.3.1- Osteopontina

Oteopontina foi detectada com o uso do anticorpo de camundongo anti-osteopontina de rato OPN [Santa Cruz; SC-21742] na diluição 1:200, sendo esta a mesma diluição do anticorpo secundário. A contra coloração foi feita com Hematoxilina de Harris [Queel; CO23471] por 5 segundos.

A expressão de osteopontina foi quantificada através de subtração de imagem sobre *background*, com o auxílio do programa computadorizado KS300 [Zeiss]. O aumento final foi 200 vezes e o resultado foi expresso em percentual de área. A análise das regiões cortical e medular foi feita em separado.

4.5.5.4- Marcadores de diferenciação epitélio mesenquimal

4.5.5.4.1- Vimentina

A expressão de vimentina foi detectada por imunohistoquímica com anticorpo de camundongo anti-vimentina humana V9 [NovoCastra; NCL-VIM-V9] na diluição 1:200, mesma diluição do anticorpo secundário. A contra coloração foi feita com Hematoxilina de Harris [Queel; CO23471] durante 5 segundos.

A presença de vimentina foi quantificada através de subtração de imagem sobre *background*, com o auxílio do programa computadorizado KS300 [Zeiss]. O aumento final foi 200 vezes e o resultado foi expresso em percentual de área. Houve separação entre as regiões cortical e medular.

4.5.5.5- Marcadores pró-fibróticos

4.5.5.5.1- Alfa-actina (miofibroblastos)

Miofibroblastos foram detectados utilizando-se o anticorpo de camundongo anti-alfa-actina de rato [Calbiochem; CP47] na diluição 1:300, mesma diluição do anticorpo secundário. A contra coloração foi feita com Hematoxilina de Harris [Queel; CO23471] por 5 segundos.

A expressão de alfa-actina foi quantificada por subtração de imagem sobre *background*, com o auxílio do programa computadorizado KS300 [Zeiss]. O aumento final foi 200 vezes e o resultado foi expresso em percentual de área. Houve separação entre as regiões cortical e medular.

## 4.6- Análise estatística

Para análise, os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. A comparação entre os grupos foi realizada através de teste de ANOVA com correção por Bonferroni. Correlação entre os parâmetros avaliados foi realizada através do teste de Spearman. Foi considerada como diferença estatística se p <0.05.

## **5- RESULTADOS**

#### 5.1- Peso

Os animais dos grupos D1, D3 e D5 apresentaram variação negativa no peso entre a data da cirurgia e o sacrifício. A maior redução de peso foi observada em D1, seguida de D3 e D5, ambas menos marcadas, porém ainda significativas. A partir de D7, os animais passaram a apresentar balanço ponderal positivo, mais evidente em D14, semelhante ao ganho ponderal observado nos animais controle [Sham, 14 dias] [Tabela 1, gráfico 1].

Tabela 1- Variação do peso [gramas] dos animais nos diferentes pontos do estudo.

Grupo	Peso (gramas)	Variação	—
Basal	$216,00 \pm 4,93$	$0,\!00\pm0,\!00$	
D1	$187,\!67 \pm 1,\!45$	$-19,33 \pm 1,76$ <sup>a,b,c,d,e,f</sup>	
D3	$233,00 \pm 7,24$	$-5,33 \pm 5,78$ <sup>a,c</sup>	
D5	$211,50 \pm 18,50$	$-3,50 \pm 8,50^{a,c}$	
D7	$235,00 \pm 20,00$	$19,00 \pm 4,00$ <sup>b,c,d,e</sup>	
D14	$263,50 \pm 1,50$ <sup>b,c</sup>	$52,50 \pm 9,50$ <sup>a,b,c,d,e,f</sup>	
Sham	$242,00 \pm 14,88$	$10,00 \pm 4,74$	

\* p<0,05 versus respectivo controle; a p<0,05 versus Sham; b p <0,05 versus D0; c p <0,05 versus D1;</li>
d p <0,05 versus D3; e p <0,05 versus D5; f p <0,05 versus D7.</li>



\* p<0,05 versus respectivo controle; **a** p<0,05 versus Sham; **b** p <0,05 versus D0; **c** p <0,05 versus D1; **d** p <0,05 versus D3; **e** p <0,05 versus D5; **f** p <0,05 versus D7.

Gráfico 1- Variação de peso [gramas] entre a data da cirurgia e a data do sacrifício.

## 5.2- Função renal

Os níveis séricos de creatinina apresentaram elevação estatisticamente significativa em relação aos valores basais em todos os grupos submetidos ao procedimento de I/R. O grupo Sham não apresentou alteração da função renal. [Tabela 2, gráfico 2].

Tabela 2-	Valores	de ci	reatinina	sérica	[mg/dL]	nos	diferentes	períodos d	o estudo.

Período/grupo	Creatinina sérica (mg/dl)	
basal	$0,37\pm0,01$	
D1	$1,19 \pm 0,16$ * <sup>a</sup>	
D3	$1,02 \pm 0,17$ * <sup>a</sup>	
D5	$0,75 \pm 0,04$ $^{*a}$	
D7	$0,93 \pm 0,10$ * <sup>a</sup>	
D14	$0,88 \pm 0,12^{*^a}$	
* Sham	$0,32\pm0,20$	

\* p<0,05 versus basal; **a** p<0,05 versus Sham; **b** p <0,05 versus D0; **c** p <0,05 versus D1; **d** p <0,05 versus D3; **e** p <0,05 versus D5; **f** p <0,05 versus D7.



\* p<0,05 versus basal; **a** p<0,05 versus Sham

Gráfico 2- Creatinina sérica [mg/dL] nos períodos de estudo.

#### **5.3-** Necrose tubular aguda

Em comparação ao grupo Sham e à exceção do grupo D0, todos os grupos apresentaram valores estatisticamente significativos no percentual de túbulos íntegros, sendo o menor percentual observado em D5. O percentual de túbulos preservados, ao redor de 25%, permaneceu constante durante a primeira semana após insulto isquêmico [grupos D1 a D7], havendo recuperação nos animais acompanhados por 14 dias.

O percentual de túbulos em degeneração sofreu aumento gradativo com o passar dos dias, atingindo pico em D5. Durante a primeira semana após insulto isquêmico [grupos D1 a D7] os valores observados foram estatisticamente relevantes em relação ao grupo Sham, com redução em D14.

O maior percentual de túbulos completamente degenerados/"carecas" foi observado 24 horas após insulto isquêmico [D1], com redução gradativa destes valores nos grupos subseqüentes, porém ainda significativamente superiores aos do grupo controle [Sham].

A maior incidência de regeneração tubular foi observada em D7. À exceção do grupo D0, todos os outros apresentaram percentual de regeneração estatisticamente relevante em relação ao grupo Sham [Tabela 3, gráfico 3, figura 4].

Grupo	% Íntegros	% Degeneração	% "Carecas"	% Regeneração
D0	$89,3\pm0,8$	$7,9\pm0,4$	$0,6\pm0,2$	$2,2 \pm 0,5$
D1	$25,8\pm2,4^{\rm a,b}$	$41,8 \pm 1,1^{a,b}$	$18,5 \pm 4,3^{a,b}$	$13,9 \pm 3,0^{a,b}$
D3	$26,3 \pm 6,3^{a,b}$	$41,7 \pm 5,7^{a,b}$	$14,4 \pm 3,2^{a,b}$	$17,6 \pm 1,6^{a,b}$
D5	$21{,}5\pm0{,}9^{\rm \ a,b}$	$53,8 \pm 2,8^{a,b,c}$	$8,3 \pm 2,1^{a,c}$	$16,3 \pm 1,4^{a,b}$
D7	$28,8 \pm 2,2^{a,b}$	$44,4 \pm 2,4^{a,b,d}$	$8,9 \pm 1,3^{a,b,c,d}$	$17,8 \pm 1,1^{a,b}$
D14	$55,8 \pm 5,4^{a,b,c,d,e,f}$	$29,0 \pm 3,0^{a,b,c,d,e,f}$	$3,9\pm0,4$ $^{\rm c}$	$11,4 \pm 2,2^{a,b,c,e}$
Sham	$97,1\pm0,2$	$1,5 \pm 0,2$	$0,1\pm0,6$	$1,3\pm0,1$

**Tabela 3-** Percentual de túbulos íntegros, túbulos em degeneração, túbulos completamentedegenerados/"carecas" e túbulos em regeneração pós-I/R.

**a** p<0,05 versus Sham; **b** p <0,05 versus D0; **c** p <0,05 versus D1; **d** p <0,05 versus D3; **e** p <0,05 versus D5; **f** p <0,05 versus D7.



**a** p<0,05 versus Sham; **b** p <0,05 versus D0; **c** p <0,05 versus D1; **d** p <0,05 versus D3; **e** p <0,05 versus D5; **f** p <0,05 versus D7.

**Gráfico 3-** Percentual de túbulos íntegros [A], túbulos em degeneração [B], túbulos "carecas" [C] e túbulos em regeneração [D] pós-I/R.



**Figura 4** – Necrose tubular aguda foi mais intensa nas primeiras horas pós-reperfusão [D1 e D3] com redução gradativa nos grupos subsequentes [D5 à D14]. Coloração de PAS [100x].

#### 5.4- Proliferação celular

A proliferação de células tubulares corticais (proximais e distais) e medulares apresentou os maiores valores em D3. Na região cortical, tanto nos segmentos distais quanto proximais, foi observado um aumento na expressão de PCNA a partir das primeiras horas após insulto isquêmico, mais acentuado nos segmentos proximais do que nos distais. Quantitativamente, os segmentos tubulares distais apresentaram a maior proliferação em resposta ao insulto isquêmico, seguido dos túbulos medulares e proximais.

A proliferação de células intersticiais foi mais precoce em camada medular (D3) que em camada cortical (D7). [Tabela 4, gráfico 4, figuras 5 e 6].

**Tabela 4-** Proliferação celular [células PCNA+] nos segmentos tubulares proximais, distaise medulares, interstício cortical e medular pós-I/R.

Grupos		Córtex		Medula	
	ТР	TD	Interstício	Túbulos	Interstício
D0	4,3 ± 0,6	$25,4\pm5,9$	$163,0\pm8,1$	$5,8\pm1,7$	$50,0\pm19,5$
D1	7,1 $\pm$ 2,1 $^{\rm a}$	$23,4 \pm 5,6$	$176,5 \pm 43,6$	$6,4 \pm 1,5$	$83,4 \pm 24,7$
D3	8,4 $\pm$ 2,4 $^{\rm a}$	55,0 $\pm$ 15,1 <sup>a,b,c</sup>	$147,2 \pm 14,0$	$14,1 \pm 3,5^{a,c}$	$219,4 \pm 45,1^{a,b,c,e}$
D5	$5,9\pm1,8$	42,0 $\pm$ 11,8 $^{\rm a}$	210,4 $\pm$ 32,3 $^{\rm a}$	$9,0 \pm 3,7$	$113,6 \pm 24,1$
D7	$3,9\pm0,4$ <sup>d</sup>	23,2 $\pm$ 5,3 <sup>d</sup>	229,4 $\pm$ 14,7 <sup>a,d</sup>	5,6 $\pm$ 1,7 <sup>d</sup>	$148,0\pm42,0$
D14	$2,7\pm0,8$ <sup>c,d</sup>	13,2±3,3 <sup>d</sup>	$198,0\pm40,9^{\mathrm{a}}$	$10{,}7\pm4{,}4$	$125,2 \pm 33,4$
Sham	$2,4\pm0,2$	$13,7\pm1,7$	113,6 ± 5,1	$5,2 \pm 1,2$	$56,8\pm16,7$

**a** p<0,05 versus Sham; **b** p <0,05 versus D0; **c** p <0,05 versus D1; **d** p <0,05 versus D3; **e** p <0,05 versus D5.



**a** p<0,05 versus Sham; **b** p <0,05 versus D0; **c** p <0,05 versus D1; **d** p <0,05 versus D3; **e** p <0,05 versus D5.

**Gráfico 4-** Proliferação celular em túbulos proximais [A], túbulos distais [B], interstício cortical [C], túbulos medulares [D] e interstício medular [E] pós-I/R.



**Figura 5** – Proliferação celular em córtex. No interstício cortical, a proliferação teve pico em D7. Células PCNA positivas coradas em marrom, contra-coloração com PAS [200x].

**a** p<0,05 *versus* Sham; **d** p<0,05 *versus* D3.



**Figura 6** – Proliferação celular em medula foi mais precoce do que em córtex [D3]. Células PCNA positivas coradas em marrom, contra-coloração com PAS [200x].

**a** p<0,05 *versus* Sham; **b** p<0,05 *versus* D0; **c** p<0,05 *versus* D1; **e** p<0,05 *versus* D5.

#### 5.5- Infiltrado inflamatório

### 5.5.1- Mastócitos

Em camada cortical, o aumento do número de mastócitos foi significativo apenas em D7. Nos demais períodos, a presença de mastócitos em camada cortical foi comparável aos animais controles (Sham, p=ns)

Na região medular, o infiltrado de mastócitos ocorreu precocemente (D1), manteve-se estável durante a primeira semana pós reperfusão (D1-D7), apresentando pico tardio, em D14. [Tabela 5, figura 7].

Tabela	5-	Infiltração	de	mastócitos	[células/mm2]	em	córtex	e	medula	nos	grupos
		estudados.									

Grupos	Córtex	Medula
D0	$1,\!96\pm0,\!09$	$2,22 \pm 0,30$
D1	$2,\!10\pm0,\!20$	$4,34 \pm 0,24$ <sup>a,b</sup>
D3	$1,95 \pm 0,24$	$5,15\pm 0,35~^{\rm a,b}$
D5	$1,90 \pm 0,33$	$5,30 \pm 0,45$ <sup>a,b</sup>
D7	$2,48 \pm 0,08^{\mathrm{~a,b}}$	$4,64 \pm 0,20$ <sup>a,b</sup>
D14	$2,24 \pm 0,06$	$6,17\pm0,47~^{ m a,b,c,d}$
Sham	$2,04 \pm 0,14$	$2,\!82\pm0,\!84$

**a** p<0,05 versus Sham; **b** p <0,05 versus D0; **c** p <0,05 versus D1; **d** p <0,05 versus D3; **e** p <0,05 versus D5; **f** p <0,05 versus D7.



**Figura 7** – Infiltração de mastócitos. Em córtex [A], o aumento de mastócitos foi significativo apenas em D7. Na região medula [B], o infiltrado ocorreu precocemente [D1], mantendo-se estável durante a primeira semana pós-I/R [D1-D7] e apresentando pico tardio em D14. Mastócitos corados em azul [setas] a partir da coloração com azul de toluidina [1000x].

**a** p<0,05 *versus* Sham; **b** p<0,05 *versus* D0; **c** p<0,05 *versus* D1; **d** p,0,05 *versus* D3.

#### 5.5.2- Macrófagos

Na região cortical, o pico de proliferação de macrófagos em resposta ao estímulo isquêmico foi observado em D7, com redução do infiltrado em D14, a níveis comparáveis aos dos animais controle (Sham, p=ns)

Em medula, infiltrado de macrófagos apresentou elevação a partir de D3, apresentando pico entre D5-D7 e redução do infiltrado em D14, atingindo infiltração semelhante à observada nos animais controle. [Tabela 6, figuras 8 e 9].

 Tabela 6- Infiltração de macrófagos [células/mm²] em córtex e medula nos grupos estudados.

Grupos	Córtex	Medula
D0	$13,9 \pm 1,9$	$11,9 \pm 1,8$
D1	$21,6 \pm 2,4$	$35,8 \pm 16,2$
D3	$24,8 \pm 3,4$	$85,5 \pm 39,6$ <sup>b</sup>
D5	$26,1 \pm 3,5$	$106,5 \pm 54,2$ <sup>a,b</sup>
D7	$49.2 \pm 7.6^{a,b,c,d,e}$	$108,6 \pm 42,2$ <sup>a,b</sup>
D14	32,4 $\pm$ 10,4 $^{\rm b}$	$39,1 \pm 11,4$
Sham	$19,6 \pm 5,6$	$22,7 \pm 12,8$

**a** p<0,05 versus Sham; **b** p <0,05 versus D0; **c** p <0,05 versus D1; **d** p <0,05 versus D3; **e** p <0,05 versus D5; **f** p <0,05 versus D7.



**Figura 8** – Infiltração de macrófagos em córtex. Pico de infiltração observado em D7, com redução em D14. Macrófagos corados em marrom, contra-coloração com hematoxilina de Harris [200x].

**a** p<0,05 versus Sham; **b** p<0,05 versus D0; **c** p<0,05 versus D1; **d** p<0,05 versus D3; **e** p<0,05 versus D5.



**Figura 9** – Infiltração de macrófagos em medula. Elevação a partir de D3, com pico entre D5 e D7 e redução em D14. Macrófagos corados em marrom, contra-coloração com hematoxilina de Harris [200x].

**a** p<0,05 *versus* Sham; **b** p<0,05 *versus* D0.

#### 5.5.3- Linfócitos T

Houve aumento estatisticamente significativo do infiltrado de linfócitos T em região cortical, a partir de 24 horas após a lesão de isquemia/reperfusão, permanecendo estável [cerca de 25 células/mm2] durante todo o período de estudo.

Em camada medular, houve aumento significativo do infiltrado de linfócitos T a partir de D3, com tendência a uma redução da infiltração de células T a partir de D7, apesar de não estatisticamente significante [Tabela 7, figuras 10 e 11].

 Tabela 7- Infiltração de linfócitos T [células/mm²] em córtex e medula nos diferentes grupos.

	Córtex	Medula
D0	$15,7 \pm 1,1$	$21.8\pm0.9$
D1	$24.9 \pm 2.1^{a,b}$	$33,5 \pm 2,7$
D3	$25.7 \pm 1.9^{a,b}$	$50,8 \pm 12,6^{a,b}$
D5	$26.0 \pm 2.4^{a,b}$	55,4 ± 12,7 <sup>a,b</sup>
D7	$27,5 \pm 0,9^{a,b}$	$38,9 \pm 4,7$
D14	$22,9 \pm 1,5$ <sup>a,b</sup>	$43,7 \pm 14,8$
Sham	$15,4 \pm 2,7$	$28,9\pm9,5$

**a** p<0,05 versus Sham; **b** p <0,05 versus D0; **c** p <0,05 versus D1; **d** p <0,05 versus D3; **e** p <0,05 versus D5; **f** p <0,05 versus D7.



**Figura 10** – Infiltração de linfócitos T em córtex. Aumento do infiltrado deste tipo celular a partir de D1, mantendo-se estável nos grupos subsequentes. Linfócitos T corados em marrom, contra-coloração com hematoxilina de Harris [200x].

**a** p<0,05 *versus* Sham; **b** p<0,05 *versus* D0.



**Figura 11** – Infiltração de linfócitos T em medula. Aumento do infiltrado a partir de D3, com tendência de redução a partir de D7. Linfócitos T corados em marrom, contra-coloração com hematoxilina de Harris [200x].

**a** p<0,05 *versus* Sham; **b** p<0,05 *versus* D0.

#### 5.6- Marcadores pró-inflamatórios

## 5.6.1- Osteopontina

A expressão de osteopontina pelas células tubulares corticais, em resposta à lesão isquêmica, apresentou elevação nas primeiras 24 horas pós I/R, atingindo pico em D3 e redução progressiva até D14, quando a expressão foi comparável à observada nos animais controle [Sham, p=ns].

Na camada medular, a expressão de osteopontina também foi precoce [D1], e manteve-se estável até D7. No último período de estudo [D14], apesar de não estatisticamente significativa, a expressão de osteopontina por células tubulares medulares ainda era 3 vezes superior à observada nas biopsias dos animais controle. [Tabela 8, figuras 12 e 13].

Grupos	Córtex	Medula
D0	$0,\!47 \pm 0,\!5$	$0.9 \pm 0.04$
D1	$1,1\pm 0,3^{~a,b}$	$4,3 \pm 0,7^{a,b}$
D3	$1.8 \pm 0.1^{\rm ~a,b,c}$	$4,2 \pm 0,8^{a,b}$
D5	$1,5\pm0,1$ <sup>a,b</sup>	$4,3 \pm 0,7^{a,b}$
D7	$1,1 \pm 0,3^{a,b,d}$	$3,6 \pm 0,4^{a,b}$
D14	$0,6\pm0,03$ <sup>d,e,f</sup>	$1,8 \pm 0,2^{\rm c,d,e,f}$
Sham	$0,3 \pm 0,04$	$0,6\pm0,07$

Tabela 8- Expressão de osteopontina [%área] em córtex e medula nos grupos estudados.

**a** p<0,05 versus Sham; **b** p <0,05 versus D0; **c** p <0,05 versus D1; **d** p <0,05 versus D3; **e** p <0,05 versus D5; **f** p <0,05 versus D7.



**Figura 12** – Expressão de osteopontina em córtex. Elevação progressiva a partir de D1, com pico em D3 e redução progressiva até D14. Osteopontina em marrom, contra-coloração com hematoxilina de Harris.

**a** p<0,05 versus Sham; **b** p<0,05 versus D0; **c** p<0,05 versus D1; **d** p<0,05 versus D3; **e** p<0,05 versus D5; **f** p<0,05 versus D7.



**Figura 13** – Expressão de osteopontina em medula. Expressão precoce [D1] e constante até D7. Osteopontina em marrom, contra-coloração com hematoxilina de Harris.

**a** p<0,05 versus Sham; **b** p<0,05 versus D0; **c** p<0,05 versus D1; **d** p<0,05 versus D3; **e** p<0,05 versus D5; **f** p<0,05 versus D7.

## 5.7- Marcadores de diferenciação epitélio mesenquimal

## 5.7.1- Vimentina

Em camada cortical, a maior expressão de vimentina foi observada em D3 e D7, em resposta à lesão renal por I/R.

Na camada medular, um aumento de vimentina foi observado a partir de D3, com pico entre D5-D7 e redução em D14, porém ainda significativamente superior aos animais dos grupos controle. [Tabela 9, figuras 14 e 15].

Tabela 9- Expressão	de vimentina [%área]	em córtex e medula r	nos grupos estudados.
---------------------	----------------------	----------------------	-----------------------

Grupos	Córtex	Medula
D0	$0,5 \pm 0,01$	$0,9 \pm 0,03$
D1	$0,9\pm0,1$	$1,1\pm0,1$
D3	$1,2\pm0,4$ <sup>b</sup>	$4,7 \pm 1,6^{a,b,c}$
D5	$0,9\pm0,2$	$7,7 \pm 1,2^{a,b,c,d}$
D7	$1,4 \pm 0,4$ <sup>a,b</sup>	$7,1 \pm 0,8^{\rm ~a,b,c}$
D14	$0,9\pm0,4$	$4,5 \pm 0.9$ <sup>b,c,e</sup>
Sham	$0,6 \pm 0,1$	$1,9 \pm 1,1$

**a** p<0,05 versus Sham; **b** p <0,05 versus D0; **c** p <0,05 versus D1; **d** p <0,05 versus D3; **e** p <0,05 versus D5; **f** p <0,05 versus D7.


**Figura 14** – Expressão de vimentina em córtex. Maior expressão observada em D3 e D7. Vimentina em marrom, contra-coloração com hematoxilina de Harris.

**a** p<0,05 *versus* Sham; **b** p<0,05 *versus* D0.



**Figura 15** – Expressão de vimentina em medula. Elevação a partir de D3, pico em D5 e D7 e redução em D14. Vimentina em marrom, contra-coloração com hematoxilina de Harris.

**a** p<0,05 versus Sham; **b** p<0,05 versus D0; **d** p,0,05 versus D3; **e** p<0,05 versus D5.

#### 5.8 - Marcadores pró-fibróticos

#### 5.8.1. Alfa-actina

A presença de miofibroblastos em interstício, detectada através da coloração de alfa actina, foi observada a partir de 24 horas após a lesão isquêmica em camada cortical, permanecendo significativamente superior à dos animais controle em todos os períodos do estudo.

Em medula, aumento da expressão de alfa-actina ocorreu a partir de D3, com aumento progressivo até D7 e tendência à redução em D14. Em comparação aos animais controle, a presença de miofibroblastos em interstício medular foi significativamente maior no período D3-D14. [Tabela 10, figuras 16 e 17].

Grupos	Córtex	Medula
D0	$0,9 \pm 0,03$	$1,0 \pm 0,05$
D1	$1,32 \pm 0,09^{a,b}$	$1,8 \pm 0,2$
D3	$1,58 \pm 0,06$ <sup>a,b</sup>	$3,7 \pm 0,1^{a,b,c}$
D5	$1,9 \pm 0,03^{a,b,c}$	$3,9 \pm 0,3^{a,b,c}$
D7	$1,5\pm0,1^{\mathrm{~a,b,d}}$	$4,8 \pm 0,3^{a,b,c,d}$
D14	$1,7\pm0,1^{\mathrm{~a,b,c}}$	$3,9 \pm 0,5^{a,b,c}$
Sham	$0,9\pm0,2$	$1,6 \pm 0,7$

 Tabela 10- Expressão de alfa-actina [%área] em córtex e medula nos grupos estudados

**a** p<0,05 versus Sham; **b** p <0,05 versus D0; **c** p <0,05 versus D1; **d** p <0,05 versus D3; **e** p <0,05 versus D5; **f** p <0,05 versus D7.



**Figura 16** – Expressão de alfa-actina em córtex. Elevação a partir de D1, permanecendo constante nos grupos subsequentes. Alfa-actina em marrom, contra-coloração com hematoxilina de Harris.

**a** p<0,05 versus Sham; **b** p<0,05 versus D0; **c** p<0,05 versus D1; **d** p,0,05 versus D3.



**Figura 17** – Expressão de alfa-actina em medula. Elevação a partir de D3, com aumento progressivo até D7 e tendência à redução em D14. Alfa-actina em marrom, contra-coloração com hematoxilina de Harris.

**a** p<0,05 versus Sham; **b** p<0,05 versus D0; **c** p<0,05 versus D1; **d** p,0,05 versus D3.

# 6- DISCUSSÃO

A lesão por isquemia e reperfusão está associada à alta morbidade e mortalidade, além de ser a principal causa de IRA, [Thadani *et al*, 1996] tanto em rins nativos [Rabb *et al*, 1997] quanto em rins transplantados [Shoskes & Halloran, 1996]. A insuficiência renal aguda é um grande desafio da medicina clínica, com índices de mortalidade e morbidade pouco alterados nas últimas duas décadas [Schrier *et al*, 2004].

Embora a relevância clínica de modelos animais permaneça pouco clara, o modelo de I/R é o mais explorado no desenvolvimento de IRA experimental. A simplicidade, reprodutibilidade, facilidade de lesão controlada por tempo de lesão e resposta inflamatória similar à observada em humanos são vantagens consideráveis. No entanto, a IRA isquêmica isolada é fenômeno incomum na medicina clínica. A completa interrupção do fluxo sanguíneo renal é observada apenas em circunstâncias especiais, tais como embolismo da artéria supra-renal ou *clamping* aórtico durante cirurgia vascular.

A fisiopatologia da lesão de I/R envolve uma complexa relação entre lesão de células tubulares, alterações na hemodinâmica renal, lesão de células endoteliais, expressão de uma série de proteínas nefrogênicas e ativação de processos inflamatórios [Ysebaert *et al*, 2000; Villanueva et al, 2005; Villanueva et al, 2006].

Na presente série, o clampeamento bilateral dos pedículos renais durante 45 minutos, mostrou-se efetivo no desenvolvimento de IRA, conforme demonstrado pela elevação dos níveis séricos de creatinina, pela extensa necrose tubular e também pela infiltração de células inflamatórias para o interstício renal, associada com o aumento na expressão de fatores pró-inflamatórios, de diferenciação epitélio-mesenquinal e pró-fibróticos.

A maioria dos estudos demonstra que a lesão por I/R acarreta em redução do peso dos animais entre o procedimento cirúrgico e o sacrifício. Em modelos de nefrectomia contralateral e isquemia de 60 minutos, Ysebaert et al [2000] descrevem redução de 15% no peso sem recuperação até o décimo dia. Forbes et al [2000], com tempo de isquemia de 45 minutos, relatam redução do peso até oito dias após a reperfusão. Fenômeno semelhante é descrito em modelos de I/R em camundongos, onde o clampeamento bilateral por 45 minutos, cursou com redução de 13% no peso dos animais entre a cirurgia e o sacrifício

[Pinheiro 2001; Pinheiro *et al*,2007]. Entretanto, em modelo de isquemia bilateral menos prolongada (30 minutos), Gobé et al [1999] não observaram variação significativa no peso dos animais.

No presente estudo, houve redução significativa do peso dos animais entre a data da cirurgia e a data do sacrifício nos grupos até o quinto dia pós-reperfusão, quando os animais passaram a apresentar recuperação de peso. Esta perda ponderal pode ser justificada pelo procedimento cirúrgico extremamente invasivo, pelo prolongado período de clampeamento dos pedículos renais e também pela exposição das vísceras abdominais durante o procedimento cirúrgico, levando à alterações metabólicas importantes. Este catabolismo também é influenciado pelo grau de IRA. A partir do sétimo dia pós reperfusão, quando a lesão renal começa a regredir, é observado um aumento do peso dos animais, porém ainda inferior ao dos animais do grupo controle.

Em modelos de IRA por I/R, o comprometimento da função renal é comumente avaliado a partir da dosagem de creatinina sérica, havendo elevação progressiva destes valores e ótima correlação com a redução da taxa de filtração glomerular [Kelly et al, 1996, O'Donnel et al, 2002].

Modelos de I/R bilateral em ratos mostram pico de creatinina sérica 24 horas após insulto isquêmico. Villanueva et al [2005], em modelo de isquemia de 30 minutos, mostraram elevação de creatinina sérica de 0,6 para 1,2mg/dL. Jo et al [2006], com tempo de isquemia de 40 minutos, observaram elevação de creatinina de 0,7 para 2,1mg/dL. Em modelos de nefrectomia contralateral seguida de isquemia, os maiores valores de creatinina sérica são observados 48 horas após a reperfusão. Ysebaert et al [2000], com tempo de isquemia de 60 minutos, descrevem elevação de creatinina de 0,75 para 4,0mg/dL, com redução até D7. Forbes et al [2000], com tempo de isquemia de 45 minutos, descrevem variação semelhante, de 0,05 para 0,42mmol/L.

Na presente série, houve aumento significativo dos níveis de creatinina sérica em todos os grupos entre a data da coleta basal e a do sacrifício, com elevação significativa a partir de 24 horas pós reperfusão, o que mostra a efetividade do modelo empregado. Apenas a manipulação dos pedículos renais sem interrupção do fluxo sanguíeno [grupo Sham] não alterou, como esperado, a função renal.

Os valores mais elevados de creatinina sérica pós I/R foram observados 24horas pós-clampeamento [D1], demonstrando que a disfunção renal é mais pronunciada nas primeiras 24 horas após o insulto. A redução gradativa dos valores nos grupos subsequentes sugere uma recuperação da função renal com o passar do tempo.

A lesão histológica da IRA por I/R, com quantificação do grau de NTA, é habitualmente realizada por métodos semi-quantitaivos, com valores expressos em cruzes ou *escores* [Kelly et al, 1996]. No presente estudo, o grau de acometimento de necrose tubular aguda foi avaliado de forma quantitativa, expresso em percentual de túbulos íntegros, em degeneração, completamente degenerados ["carecas"] e em regeneração. A manipulação isolada dos pedículos renais, sem o clampeamento [Grupo Sham] não desencadeou alterações na morfologia tubular, como esperado.

Na fase inicial de lesão houve predomínio de alterações degenerativas e de túbulos completamente degenerados ("carecas"), com aumento na regeneração de células tubulares a partir de D7, associada a um aumento do percentual de túbulos íntegros. Estes achados encontram relação com os níveis de creatinina sérica pós-isquemia. Dessa forma, fica claro que, neste modelo, a lesão renal induzida por I/R é mais intensa nas primeiras 24 horas após o insulto, com gradativa recuperação histológica do tecido renal com o passar do tempo.

O percentual de túbulos em degeneração aumentou gradativamente a partir de D1, atingindo o pico em D5, e sofrendo redução a partir de D7. Esses valores permitem a avaliação da extensão da lesão, ao invés da intensidade, quantificado pelos túbulos em completa degeneração. Desta forma, podemos dizer que a lesão renal causada por I/R, em medular externa, avaliando-se dano tubular parcial, permaneceu por até cinco dias após reperfusão.

Estudos com modelos experimentais de I/R renal descrevem necrose tubular franca e extensa na porção medular superficial [Solez et al, 1979]. Pinheiro [2001], trabalhando com camundongos e isquemia bilateral de 45 minutos, descreve pico de NTA 24 e 48 horas após o insulto. Ysebaert et al [2000], em modelo de I/R por 60 minutos, seguido de nefrectomia contralateral, descrevem NTA mais intensa em D1 com surgimento dos primeiros sinais de regeneração em D2.

Poucos trabalhos utilizam o padrão histológico quantitativo para avaliar a regeneração tubular. Trabalhando com ratos, com isquemia bilateral de 60 minutos, Kudo et al, (1993), observaram que sinais de regeneração surgiam 48 horas após a reperfusão e, em medular externa, o pico de células proliferativas ocorria entre o quinto e o sétimo dia. Vercauteren *et al* [1999], por sua vez, observaram que em 24 horas após a reperfusão, menos de 5% dos túbulos da medula externa apresentavam sinais de regeneração, atingindo níveis de 80% no terceiro dia, com redução para cerca de 20% no sexto dia. Na presente série, túbulos em regeneração foram observados a partir de D1, com aumento gradativo, até atingir o pico em D7.

A regeneração dos túbulos lesados pode ser quantificada pela presença de proliferação de células tubulares. Ysebaert *et al*, (2000), descreveram os primeiros sinais de proliferação celular em resposta a I/R em 48h pós-isquemia, com pico de proliferação em D3, e redução gradativa, com metade dos túbulos proximais completamente regenerados no 10°. dia de estudo. Em nosso estudo, o pico de proliferação celular em túbulos proximais e distais foi também observado em D3. No entanto, em interstício cortical, o pico de proliferação ocorreu em D7. Na região medular, os picos de proliferação celular em túbulos medulares ocorreu em D3.

Além da proliferação de células tubulares, a IRA induzida por I/R também cursa com infiltrado e proliferação de células inflamatórias em interstício. Forbes *et al*, (2000), demonstraram que a proliferação celular ocorre inicialmente nos segmentos tubulares, com aumento de proliferação intersticial com o passar do tempo, indo de 30% em D2 para 70% em D4. Outros estudos mostram que a resposta proliferativa em interstício ocorre nas primeiras 24 horas pós-reperfusão, com pico em D3 [Ysebaert *et al*, 2003].

As células inflamatórias mais estudadas na lesão por I/R são os macrófagos e linfócitos T. Outros tipos inflamatórios, como mastócitos, são usualmente ignorados em modelos de IRA [Eddy, 2001], apesar de sua participação em diferentes modelos de inflamação intersticial crônica ter sido demonstrada [Blank *et al*, 2007; Kinet 2007].

No presente estudo, em região cortical, o número de mastócitos no interstício renal, em resposta ao insulto isquêmico, foi estatisticamente significante apenas em D7. Na camada medular, entretanto, houve aumento significativo no número de mastócitos, progressivo a partir de D1 e com pico em D14, sugerindo a expressão precoce durante a fase de instalação da lesão, e sua permanência também na fase de recuperação e/ou cicatrização.

A infiltração de macrófagos foi crescente a partir de D1 tanto em córtex quanto em medula, atingindo pico, respectivamente, em D7 e D5. Os resultados observados são concordantes com a literatura. Ysebaert *et al*, (2000), em modelo de isquemia unilateral por 60 minutos seguido da nefrectomia contralateral, descrevem aumento da infiltração de macrófagos a partir de 24 horas pós-I/R com pico em D7, sem distinção entre camadas cortical e medular. Estudos com menor tempo de isquemia, de 30 minutos, mostram um pico de infiltração de macrófagos ao redor de 48 horas pós-reperfusão [Villanueva *et al*, 2006].

A infiltração de linfócitos T ocorreu precocemente, a partir de D1, tanto em córtex quanto em medula. Entretanto, enquanto o infiltrado medular apresentou pico em D3, o infiltrado de linfócitos T permaneceu estável durante todo o período de estudo. Os resultados observados encontram, novamente, respaldo na literatura. Ysebaert *et al* (2000) descrevem pico da infiltração de linfócitos em D3, sem diferenciação entre córtex e medula.

Os grupos de células inflamatórias estudadas [mastócitos, macrófagos e linfócito T] apresentaram infiltrado mais intenso em camada medular comparada à córtex, compatível com maior inflamação na área de maior lesão tecidual, concordante com estudos prévios. [Vukicevic et al, 1998].

A cinética de infiltração celular em camada medular, em resposta à lesão por I/R, foi diferenciada para os tipos celulares analisados. Macrófagos e linfócitos T apresentaram infiltrado significativo a partir do 3º. dia pós reperfusão, enquanto que os mastócitos apresentaram elevação significativa a partir de D1. Entretanto, ao contrário dos outros tipos celulares, que diminuíram com o passar do tempo, o infiltrado de mastócitos

aumentou progressivamente, atingindo pico em D14. Este infiltrado precoce pode ser resultado do afluxo de células circulantes, provenientes de medula, para o local de lesão imediatamente após a reperfusão. Os mastócitos, uma vez ativados, liberariam fatores quimiotáticos para outros tipos celulares, especialmente macrófagos e linfócitos T, favorecendo o infiltrado destas células a partir de D3. Os mastócitos participam da resposta inflamatória na lesão renal pela sua habilidade de secretar mediadores inflamatórios [Blank *et al*, 2007]. Os mastócitos podem interagir diretamente com outros tipos celulares, como linfócitos B e T, por contato direto célula-célula [Galli *et al*, 2005]. Estas interações participam da orquestração da reação inflamatória, assim como da permeabilidade vascular, atração de outras células e modulação de respostas imunes [Kinet, 2007].

Já a persistência dos mastócitos, mesmo após a redução dos outros tipos celulares, poderia ser explicada pela capacidade destas células de sintetizar componentes de matriz extracelular, além de mediadores de reparo tecidual. Estudos anteriores sugerem que a infiltração de mastócitos esteja correlacionada com edema intersticial na rejeição aguda do enxerto [Lajoie et al, 1996] e em lesões renais progressivas não-fibróticas [Ehara et al, 2003]. Além disto, proteases liberadas pelos mastócitos, como quimase e triptase, atuam como mitógenos para células epiteliais, e na regulação de TGFβ [Cairns & Walls, 1996; Lindstedt *et al*, 2001].

A análise de marcadores pró-inflamatórios, como a osteopontina, demonstrou um aumento de sua expressão em resposta ao insulto isquêmico, em todos os grupos analisados, em comparação ao grupo controle. Nambi *et al* [1997], a partir da quantificação de mRNA [Nothern Blot], descrevem aumento na expressão de OPN em todos os segmentos do néfron em resposta ao insulto isquêmico.

Na presente série, a expressão de osteopontina mostrou-se tempo-dependente nos diferentes compartimentos renais analisados. Inicialmente observou-se aumento da expressão de OPN em medular profunda, com pico em D1. Na região cortical, o pico de expressão ocorreu em D3 e, em medular superficial, em D5. A expressão de OPN em resposta a I/R ocorre inicialmente nos segmentos distais do néfron (medular profunda) e, posteriormente, nos segmentos proximais (medular superficial e córtex). Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura. Padanilan *et al* [1996], utilizando técnicas de imunohistoquímica, observaram pico de expressão de OPN em túbulos distais e porção ascendente da Alça de Henle em D1 e, em túbulos proximais em D5, sem haver interrupção da expressão em segmentos distais. Resultados semelhantes foram observados por Persy *et al* [2003].

A expressão mais tardia em segmentos proximais está relacionada à regeneração tubular característica do modelo. Essa expressão é maior em medular superficial do que em córtex, uma vez que aquela região é a mais afetada pelo processo isquêmico e apresenta resposta regenerativa mais intensa [Persy *et al*, 2003].

Durante a fase inicial da IRA isquêmica, observamos um aumento tanto na expressão de marcadores pró-inflamatórios quanto na infiltração de células inflamatórias. Na fase de recuperação, houve redução da expressão de osteopontina pelas células tubulares, acompanhada da redução do infiltrado inflamatório, especialmente de macrófagos. Esta relação temporal entre OPN e células inflamatórias é consistente com relatos anteriores, onde, em diferentes modelos de IRA, a expressão de osteopontina precede o infiltrado de macrófagos [Pichler *et al*, 1994]. A OPN também atua como fator de retenção de macrófagos e linfócitos no local de inflamação [Mazzali *et al*, 2002], além de apresentar atividade quimiotática para fibroblastos [Petrow *et al*, 2000].

Tanto a proliferação celular como a inflamação são fenômenos iniciais no processo de recuperação tecidual. A avaliação deste reparo tecidual foi feita através da análise da expressão de vimentina, que apresentou elevação em resposta ao insulto isquêmico em todos os grupos estudados, porém em tempos diferentes para os segmentos renais analisados.

Em córtex, os picos de expressão de vimentina foram observados em D3 e D7. Em medular superficial e profunda, houve aumento da expressão de vimentina a partir de D3, com pico em D5-D7. Em camada medular a expressão de vimentina manteve-se acima dos valores basais até o final do período de estudo. Villanueva *et al*, (2006), descreveram pico de expressão deste fator 48 horas após insulto isquêmico, com redução nos tempos subseqüentes. Este aumento precoce da expressão de vimentina ocorreria como resposta à lesão isquêmica, já que esta proteína está diretamente relacionada com a iniciação do processo de regeneração tubular [Al-awqati & Oliver, 2002]. Entretanto, a persistência da expressão de vimentina por células tubulares, em uma fase mais tardia, poderia estar associada ao processo de diferenciação epitélio mesenquimal e atração de miofibroblastos [Shu *et al*, 2002].

O processo de lesão tecidual com atração de miofibroblastos foi avaliado através da imunohistoquímica para alfa actina, que se apresentou elevada em resposta ao insulto isquêmico em todos os grupos estudados. Em camada cortical, o pico de expressão de alfa-actina foi observado em D5. Em medular superficial e profunda, o pico ocorreu em D7, com expressão de maior intensidade em região medular superficial. Estudos anteriores descrevem pico de expressão de alfa-actina 48 horas pós reperfusão, com redução até o 4°. dia pós reperfusão [Villanueva *et al*, 2006]. Forbes *et al*, [2000] também observaram aumento precoce da expressão de alfa-actina (D2), porém com pico de expressão após uma semana da lesão.

Na presente série, a expressão de fatores pró-inflamatórios (osteopontina) e pró-fibróticos (vimentina e alfa-actina) em resposta à lesão por I/R foi mais intensa em medula superficial, compatível com a área com maior intensidade de necrose tubular aguda à microscopia óptica.

Associação entre mastócitos e fibroblastos foi demonstrada em estudos utilizando microscopia eletrônica, onde o interstício renal ao redor dos mastócitos apresentava alterações edematosas [Ehara et al, 2003]. Presença de mastócitos em interstício também foi demonstrada em diversos modelos de nefropatia crônica, como glomerulonefrites, nefropatia diabética e rejeição do enxerto renal [Ruger *et al*, 1996; Thot *et al*, 1999; Yamada *et al*, 2001; Blank *et al*, 2007]. Entretanto, mesmo com a associação de mastócitos com fibrose intersticial nestes modelos, sugere-se que a migração de mastócitos para áreas fibróticas seja consequência da fibrose e não que estas células estejam envolvidas no desenvolvimento de fibrose *per se* [Kinet et al, 2007]. Estudo prévio de nosso grupo mostrou aumento precoce do número de mastócitos em biópsias de pacientes com IRA pós-transplante, com disfunção primária do enxerto na ausência de rejeição aguda. A manutenção da infiltração de mastócitos esteve associada ao pior prognóstico dos enxertos, com disfunção primária (*primary non function*) [Sato et al, 2004].

No presente estudo, a análise do infiltrado inflamatórios em resposta à lesão por I/R mostra uma infiltração precoce de mastócitos em medula (D1), seguida da infiltração de macrófagos e linfócitos T, em D3. Entrentanto, diferentemente de macrófagos e linfócitos T, que sofrem redução com o passar do tempo, o infiltrado de mastócitos permanece elevado no ponto mais tardio do estudo [D14]. A persistência de mastócitos pode ser explicada pela migração de células de medula e um maior tempo de vida deste tipo celular, assim como pelo estímulo constante de migração de degranulação de mastócitos. Os mastócitos também estão envolvidos no reparo do tecido através da secreção de fatores de crescimento, proteases e heparina, com uma ação fibrótica e de remodelação de matriz [Blank et al, 2007]. A triptase de mastócitos está associada a um aumento a síntese de DNA, de fibronectina e de colágeno I por fibroblastos [Kinet, 2007].

A persistência da infiltração de mastócitos em tempos tardios [D7 e D14] encontrou correlação com a expressão de vimentina, um marcador de transdiferenciação epitélio-mesenquimal, assim como com a expressão de alfa-actina por miofibroblastos. A expressão de vimentina durante a fase de recuperação de IRA serve de estímulo para regeneração de células tubulares, em um processo similar ao observado durante a organogênese [Villanueva *et al*, 2006]. A vimentina também atua no processo de transdiferenciação epitélio-mesenquimal, com o recrutamento de fibroblastos e síntese de matriz extracelular [Au *et al*, 2007]. Os mastócitos interagem com fibroblastos a partir de junções GAP [Au *et al*, 2007], e a interação inadequada entre mastócitos/fibroblastos estaria associada ao estímulo para desenvolvimento de fibrose.

Em resumo, neste modelo de insuficiência renal aguda induzida por isquemia/reperfusão, a infiltração de mastócitos para o interstício renal ocorreu inicialmente em região medular, e persistiu por todo o tempo do estudo [14 dias]. A infiltração de mastócitos apresentou associação com inflamação e infiltração de macrófagos e linfócitos T, assim como com a expressão de fatores pró-fibróticos e de diferenciação epitélio mesenquimal. A persistência de mastócitos correlacionou-se à expressão de vimentina e com a presença de miofobroblastos, sugerindo que este tipo celular esteja envolvido tanto no processo de regeneração como de cicatrização tecidual.

### 7- CONCLUSÕES

- No modelo de insuficiência renal aguda induzida por isquemia/reperfusão, a infiltração de mastócitos para o interstício renal ocorreu inicialmente em medula, e persistiu por todo o tempo do estudo [14 dias].
- O infiltrado de mastócitos em medula precedeu o de outros tipos celulares (macrófagos e linfócitos T). Entretanto, enquanto o infiltrado de outras células diminuiu com o passar do tempo, o infiltrado de mastócitos apresentou pico tardio (D14).
- O infiltrado de mastócitos foi concomitante à infiltração de macrófagos e linfócitos T, assim como com a expressão de fatores pró-inflamatórios, pró-fibróticos e de transdiferenciação.
- A persistência do infiltrado de mastócitos apresentou associação com a expressão de vimentina e com a presença de miofobroblastos, sugerindo que mastócitos estejam envolvidos tanto no processo de regeneração como na iniciação do processo de fibrose tecidual.

# 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER B.; ASHKAR S.; CANTOR H.; WEBER G.F. Costimulation by extracellular matrix proteins determines the response to tcr ligation. **Cell Immunol** 210: 30-40, 2001.

AL-AWQATI Q.; OLIVER J.A. Stem cells in the kildney. Kidney Int 61: 387–395, 2002.

ALPERS C.E.; HUDKINS K.L.; FLOEGE J.; JOHNSON R.J. Human renal cortical interstitial cells with some features of smooth muscle cell participate in tubulointerstitial and crecentic glomerular injury. **J Am Soc Nephrol** 5: 201–209, 1994.

ARMBRUST T.; BATUSIC D.; RINGE B.; RAMADORI G. Mast cells distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis. Indications for mast cell participation in development of liver fibrosis. **J Hepatol** 26: 1042-1054, 1997.

ASHKAR S.; WEBER G.F.; PANOUTSAKOPOULOU V.; SANCHIRICO M.E.; JANSSON M.; ZAWAIDEH S. Eta-1 [osteopontin]: An early component of type-1 cell-mediated immunity. **Science** 287: 860-864, 2000.

AU S.R.; AU K.; SAGGERS G.C.; KARNE N.; EHRLICH H.P. Rat mast cells communicate with fibroblasts via gap junction intercellular communications. **J Cell Biochem** 100: 1170-1177, 2007.

AZUMA H.; NADEAU K.; TAKAD M.; MACKENZIE H.S.; TILNEY N.L. Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia reperfusion in injury of a single kidney. **Transplantation** 64: 190-197, 1997.

BADID C.; VINCENT M.; MCGREGOR B. Mycophenolate mofetil reduces myofibroblast infiltration and collagen III deposition in rat remnant kidney. **Kidney Int** 58: 51–61, 2000.

BASILE D.P.; FREDRICH K.; ALAUSA M.; VIO C.P.; LIANG M.; RIEDER M.R.; GREENE A.S.; COWLEY A.W. Identification of persistently altered gene expression in the kidney after functional recovery from ischemic acute renal failure. **Am J Physiol Renal Physiol** 288: 953-963, 2005.

BLAIR R.J.; MENG H.; MARCHESE M.J. Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. **J Clin Invest** 99: 2691–2670, 1997.

BLANK U.; ESSIG M.; SCANDIUZZI L. Mast cells and inflammatory kidney disease. **Immunol Rev**217: 79-95, 2007.

BONVENTRE J.V. Ischemic acute renal failure, in Textbook of Molecular Medicine, edited by Jamison JL, Cambridge, MA, Blackwell Science, 1996a.

BONVENTRE J.V.; KELLY K.J. Adhesion molecules and acute renal failure. Adv Nephrol Necker Hosp 25: 159-176, 1996b.

BONVENTRE J.V.; ZUK A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? **Kidney Int** 66: 480-485, 2004.

BREZIZ M.; ROSEN S.; SILVA P.; EPSTEIN F.H. Renal ischemia: a new perspective. **Kidney Int** 26: 375–383, 1984.

BREZIS, M.; EPSTEIN, F.H. Cellular mechanisms of acute ischemic injury in the kidney. **Ann Ver Med** 44: 27-37, 1993.

BRODSKY S.V.; YAMAMOTO T.; TADA T. Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: Rescue by transplanted endothelial cells. **Am J Physiol Renal Physiol** 282: 1140-1149, 2002.

BUCALA R.; SPIEGEL L.A.; CHESNEY J. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. **Mol Med** 1: 71–81, 1994.

BURNE M.J.; DANIELS F.; EL GHANDOUR A. Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. **J Clin Invest** 108: 1283-1290, 2001.

CAIRNS J.A.; WALLS A.F. Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. **J Clin Invest** 99: 1313-1321, 1997.

CAIRNS J.A.; WALLS A.F. Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells estimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression. **J Immunol** 156: 275–283, 1996.

CEOL M.; GAMBARO G.; SAUER U.; BAGGIO B.; ANGLANI F.; FORINO M.; FACCHIN S.; WEIGERT C.; BORDIN L.; NERLICH A.; SCHLEICHER E.D. Glycosaminoglycan therapy prevents TGF-beta1 overexpression and pathologic changes in renal tissue of long-term diabetic rats. **J Am Soc Nephrol** 11: 2324-2336, 2000.

CHURCH M.K.; LEVISCHAFFER F. The human mast cell. J Allergy Clin Immunol 99: 155–160, 1997.

CLAMAN H.N. Mast cells, endothelial cells, and fibroblasts. JAMA 262: 1206–1209, 1989.

DAHA M.R.; VAN KOOTEN C. Is the proximal tubular cell a proinflammatory cell? **Nephrol Dial Transplant** 15: 41-43, 2000.

DE HEER E.; DAVIDOFF A.; VAN DER WAL A.; VAN GEEST M.; PAUL L.C. Chronic renal allograft rejection in the rat. Transplantation-induced antibodies against basement membrane antigens. Lab Invest 70: 494-502, 1997.

DEL VECCHIO P.J.; BIZIOS R.; HOLLERAN L.A.; JUDGE T.K.; PINTO G.L. Inhibition of human scleral fibroblast proliferation with heparin. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 29: 1272-1276, 1988.

DENHARDT D.T.; GUO X. Osteopontin: a protein with diverse functions. **FASEB J** 7: 1475-1482, 1993.

DONNAHOO K.K.; MELDRUM D.R.; SHENKAR R. Early renal ischemia, with or without reperfusyon, activates NF-kappaB and increases TNF-alpha bioactivity in the kidney. **J Urol** 163: 1328-1332, 2000.

DUFFIELD J.S.; PARK K.M.; HSIAO L.L.; KELLEY V.R.; SCADDEN D.T.; ICHIMURA T.; BONVENTRE J.V. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. **Clin Invest** 115: 1743-1755, 2005.

EDELSTEIN C.; SCHRIER R.W. Pathophysiology of ischemic acute renal failure. In Diseases of the kidney and urinary tract. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, Pennsylvania, USA. 1041–1070, 2001.

EDDY AA. Mast cells find their way to the kidney. Kidney Int 60: 375-377, 2001.

EHARA T.; SHIGEMATSU H. Mast cells in the kidney. Nephrology 8: 130-138, 2003.

EKNOYAN G.; MCDONALD M.A.; APPEL D.; TRUONG L.D. Chronic tubulo-interstial nephritis: correlation between structural and functional findings. **Kidney Int** 38: 736-743, 1990.

EPPIXIMER M.J.; RUSSELL J.; ANDERSON D.C. Modulation of P-selectin expression in the postischemic intestinal microvasculature. **Am J Physiol** 273: 1326-1332, 1997.

FERRAO A.V.; MASON R.M. The effect of heparin on cell proliferation and type-I collagen synthesis by adult human dermal fibroblasts. **Biochim Biophys Acta** 1180: 225-230, 1993.

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

FRIEDEWALD J.J.; RABB H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. **Kidney Int** 66: 486-4891, 2004.

GALLI S.J.; KALENISKOFF J.; GRIMBALDESTON M.A. Mast cells as tunable effector and immunoregulatory cells: recent advances. **Annu Rev Immunol** 23: 749-786, 2005.

GERSHON R.K.; ASKENASE P.W.; GERSHON M.D. Requirement for vasoactive amines for production of delayed type hypersensitivity skin reaction. **J Exp Med** 142: 732–747, 1975.

GHIELLI M.; VERSTREPEN W.; DE GREEF K. Inflammatory cells in renal pathology. **Nephrologie** 19: 59-67, 1998.

GOBÉ G.; WILLGOSS D.; HOGG N.; SCHOCH E.; ENDRE Z. Cell survival or death in renal epithelium after ischemia-reperfusion injury. **Kidney Int** 56: 1299-1304, 1999.

GORDON J.R.; GALLI S.J. Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. Role for mast cell-derived transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. **J Exp Med** 180: 2027-2037, 1994.

GREENBERG G.; BURNSTOCK G. A novel cell-to-cell interaction between mast cells and other cell types. **Exp. Cell Res** 147: 1–13, 1983.

GRUBER B.L.; MARCHESE M.J.; KEW R.R. Transforming growth factorbeta 1 mediates mast cell chemotaxis. **J Immunol** 152: 5860–5867, 1994.

GUELER F.; GWINNER W.; SCHWARZ A.; HALLER H. Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury. **Kidney Int** 66: 523-527, 2004.

HALLORAN P.F.; HOMIK J.; GOES N. The injury response: A concept linking nonspecific injury, acute rejection, and long-term transplant outcomes. **Transplant Proc** 29: 79-81, 1997.

HANCOCK W.H.; WHITLEY W.D.; TULLIUS S.G. Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. **Transplantation** 56: 643-650, 1993.

HAY E.D.; ZUK A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. **Am J Kidney Dis** 26:678–690, 1995.

HEINECKE J.W.; LI W.; DAEHNKE H.L.; GOLDSTEIN J.A. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. **J Biol Chem** 268: 4069-4077, 1993.

HELLBERG P.O.A.; BAYATI A.; KALLSOG O.; WOLGAST M. Neutrophil-mediated post-ischemic tubular leakage in the rat kidney. **Kidney Int** 36: 1240-1247, 1989.

HIROMURA K.; KUROSAWA M.; YANO S.; NARUSE T. Tubulointerstitial mast cell infiltration in glomerulonephritis. **Am J Kidney Dis** 32: 593-599, 1998.

HUDKINS K.L.; GIACHELLI C.M.; CUI Y.; COUSER W.G.; JOHNSON R.J.; ALPERS C.E. Osteopontin expression in fetal and mature human kidney. **J Am Soc Nephrol** 10: 444-457, 1997.

IWANO M.; PLIETH D.; DANOFF T.M. Evidence that fibroblast derive from epithelium during tissue fibrosis. **J Clin Invest** 110: 341 – 350, 2001.

JO S.K.; SUNG S.A.; CHO W.Y.; GO K.J.; KIM H.K. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. **Nephrol Dial Transplant** 21: 1231-1239, 2006.

JOSE M.D.; LE MEUR Y.; ATKINS R.C.; CHADBAN S.J. Blockade of M-CSF receptor reduces macrophage proliferation and accumulation in renal allografts. **Am J Transplant** 3: 294-300, 2003.

JOHNSON D.W.; SAUNDERS H.J.; BAXTER R.C.; FIELD M.J.; POLLOCK C.A. Paracrine stimulation of human renal fibroblasts by proximal tubule cells. **Kidney Int** 54:747-757, 1998.

KELLY K.J.; WILLIAMS W.W.; COLVIN R.B. Intercellular adhesion molecule-1deficient mice are protected against ischemic renal injury. **J Clin Invest** 97: 1056-1063, 1996.

KIERNAN J. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. Pergamon, Oxford, 1981.

KINET J.P. The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. **Immunol Rev** 217: 5-7, 2007.

KONDO S.; KAGAMI S.; KIDO H.; STRUTZ F.; MULLER G.A.; KURODA Y. Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. **J Am Soc Nephrol** 12: 1668–1676, 2001.

KUDO Y.; EGASHIRA T.; TAKAYAMA F.; YAMANAKA Y.; SHIMADA T. Investigation of the renal injury caused by liver ischemia-reperfusion in rats. **Arch Toxicol** 67: 502-509, 1993. LAJOIE D.; NADASDY T.; LASZIK Z.; BLICK B.E.; SILVA F.G. Mast cells in acute cellular rekection of human renal allografts. **Mod Pathol**: 1118-1125, 1996.

LI J.H.; ZHU H.J.; HUANG X.R. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-b on renal tubular epithelial cell by blocking Smad2 activation. **J Am Soc Nephrol** 13: 1464–1472, 2002.

LIEBERTHAL W. Biology of acute renal failure: Therapeutic implications. **Kidney Int** 52: 1102-1115, 1997.

LIN F.; MORAN A.; IGARASHI P. Intrarenal cells, not bone marrowderived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. **J Clin Invest** 115: 1756–1764, 2005.

LINAS S.L.; SHANLEY P.F.; WHITTENBURG D. Neutrophils accentuate ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat kidneys. **Am J Physiol** 255: 728-735, 1988.

LINDSTEDT K.A.; WANG Y.; SHIOTA N.; SAARINEN J.; HYYTIÄINEN M.; KOKKONEN J.O.; KESKI-OJA J.; KOVANEN P.T. Activation of paracrine TGF-beta1 signaling upon stimulation and degranulation of rat serosal mast cells: a novel function for chymase. **FASEB J** 15: 1377-1388, 2001.

LIU Z.; CONDON T.; BENNETT F. Macrophage migration into post-ischemic kidney. J Am Soc Nephrol 7: 1829, 1996.

LUBBERS D.W.; BAUMGARTL H. Heterogeneities and profiles of oxygen pressure in brain and kidney as examples of the pO2 distribution in the living tissue. **Kidney Int** 51: 372–380, 1997.

LY Q.Y.; RAZA AHMAD A.; MACAULAY M.A.; LALONDE L.D.; ROWDEN G.; TRETHEWEY E.; DEAN S. The relationship of mast cells and their secreted products to the volume of fibrosis in posttransplant hearts. **Transplantation** 53: 1047-1051, 1992.

MALYANKAR U.M.; ALMEIDA M.; JOHNSON R.J.; PICHLER R.H.; GIACHELLI C.M. Osteopontin regulation in cultured rat renal epithelial cells. **Kidney Int** 51: 1766-1773,1997.

MAYRHOFER G. Thymus-dependent and thymus-independent subpopulations of intestinal intraepithelial lymphocytes. A granular subpopulation of probable marrow origin and relationship to mucosal mast cells. **Blood** 55: 532–535, 1980.

MAZZALI M.; KIPARI T.; OPHASCHAROESUK V.; WESSON J.A.; JOHNSON R.; HUGUES J. Osteopontin – A molecule for all seasons. **Q J Medicine** 95: 3-13, 2002.

MENINGER C.J.; ZETTER B.R. Mast cells and angiogenesis. Semin Cancer Biol 3:73–79, 1992.

METCALFE D.D.; BARAM D.; MEKORI Y.A. Mast cells. Physiol Rev 77: 1033-1079, 1997.

MIURA M.; X. FU Q.W.; ZHANG D.G.; REMICK R.L.; FAIRCHILD. Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia/reperfusion injury. **Am. J. Pathol**: 159 2137–2145, 2001.

MOLITORIS B.A.; FALK S.A.; DAHL R.H. Ischemia-induced loss of epithelial polarity. Role of the tight junction. **J. Clin. Invest** 84:1334–1339, 1989.

MOLITORIS B.A.; SUTTON T.A. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. **Kidney Int** 66: 496-499, 2004.

NAMBI P.; GELLAI M.; WU H.L.; PRABHAKAR U. Upregulation of osteopontin in ischemia-induced renal failure in rats: a role for ET-1? **Biochem Biophys Res Commun** 241: 212-214, 1997.

NATHAN C.F. Points of control in inflammation. Nature 420: 846-852, 2002.

NILSSON G.; MIKOVITS J.A.; METCALFE D.D.; TAUB D.D. Mast cell migratory response to interleukin-8 is mediated through interaction with chemokine receptor CXCR2/Interleukin-8RB. **Blood** 93: 2791-2797, 1999.

NOIRI E.; DICKMAN K.; MILLER F.; ROMANOV G.; ROMANOV V.I.; SHAW R.; CHAMBERS A.F.; RITTLING S.R.; DENHARDT D.T.; GOLIGORSKY M.S. Reduced tolerance to acute renal ischemia in mice with a targeted disruption of the osteopontin gene. **Kidney Int** 56: 74-82,1999.

NONY P.A.; SCHNELLMANN R.G. Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure. **J Pharmacol Exp Ther** 304: 905-912, 2003.

O'DONNEL M.P.; BURNE M.; DANIELS F.; RAAB H. Utility and limitations of serum creatinine as a measure of renal function in experimental renal ischemia-reperfusion injury. **Transplantation** 73: 1841-1844, 2002.

OLIVER J.; MAC D.M.; TRACY A. The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury: renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode. **J Clin Invest** 30: 1307–1439, 1951.

OLOF P.; HELLBERG A.; KALLSKOG O.; WOLGAST M. Red cell trapping and postischemic renal blood flow. Differences between the cortex, outer and inner medulla. **Kidney Int** 40: 625-631, 1991.

ONG A.C.; FINE L.G. Tubular-derived growth factors and cytokines in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis: implications for human renal disease progression. **Am J Kidney Dis** 23: 205-209, 1994.

OPHASCHAROENSUK V.; GIACHELLI C.M.; GORDON K.; HUGHES J.; PICHLER R.; BROWN P.; LIAW L.; SCHMIDT R.; SHANKLAND S.J.; ALPERS C.E.; COUSER W.G.; JOHNSON R.J. Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. **Kidney Int** 56: 571-580,1999.

ORPHANIDES C.; FINE L.G.; NORMAN J.T. Hypoxia stimulates proximal tubular cell matrix production viaTGF-b1 independent mechanism. **Kidney Int** 52: 637–647, 1997.

PADANILAM B.J.; MARTIN D.R.; HAMMERMAN M.R. Insulin-like growth factor I-enhanced renal expression of osteopontin after acute ischemic injury in rats. **Endocrinology** 137: 2133-2140, 1996.

PERSY V.P.; VERHULST A.; YSEBAERT D.K. Reduced postischemic macrophage infiltration and interstitial fibrosis in osteopontin knockout mice. **Kidney Int** 63: 543-553,2003.

PETROW P.K.; HUMMEL K.M.; CHEDEL J.; FRANZ J.K.; KLEIN C.L.; MULLER-LADNER U. Expression of osteopontin messenger RNA and protein in rheumatoid arthritis: effects of osteopontin on the release of collagenase 1 from articular chondrocytes and synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum** 43: 1597-605, 2000.

PICHLER R.; GIACHELLI C.M.; LOMBARDI D.; PIPPIN J.; GORDON K.; ALPERS C.E. Tubulointerstitial disease in glomerulonephritis. Potential role of osteopontin. **Am J Pathol** 144: 915-926, 1994.

PINHEIRO H.S. O papel do linfócito T CD4+ na lesão de isquemia/reperfusão renal num modelo experimental de insuficiência renal aguda. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2001.

PINHEIRO H.S., CAMARA N.O., NORONHA I.L.,MAUGERI I.L., FRANCO M.F., MEDINA J.O., PACHECO-SILVA A. Contibution of CD4+ T cells to the early mechanisms of ischemia-reperfusion injury in a mouse model of acute renal failure. **Braz J Med Biol Res** 40: 557-68, 2007.

QU Z.; LIEBLER J.M.; POWERS M.R.; GALEY T.; AHMADI P.; HUANG X.N.; ANSEL J.C.; BUTTERFIELD J.H.; PLANCK S.R.; ROSENBAUM J.T. Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. **Am J Pathol** 147: 564-573, 1995.

RABB H.; O'MEARA Y.M.; MADERNA P.; COLEMAN P.; BRADY H.R. Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure. **Kidney Int** 51: 1463-1468, 1997.

RABB H.; DANIELS F.; O'DONNELL M. Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. **Am J Physiol Renal Physiol** 279: 525-531, 2000.

RAZZAQUE M.S.; TAGUCHI T. Cellular and molecular events leading to renal tubulointerstitial fibrosis. **Med Electron Microsc** 35: 68-80,2002.

REIMER K.A.; GANOTE C.E.; JENNINGS R.B. Alterations in renal cortex following ischemic injury. Ultrastructure of proximal tubule after ischemia or autolysis. Lab Invest 26: 347-363, 1972.

REMUZZI G.; BERTANI T. Pathophysiology of progressive nephropathies. N Engl J Med 339: 1448-1456, 1998.

ROCKEY D.C. The cell and molecular biology of hepatic fibrogenesis. Clinical and therapeutic implications. **Clin Liver Dis** 4: 329–355, 2000.

ROBERTS I.S.; BURROWS C.; SHANKS J.H. Interstitial myofibroblasts: Predictors of progression in membranous nephropathy. **J Clin Pathol** 50: 123–127, 1997.

ROBERTS I.S.; BRENCHLEY P.E. Mast cells: the forgotten cells of renal fibrosis. J Clin Pathol 53: 858-862, 2000.

RUGER B.M.; HASAN Q.; GREENHILL N.S. Mast cells and type VIII collagen in human diabetic nephropathy. **Diabetologia** 39: 1215–1222,1996.

SATO V.A.H.; BERALDO F.C.; MAZZALI M. Mast cell infiltration correlates with primary non function in renal allografts. **J Am Soc Nephrol** 15: 280A, 2004.

SAVRANSKY V.; MOLLS R.R.; BURNE-TANEY M.; CHIEN C.C.; RACUSEN L.; RABB H. Role of the T-cell receptor in kidney ischemia-reperfusion injury. **Kidney Int** 69: 233-238, 2006.

SCANNEL G. Leukocyte responses to hypoxic/ischemic conditions. New Horizons 4: 179-183, 1996.

SCHECHTER N.M.; FRÄKI J.E.; GEESIN J.C.; LAZARUS G.S. Human skin chymotryptic proteinase. Isolation and relation to cathepsin G and mast cell proteinase I. **J Biol Chem** 258: 2973–2978, 1983.

SCHRIER R.W.; WANG W.; POOLE B.; MITRA A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. **J Clinical Invest** 114: 5-14, 2004.

SCHNERMANN J.; HOMER W. The justaglomerular apparatus: from anatomical peculiarity to physiological relevance. **J Am Soc Nephrol** 14: 1681–1694, 2003.

SCHWARTZ L.B.; LEWIS R.A.; SELDIN D.; AUSTEN K.F. Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. **J Immunol** 126: 1290–1294, 1981.

SHOSKES D.A.; HALLORAN P.F. Delayed graft function in renal transplantation: Etiology, management and long-term significance. **J Urol** 155: 1831-1840, 1996.

SHU Y.,HOSHI S. TOMARI S. WATNABE T.,NAGATA M. Phenotypic changes and cell cycle activation in early tubulointerstitial injury of rat adriamycin nephrosis. **Pathol Int** 52:214-223, 2002.

SODHI C.P.; PHADKE S.A.; BATLLE D.; SAHAI A. Hypoxia and high glucose cause exaggerated mesangial cell growth and collagen synthesis: role of osteopontin. **Am J Physiol Renal Physiol** 280: 667-674, 2001.

SOLEZ K.; MOREL-MAROGER L.; SRAER J.D. The morphology of acute tubular necrosis in man: Analysis of 57 biopsies and a comparison with the glycerol model. **Medicine** 58: 362-376, 1979.

STRUTZ F.; ZEISBERG M.; ZIYADEH F.N. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. **Kidney Int** 61: 1714–1728, 2002.

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

SUTTON T.A.; MANG H.E.; CAMPOS S.B. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. **Am J Physiol Renal Physiol** 285: 191-198, 2003.

SUWA T.; HOGG J.C.; KLUT M.E. Interleukin-6 changes deformability of neutrophils and induces their sequestration in the lung. **Am J Resp Crit Care Med** 163: 970-976, 2001.

TAKADA M.; NADEAU K.C.; SHAW G.D. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. **J Clin Invest 99**: 2682-2690, 1997.

TANG W.W.; VAN G.Y.; QI M. Myofibroblast and alpha 1 [III] collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis. **Kidney Int** 51: 926-931, 1997.

THADANI R.; PASCULA M.; BONVENTRE J.V. Acute renal failure. **N Eng J Med** 334: 1448-1460, 1996.

THOMPSON H.L.; BURBELO P.D.; YAMADA Y.; KLEINMAN H.K.; METCALFE D.D. Mast cells chemotax to laminin with enhancement after IgE-mediated activation. **J Immunol** 143: 4188-4192, 1989.

THOMPSON H.L.; BURBELO P.D.; GABRIEL G.; YAMADA Y.; METCALFE D.D. Murine mast cells synthesize basement membrane components. A potential role in early fibrosis. **J Clin Invest** 87: 619-623, 1991.

THURMAN J.M. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. **Clinical Immunology** doi: 1016/j.clim.2006.09.08.

TÓTH T.; TÓTH-JAKATICS R.; JIMI S.; IHARA M.; URATA H.; TAKEBAYASHI S. Mast cells in rapidly progressive glomerulonephritis. **J Am Soc Nephrol** 10: 1498-505, 1999.

TURLINGTON B.S.; EDWARDS W.D. Quantitation of mast cells in 100 normal and 92 diseased human hearts. Implications for interpretation of endomyocardial biopsy specimens. **Am J Cardiovasc Pathol** 2: 151-157, 1988.

URARA H.; KINOSHITA A.; MISONO K.S.; BUMPS F.M.; HUSAIN A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin Iiforming enzyme in the human heart. **J Biol Chem** 265: 348–357, 1990.

VALENT P. Cytokines involved in growth and differentiation of human basophils and mast cells. **Exp Dermatol** 4: 255-259, 1995.

VAN ES A.; HERMANS J.; VAN BOCKEL J.H. Effect of warm ischemia time and HLA (A and B) matching on renal cadaveric graft survival and rejection episodes. **Transplantation** 36: 255-258, 1983.

VESEY D.A.; CHEUNG C.W.; CUTTLE L. Interleukin 1-b induce human proximal tubule injury, a-smooth muscle actin expressin and fibronectin production. **Kidney Int** 62: 31–40, 2002.

VERCAUTEREN S.R.; YSEBAERT D.K.; DE GREEF K.E.; EYSKENS E.J.; DE BROE M.E. Chronic reduction in renal mass in the rat attneuates ischemia/reperfusion injury and does not impair tubular regeneration. **J Am Soc Nephrol** 10: 2551-2561, 1999.

VILLANUEVA S.; CESPEDES C.; VIO C.P. Ischemic acute renal failure induces the expression of a wide range of nephrogenic proteins. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 290: 861–870, 2005.

VILLANUEVA S.; CESPEDES C.; GONZALEZ A.; VIO C.P. bFGF induces an earlier expression of nephrogenic proteins after ischemic acute renal failure. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 291: 1667-1687, 2006.

VUKICEVIC S.; BASIC V.; ROGIC D.; BASIC N.; SHIH M.S.; SHEPARD A.; JIN D.; DATTATREYAMURTY B.; JONES W.; DORAI H.; RYAN S.; GRIFFITHS D.; MALIAKAL J.; JELIC M.; PASTORCIC M.; STAVLJENIC A.; SAMPATH T.K. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. **J Clin Invest** 102: 202-14, 1998.

WALGENBACH K.J.; HEECKT P.F.; STANSON J.D.; WHITESIDE T.L.; BAUER A.J. Increased presence of mast cells and interleukin-4 during chronic rejection of rat intestinal allografts. **Transplant Proc** 28:2454, 1996.

WELBOURN C.R.; GOLDMAN G.; PATERSON I.S.; VALERI C.R.; SHEPRO D.; HECHTMAN H.B. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. **Br J Surg** 78: 651-655, 1991.

WERSHIL B.K.; MURAKAMI T.; GALLI S.J. Mast cell-dependent amplification of an immunologically nonspecific inflammatory response. **J Immunol** 140:2356-60, 1988.

WINGREN U.; ENERBÄCK L. Mucosal mast cells of the rat intestine: a re-evaluation of fixation and staining properties, with special reference to protein blocking and solubility of the granular glycosaminoglycan. **Histochem J** 15: 571–582, 1983.

WITZGALL R.; BROWN D.; SCHWARZ C.; BONVENTRE J.V. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. **J Clin Invest** 93: 2175–2188, 1994.

XIE Y.; NISHI S.; IGUCHI S.; IMAI N.; SAKATSUME M.; SAITO A. Expression of osteopontin in gentamicin-induced acute tubular necrosis and its recovery process. **Kidney Int** 59: 959-974, 2001.

YAMADA M.; UEDA M.; NARUKOT. Mast cell chymase expression and mast cell phenotypes in human rejected kidneys. **Kidney Int** 59: 1374–1381, 2001

YSEBAERT D.K.; DE GREEF K.E.; VERCAUTEREN S.R. Identification and kinetics of leucocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. **Nephrol Dial Transplant** 15: 1562-1574, 2000.

YSEBAERT D.K.; DE GREEF K.E.; VERCAUTEREN S. Effect of immunosuppression on damage, regeneration and leukocyte infiltration after severe warm ischemia-reperfusion renal injury. **Kidney Int** 64: 864-873, 2003.

YSEBAERT D.K.; DE GREEF K.E.; DE BEUF A.; VAN ROMPAY A.R.; VERCAUTEREN S.; PERSY V.P.; DE BROE M.E. T cells as mediators in renal ischemia/reperfusion injury. **Kidney Int** 66: 491-496, 2004.

ZWACKA R.M.; ZHANG Y.; HALLDORSON J.; SCHLOSSBERG H.; DUDUS L.; ENGELHARDT J.F. CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. **J Clin Invest** 100: 279-289, 1997.

ZHANG W.; EDWARDS A. Oxygen transport across vasa recta in the renal medulla. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 283: 1042–1055, 2002.